

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR & MOLECULAR E BIOAGENTES  
PATOGÊNICOS**

**LEONARDO BARCELOS DE PAULA**

**“Análise proteômica das diversas fases de diferenciação osteoblástica de  
células-tronco mesenquimais de medula óssea”**

**Ribeirão Preto  
2010**

LEONARDO BARCELOS DE PAULA

“Análise proteômica das diversas fases de diferenciação osteoblástica de  
células-tronco mesenquimais de medula óssea”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para a obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular

**Departamento:** Biologia Celular & Molecular e Bioagentes Patogênicos

**Área de concentração:** Biologia Celular e Molecular

**Orientador:**

Prof. Dr. José César Rosa

Ribeirão Preto  
2010

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA À FONTE.

**FICHA CATALOGRÁFICA**

Barcelos, Leonardo de Paula

“ANÁLISE PROTEÔMICA DAS DIVERSAS FASES DE DIFERENCIACÃO OSTEOBLÁSTICA DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIAS DE MEDULA ÓSSEA”. Ribeirão Preto, 2010.

145 p. : Il. ; 30 cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à  
Faculdade de Medicina de  
Ribeirão Preto/USP, 2010.

Área de concentração: Biologia Celular e Molecular

Orientador: Prof. Dr. José César Rosa.

1. Células-tronco mesenquimal. 2. Diferenciação osteoblástica.
3. Shotgun proteomics e iTRAQ. 4. Processo de regeneração óssea.

## FOLHA DE APROVAÇÃO



Universidade de São Paulo

Janus

### RELATÓRIO DE DEFESA



Aluno: 17136 - 6290322 - 2 / Página 1 de 1

Relatório de defesa pública de Dissertação do(a) Senhor(a) Leonardo Barcelos de Paula no Programa: Biologia Celular e Molecular, do(a) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Aos 13 dias do mês de dezembro de 2010, no(a) FMRP-USP realizou-se a Defesa da Dissertação do(a) Senhor(a) Leonardo Barcelos de Paula, apresentada para a obtenção do título de Mestre intitulada:

"Análise proteômica das diversas fases de diferenciação osteoblástica de células-tronco mesenquimais de medula óssea"

Após declarada aberta a sessão, o(a) Sr(a) Presidente passa a palavra ao candidato para exposição e a seguir aos examinadores para as devidas arguições que se desenvolvem nos termos regimentais. Em seguida, a Comissão Julgadora proclama o resultado:

Nome dos Participantes da Banca	Função	Sigla da CPG	Resultado
Jose Cesar Rosa	Presidente	FMRP - USP	APROVADO
Luis Lamberti Pinto da Silva	Titular	FMRP - USP	APROVADO
Richard John Ward	Titular	FFCLRP - USP	APROVADO

Resultado Final: APROVADO

### Parecer da Comissão Julgadora \*

Eu, Jorge Norio Rezende Ikawa \_\_\_\_\_, lavrei a presente ata, que assino juntamente com os(as) Senhores(as). Ribeirão Preto, aos 13 dias do mês de dezembro de 2010.

Luis Lamberti Pinto da Silva

Richard John Ward

Jose Cesar Rosa  
Presidente da Comissão Julgadora

\* Obs: Se o candidato for reprovado por algum dos membros, o preenchimento do parecer é obrigatório.

A defesa foi homologada pela Comissão de Pós-Graduação em \_\_\_\_\_ e, portanto, o(a) aluno(a) faz jus ao título de Mestre em Ciências obtido no Programa Biologia Celular e Molecular.

Presidente da Comissão de Pós-Graduação

## ***DEDICATÓRIA***

Dedico este trabalho às pessoas inesquecíveis em minha vida...

À Deus, fonte inesgotável de energia que me fortalece todos os dias.

Aos meu pais,

À minha mãe, ***Margareth Maria Barcelos de Paula***, mulher de fibra que nunca se deixou abater pelos problemas sejam eles os mais complicados de serem resolvidos. Dedicação em tempo integral com sua força de mulher e seu amor sincero e único. Sempre lutou pela felicidade de seus filhos fortalecendo cada passo dos mesmos através de sua imensa ternura, braços fortes e coração puro. Mulher, companheira, guerreira, lutadora, protetora, amiga, meu anjo... minha mãe! Atravessou montanhas, percorreu caminhos de pedra, chorou em silêncio, mas estava ali, sempre com seu brilho no olhar e sua firmeza inabalável...

Mãe, obrigado pelo eterno amor, carinho, graditão, pela confiança deposita em mim e por estar sempre ao meu lado onde quer que eu esteja...

Ao meu pai, ***Adahil de Paula Rodrigues***, meu herói que sempre me orientou não com base nas suas próprias experiências, mas sim, demonstrando que em cada experiência existe uma lição a ser aprendida. Sempre procurou dar a melhor educação para os seus filhos mostrando o quanto é necessário a busca do conhecimento para continuar caminhando na vida. Na verdade, pai não é aquele que sempre diz “não faça isso” ou “faça aquilo”, mas sim faça o melhor de acordo com os seus princípios.

Pai, obrigado por ser esse amigo sempre presente, atento, amoroso e por ter me dado todo o suporte para que eu pudesse alcançar todos os meus objetivos da melhor maneira possível.

Ao meu irmão, ***Leandro Barcelos de Paula***, grande amigo que eu posso contar sempre seja nos momentos bons ou ruins. Meu carinho, admiração e respeito por você não tem fronteiras. Não importa a nossa distância, sempre seremos irmãos-amigos.

À minha irmã, ***Ludmilla Barcelos de Paula***, a garotinha que eu sempre quis ter... Só podia ser a minha irmãzinha... Uma grande amiga que eu posso contar sempre. Está sempre disposta a me oferecer seu abraço e seu carinho incondicional. Nos momentos em que eu não via, estava ali, para me ajudar a enxergar. Sempre me divertiu, me surpreendeu e claro, me aconselhou quando necessário. É maravilhoso poder compartilhar contigo esse laço sanguíneo que nos uni pela força de nossas almas.

### ***AGRADECIMENTOS ESPECIAIS***

Ao meu orientador Dr. José César Rosa, pela oportunidade de fazer parte de seu grupo e compartilhar de seus conhecimentos que, sem dúvida, contribuíram para o meu crescimento profissional. Ter sido seu aluno de mestrado me proporcionou “desvendar” o mundo proteômico que, até então, era obscuro para mim. O convívio no dia-a-dia não proporcionou apenas o meu enriquecimento intelectual, mas sim, o meu crescimento pessoal e amadurecimento profissional permitindo que eu compreendesse o significado profundo do que é ciência. Sob sua orientação, a palavra profissionalismo sempre foi marcante em seus ensinamentos. Ser membro do Centro de Química de Proteínas é um grande diferencial na minha vida profissional. Parabéns pelo empenho e competência frente à pesquisa, por todo apoio e suporte para o desenvolvimento desse trabalho e por sempre me incentivar a alcançar os meus objetivos. O senhor sempre terá o meu respeito e admiração.

Ao Dr. Adalberto Luiz Rosa, pelo apoio incondicional e ensinamentos que proporcionaram o desenvolvimento desse trabalho, abrindo as portas do seu laboratório e deixando a disposição toda a sua equipe para que o mesmo fosse desenvolvido da melhor maneira possível. Agradeço pela oportunidade de poder trabalhar com pessoas extremamente competentes e profissionais.

## ***AGRADECIMENTOS***

Ao Dr. Lewis Joel Greene, pelo compartilhamento da sua vasta experiência na vida acadêmica para o meu crescimento profissional e pessoal.

À Dra. Clarice Izumi, pelos momentos de grandes ensinamentos em que durante a execução de um experimento se tornava obscuro, ali ela estava, para deixar tudo as claras.

À Dra. Hélen Julie Laure, pelos inúmeros esforços durante a obtenção dos resultados gerados no espectrômetro de massas.

Aos companheiros do Centro de Química de Proteínas (CQP-USP): Silvia Elena Bolfarini, Regina Amábile Mazzucato de Oliveira, Maria Helena da Silva Martins, Dra. Helen Cristina Miranda, Dra. Glauce Gaspar Gomes, Dra. Patrícia Pereira Macaroff, Dra. Gisele Guiçardi Tomazella, Alana Maria Cerqueira, Ana Carolina Humanes, Anelisa Ramão, Carolina Hassibe Thomé e Germano Aguiar Ferreira, pelos momentos de alegrias, festas e de muitas risadas... muito obrigado!!

Ao trio fantástico: Marcela Gimenez, Lucas Oliveira Sousa e Talita Diniz Melo, pelas inúmeras discussões científicas, companheirismo e, principalmente, pela amizade que foi de fundamental importância nessa caminhada...

À Fabíola Singaretti de Oliveira e o Roger Rodrigo Fernandes, pertencentes aos Laboratórios de Biologia Molecular e Cultura de Células da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP-USP) por todo o apoio e dedicação no auxílio do desenvolvimento desse trabalho. A colaboração de vocês foi de suma importância.

Aos grandes amigos: Dra. Angela Adamski da Silva Reis, Rodrigo da Silva Santos, Aline Helena da Silva Cruz e Danilo Cândido de Almeida, pela força, pelo companheirismo sendo na alegria ou na tristeza sempre estaremos juntos na caminhada... Agradeço de coração. Ao companheiro Victor Rodrigues Santos pela empreitada na vida de pós-graduando.

À Sandra Navarro Bresciani, sempre disposta a me socorrer nos momentos de desespero para a construção de uma imagem e responsável pela arte gráfica desse trabalho. Muito obrigado!!!

À Rosângela Catarina Peral Mesquita, por sempre ajudar e auxiliar nos momentos burocráticos que deparamos durante esse período.

À Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, pelo suporte e auxílio permitindo que o conhecimento adquirido com esse trabalho fosse difundido na comunidade científica através de congressos e eventos científicos.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa de mestrado concedida que, sem dúvida, sem este auxílio tudo teria sido muito mais complicado.

À Universidade de São Paulo e ao Departamento de Biologia Celular & Molecular e Bioagentes Patogênicos, sempre preocupados na formação de excelentes pesquisadores e profissionais.

À todos que de alguma forma contribuíram para a execução desse trabalho, deixo registrado a minha eterna gratidão.

## **EPÍGRAFES**

*“Querem que vos ensine o modo de chegar à ciência verdadeira? Aquilo que se sabe, saber que se sabe; aquilo que não se sabe, saber que não se sabe; na verdade é este o saber.”*

***Confúcio ( 551 a.C. - 479 a.C.)***

*“Não confunda derrotas com fracasso nem vitórias com sucesso. Na vida de um campeão sempre haverá algumas derrotas, assim como na vida de um perdedor sempre haverá vitórias. A diferença é que, enquanto os campeões crescem nas derrotas, os perdedores se acomodam nas vitórias.”*

***Roberto Shinyashiki (1952 -)***

## ***RESUMO***

**BARCELOS, L. P. Análise proteômica das diversas fases de diferenciação osteoblástica de células-tronco mesenquimais de medula óssea.** [Proteomics analysis of the various stages of osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow] Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Departamento de Biologia Celular & Molecular e Bioagentes Patogênicos - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

O crescimento, desenvolvimento e manutenção do tecido ósseo são processos altamente regulados. Diversas proteínas como hormônios, fatores de crescimento e citocinas estão envolvidas nestes processos e exercem atividade direta sobre células osteoblástica e osteoclástica, atuando em sua diferenciação e ativação metabólica. O processo de regeneração óssea é iniciado por fatores estimuladores locais como as proteínas morfogenética óssea (BMP – “Bone Morphogenetic Proteins”). As BMPs são um produto do metabolismo dos osteoblastos, odontoblastos e de várias células tumorais, sendo armazenadas na forma de concentrados no osso, dentina e em células neoplásicas do osteossarcoma e de certos tumores odontogênicos, tais como: fibroma cementificante, cementoblastoma benigno, dentinoma, fibroma odontogênico e odontoma. Esclarecer os mecanismos que controlam a remodelação óssea é uma questão bastante relevante. Nesse sentido, as células-tronco mesenquimais têm despertado grande interesse devido ao seu potencial envolvimento no processo de reparo tissular. A obtenção de osteoblastos funcionais a partir de células-tronco mesenquimais tem sido utilizada na engenharia de tecidos e terapia celular. Desse modo, no presente trabalho foi realizada uma análise proteômica das proteínas envolvidas nas diversas fases de diferenciação osteoblástica de células-tronco mesenquimais de medula óssea de rato Wistar e humana, no sentido de obter maiores informações sobre a diferenciação celular e a biologia do tecido ósseo. Células-tronco mesenquimais obtidas de medula óssea foram cultivadas em meio osteogênico por diferentes períodos para obter células em diversas fases da diferenciação osteoblástica. Para análise proteômica foram utilizadas ferramentas como a estratégia de “shotgun proteomics”

e quantificação relativa (iTRAQ - Isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation) para separação de proteínas e a espectrometria de massas para a identificação e quantificação relativa de proteínas e peptídeos. Neste contexto, os nossos resultados nos levam a concluir que: as CTMs de medula óssea de rato Wistar expressam genes que estão envolvidos na diferenciação osteogênica quando estimuladas *in vitro* formando matriz óssea no período de 14 dias, ou seja, o fator estimulante no microambiente é de fundamental importância; as CTMs de medula óssea humana apresentaram resultados semelhantes com as CTMs de ratos em nível genômico durante a diferenciação osteogênica, entretanto quando estimuladas *in vitro* formaram a matriz óssea no período de 21 dias; utilizando duas abordagens proteômicas, foi possível identificar proteínas importantes que estão envolvidas no processo de diferenciação. Mas cabe salientar que, embora tenham sido detectados genes que parecem envolvidos no processo de diferenciação, isso não teve reflexo no proteoma dessas células nos períodos de 7 e 14 dias da indução de diferenciação à osteogênese, o que indica que a maior parte da funcionalidade dessas células quanto aos outros processos biológicos estão preservados, como por exemplo a proliferação celular permaneceu sem grandes alterações. Isso indica que manipulações de isolamento, cultivo e indução da diferenciação dessas células não afetaram o proteoma, com aspectos positivos para a utilização de células-tronco mesenquimais em terapia celular. Do ponto de vista metodológico, esse trabalho abre perspectivas da utilização de estratégias proteômicas baseadas na marcação por isóbaros em combinação com separação de proteínas por eletroforese unidimensional SDS-PAGE para a análise de amostras biologicamente complexas e de quantidades limitadas de obtenção como células-tronco mesenquimais. O estudo da expressão de proteínas durante as fases de diferenciação osteoblástica de células-tronco mesenquimais de medula óssea deve refletir seu estado funcional e contribuir para o entendimento das diversas vias envolvidas no processo de diferenciação.

**Palavras Chaves:** 1. Células-tronco mesenquimal. 2. Diferenciação osteoblástica. 3. Shotgun proteomics e iTRAQ. 4. Processo de regeneração óssea.

## ***ABSTRACT***

BARCELOS, L. P. **Proteomics analysis of the various stages of osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow** Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Departamento de Biologia Celular & Molecular e Bioagentes Patogênicos - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

The growth, development and maintenance of bone tissue are highly regulated processes. Several proteins such as hormones, growth factors and cytokines are actively involved in these processes and exert direct activity on osteoblastic and osteoclastic cells, acting in their differentiation and metabolic activation. The process of bone regeneration is initiated by local stimulating factors as bone morphogenetic proteins (BMP). BMPs are a product of the metabolism of osteoblasts, odontoblasts and various tumor cells and is stored in the form of concentrates in bone, dentin and neoplastic cells of osteosarcoma and certain odontogenic tumors such as fibroma cementifying, cementoblastoma benign dentinoma, odontogenic fibroma and odontoma. Clarify the mechanisms that control bone remodeling is a very relevant issue. Accordingly, the mesenchymal stem cells have attracted great interest because of its potential involvement in the process of tissue repair. Obtaining functional osteoblasts from mesenchymal stem cells has been used in tissue engineering and cell therapy. Thus, this present work performed a proteomic analysis of proteins involved in various stages of osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow of Wistar rat and human, in order to obtain more information on the biology of cell differentiation and bone tissue. Mesenchymal stem cells obtained from bone marrow were cultured in osteogenic medium for different periods to obtain cells at different stages of osteoblast differentiation. For proteomics analysis tools were used as the strategy of shotgun proteomics and relative quantification (iTRAQ - isobaric Tag for Relative and Absolute quantitation) for protein separation and mass spectrometry to identify proteins. In this context, our results take us to conclude that the MSCs of Wistar rat bone marrow express genes that are involved in osteogenic differentiation in vitro when stimulated to form bone matrix during the 14 days, thus stimulating factor in the microenvironment is of fundamental importance, the MSCs from human bone marrow showed similar results with

rat MSCs at the genomic level during osteogenic differentiation, however, when stimulated in vitro formed bone matrix within 21 days, using two proteomic approaches, we could identify proteins important that are involved in the process of differentiation. But it should be noted that although it has been identified genes that seem involved in the process of differentiation, it was not reflected in the proteome of these cells at 7 and 14 days after induction of the osteogenic differentiation, indicating that most of the functionality of these cells and other biological processes are preserved, such as cell proliferation remained without major changes. This indicates that manipulations of isolation, culture and induction of differentiation of these cells did not affect the proteome, with positive aspects to the use of mesenchymal stem cells in cell therapy. From the methodological point of view, this work opens up the use of proteomic strategies based on the score for isobars in combination with protein separation by electrophoresis, one-dimensional SDS-PAGE for the analysis of complex biological samples and limited quantities of production as mesenchymal stem cells. The study of protein expression during stages of osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow should reflect their functional status and contribute to the understanding of pathways involved in the process of differentiation.

**Keywords:** 1. Mesenchymal stem cells. 2. Osteoblast differentiation. 3. Shotgun proteomics and iTRAQ. 4. Process of bone regeneration.

## **LISTAS DE ILUSTRAÇÕES**

**Figura 1.** Representação esquemática da diferenciação da célula-tronco multipotente em determinados tipos celulares.....3

**Figura 2.** Representação esquemática dos possíveis processos de plasticidade celular. A) Existência de células de um determinado tecido em um órgão não-relacionado. B) Fusão entre célula-tronco e célula diferenciada. C) Reprogramação genética. D) Presença de células-tronco pluripotentes em tecidos adulto.....5

**Figura 3.** Potencialidade de diferenciação das células-tronco mesenquimais da medula óssea.....9

**Figura 4.** Delineamento experimental para estudo da diferenciação das células-tronco mesenquimais de medula óssea de rato.....12

**Figura 5.** Delineamento experimental para estudo da diferenciação das células-tronco mesenquimais de medula óssea humana.....21

**Figura 6.** Exemplo de espectro de massa de peptídeo obtidos por em uma fração de nano-HPLC em que a fragmentação do íon  $m/z$  1620.86 [ $M+H^+$ ] por CID-MS/MS para a visualização da marcação com iTRAQ. (Fração 7, SDS-PAGE). A proteína Ras-related protein Rab-1A foi identificada utilizando o software MASCOT contra o banco de dados Swiss Prot versão 57.2.fasta.....34

**Figura 7.** Atividade da fosfatase alcalina de células osteogênicas derivadas da medula óssea de ratos Wistar cultivadas durante o período de 7, 10 e 14 dias. Desvio padrão – MEM (7 dias: 1,4978; 10 dias: 1,6915; 14 dias: 1,1068) e MTS (7 dias: 3,2634; 10 dias: 9,9566; 14 dias: 13,1430). Os dados são reportados como média  $\pm$  desvio padrão ( $n=4$ ).....41

**Figura 8.** Atividade da fosfatase alcalina de células osteogênicas derivadas da medula óssea humana cultivadas durante o período de 7, 10 e 14 dias. Desvio padrão – MEM (7 dias: 2,2545; 10 dias: 0,9862; 14 dias: 0,7623) e MTS (7 dias: 1,7540; 10 dias: 9,0064; 14 dias: 9,6961). Os dados são reportados como média  $\pm$  desvio padrão ( $n = 3$ ).....41

**Figura 9.** Processo de mineralização das células osteogênicas derivadas da medula óssea de ratos Wistar cultivadas durante 14 dias. Microscopia de contraste de fase: (A) células

cultivadas em MEM 15%; (B) células cultivadas em MTS 15%. Coloração pelo método Alizarin red S: (C) cultura de células mesenquimais com ausência de estímulos de diferenciação osteogênica (MEM 15%); (D) cultura de células mesenquimais na presença de estímulos para a osteogênese (MTS 15%).....43

**Figura 10.** Processo de mineralização das células osteogênicas derivadas da medula óssea humana cultivadas durante 21 dias. Microscopia de contraste de fase: (A) células cultivadas em MEM 10%; (B) células cultivadas em MTS 10%. Coloração pelo método de Alizarin red S: (C) cultura de células mesenquimais com ausência de estímulos de diferenciação osteogênica (MEM 10%); (D) cultura de células mesenquimais na presença de estímulos para a osteogênese (MTS 10%).....43

**Figura 11.** Processo de mineralização das células osteogênicas derivadas da medula óssea de ratos Wistar cultivadas durante 14 dias. Viabilidade células (média ± desvio padrão, em densida óptica) de culturas de células-tronco mesenquimais na aus%encia (MEM) e na presença (MTS) de estímulos para a diferenciação osteogênica nos períodos de 24 horas, 3, 7 e 10 dias, determinada pelo ensaio colorimétrico MTT.....44

**Figura 12.** Viabilidade celular (média ± desvio padrão, em densidade óptica) de culturas de células-tronco mesenquimais na aus%encia (MEM) e na presença (MTS) de estímulos para a diferenciação osteogênica nos períodos de 3, 7 e 10 dias, determinada pelo ensaio colorimétrico MTT.....45

**Figura 13.** Análise da expressão gênica dos marcadores de diferenciação osteoblástica ALP, RUNX2, BSP, OC, OSTERIX e MSX2 em culturas com ausência (MEM) e na presença (MTS) de estímulos para a diferenciação osteogênica nos períodos de 7, 10 e 14 dias. Os valores foram normalizados pelo gene constitutivo GAPDH e calibrados pelos valores obtidos para o grupo MEM.....46

**Figura 14.** Análise da expressão gênica dos marcadores de diferenciação osteoblástica COL I, RUNX2, BSP, ALP, OP, OC e RANKL em culturas com ausência (MEM) e presença (MTS) de estímulos de diferenciação osteogênica nos períodos 7 e 14 dias. Os valores foram normalizados pelo gene constitutivo ACTIN ( $\beta$ -actina) e calibrados pelos valores obtidos para o grupo MEM.....46

**Figura 15.** SDS-PAGE obtido de extratos de células mesenquimais de medula óssea de rato. Foram submetidos à eletroforese 25 $\mu$ g de proteínas de cada amostra em duplicata. (I) células cultivadas em MEM 15%: as bandas foram recortadas do gel e submetidas à hidrólise enzimática por tripsina. As bandas que apresentaram em duplidade, foram unidas em um único tubo (a+b=A: 7 dias, c+d=B: 14 dias). (II) células cultivadas em MTS 15%: as bandas sofreram os mesmos procedimentos do (I), sendo (e+f=C: 7 dias, g+h=D: 14 dias). M:

marcador de peso molecular – LMW (Protein and Peptide Molecular Weigth Markers) GE Healthcare.....	48
<b>Figura 16.</b> Análise por Gene Ontology (BABELOMICS v3.2) das proteínas identificadas por MS de células-tronco mesenquimais de medula óssea de rato durante a indução da osteogênese.....	57
<b>Figura 17.</b> Eletroforese em SDS-PAGE obtido de extratos de células mesenquimais de medula óssea de rato para a marcação com iTRAQ. Foram submetidos à eletroforese 30µg de proteínas de cada amostra. (I) células cultivadas até o período de 7 dias (7D). (A) MEM 15%; (B) MTS 15% e (C) Controle interno 1 (15µg → MEM 7D + 15µg → MTS 7D). (II) células cultivadas até o período de 14 dias (14D). (D) MEM 15%; (E) MTS 15% e (F) Controle interno 2 (15µg → MEM 14D + 15µg → MTS 14D). M: marcador de peso molecular – LMW-SDS Marker Kit GE Healthcare. As frações foram recortadas do gel e submetidas à hidrólise enzimática por tripsina.....	59
<b>Figura 18.</b> Eletroforese em SDS-PAGE obtido de extratos de células mesenquimais de medula óssea humana para a marcação com iTRAQ. Foram submetidos à eletroforese 30µg de proteínas de cada amostra. (I) células cultivadas até o período de 7 dias (7D). (A) MEM 10%; (B) MTS 10% e (C) Controle interno 1 (15µg → MEM 7D + 15µg → MTS 7D). (II) células cultivadas até o período de 14 dias (14D). (D) MEM 10%; (E) MTS 10% e (F) Controle interno 2 (15µg → MEM 14D + 15µg → MTS 14D). M: marcador de peso molecular – LMW-SDS Marker Kit GE Healthcare. As frações foram recortadas do gel e submetidas à hidrólise enzimática por tripsina.....	65
<b>Figura 19.</b> Análise por Gene Ontology das proteínas identificadas por MS de células-tronco mesenquimais de medula óssea humana durante a indução da osteogênese.....	68
<b>8.1 ANEXO A – COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - FACULDADE DE MEDICINA DE CATANDUVA.</b> .....	93
<b>8.2 ANEXO B – COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE CÉLULAS HUMANAS – UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO (FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO)</b> .....	94
<b>8.3 ANEXO C – Identificação de proteínas das células-tronco mesenquimais de medula óssea de rato através do método de shotgun proteomics</b> .....	95
<b>8.4 ANEXO D – IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIAS DE MEDULA ÓSSEA DE RATO ATRAVÉS DO MÉTODO DE iTRAQ</b> .....	99

**8.5 ANEXO E – IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIAS DE MEDULA ÓSSEA HUMANA NO PERÍODO DE 7 DIAS: MEM 10%(113), MTS 10% (114).....110**

**8.6 ANEXO F – IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIAS DE MEDULA ÓSSEA HUMANA NO PERÍODO DE 14 DIAS: MEM 10%(116), MTS 10% (117).....124**

## **LISTAS DE TABELAS**

<b>Tabela 1</b> – Primers utilizados para a reação de Real time PCR para amostras de células-tronco de medula óssea de rato.....	28
<b>Tabela 2</b> – Primers utilizados para a reação de Real Time PCR para amostras de células-tronco de medula óssea humana.....	29
<b>Tabela 3</b> – Característica imunifenotípicas de células mesenquimais obtidas de medula óssea humana cultivadas em meios de cultura sem fatores estimuladores da osteogênese (MEM) e com fatores estimuladores da osteogênese (MTS) com pacientes entre 21 a 45 anos.....	39
<b>Tabela 4</b> – Identificação das proteínas por MALDI-TOF-TOF detectadas a partir de células cultivadas em MEM 15% com score $\geq 35$ .....	49
<b>Tabela 5</b> – Identificação das proteínas por MALDI-TOF-TOF detectadas a partir de células cultivadas em MTS 15% com score $\geq 35$ .....	52
<b>Tabrla 6</b> – Identificação de proteínas por MALDI-TOF-TOF comuns entre as células cultivadas em MEM 15% e MTS 15%.....	55
<b>Tabela 7</b> – Identificação de proteínas por MALDI-TOF-TOF exclusivas das células cultivadas em MEM 15%.....	56
<b>Tabela 8</b> – Identificação de proteínas por MALDI-TOF-TOF exclusivas das células cultivadas em MTS 15%.....	56
<b>Tabela 9</b> – Identificação de proteínas por MALDI-TOF-TOF marcadas com iTRAQ nos períodos 7 e 14 dias das células cultivadas em MEM 15% e MTS 15% .....	60
<b>Tabela 10</b> – Identificação de proteínas por MALDI-TOF-TOF no período 7 dias das células cultivadas em MEM 15% (113) e MTS 15% (114).....	61
<b>Tabela 11</b> – Identificação de proteínas por MALDI-TOF-TOF no período 14 dias das células cultivadas em MEM 15% (116) e MTS 15% (117).....	62

**Tabela 12** – Identificação de proteínas por MALDI-TOF-TOF com único peptídeo marcado com iTRAQ nos períodos 7 e 14 dias das células cultivadas em MEM 10% e MTS 10%.....66

**Tabela 13** – Identificação de proteínas por MALDI-TOF-TOF com dois peptídeos marcados com iTRAQ no período 7 dias das células cultivadas em MTS 10%.....67

## **LISTAS DE SIGLAS E SÍMBOLOS**

<b>1D:</b>	<i>eletroforese unidimensional</i>
<b>ARS:</b>	<i>do inglês “Alizarin red S”</i>
<b>BMP:</b>	<i>do inglês “Bone Morphogenetic Protein”</i>
<b>°C:</b>	<i>Graus Celsius</i>
<b>cDNA:</b>	<i>do inglês “Complementary desoxiribonucleic acid”</i>
<b>CFU-F:</b>	<i>do inglês “Colony forming units – fibroblastic”</i>
<b>cm<sup>2</sup>:</b>	<i>Centímetros quadrados</i>
<b>CO<sub>2</sub>:</b>	<i>Dióxido de Carbono</i>
<b>CT:</b>	<i>Célula-tronco</i>
<b>CTM:</b>	<i>Célula-tronco mesenquimal</i>
<b>CTM-MO:</b>	<i>Célula-tronco mesenquimal derivada da medula óssea</i>
<b>DNA:</b>	<i>do inglês “Desoxiribonucleic acid”</i>
<b>DO:</b>	<i>Densidade óptica</i>
<b>DTT:</b>	<i>Ditiotreitol</i>
<b>EDTA:</b>	<i>Ácido etilenodiamiotetracético (sal dissódico)</i>
<b>FORP-USP:</b>	<i>Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo</i>
<b>HCFMRP-USP:</b>	<i>Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo</i>
<b>HCl:</b>	<i>Ácido Clorídrico</i>
<b>iTRAQ:</b>	<i>do inglês “(Isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation)”</i>
<b>MAPC:</b>	<i>do inglês “Multipotent adult progenitors cells”</i>
<b>MALDI-TOF/TOF:</b>	<i>Espectrômetro de massas do tipo MALDI-TOF/TOF</i>
<b>MEM:</b>	<i>do inglês “α-Minimum Essential Medium”</i>
<b>MTS:</b>	<i>Meio de cultura MEM suplementado com os estimuladores para a osteogênese</i>
<b>mg:</b>	<i>Miligramma</i>
<b>mL:</b>	<i>Mililitro</i>
<b> mM:</b>	<i>Milimolar</i>

<b>MO:</b>	<i>Medula Óssea</i>
<b>pb:</b>	<i>Pares de bases</i>
<b>PBS:</b>	<i>do inglês “Phosphate Buffered Saline”</i>
<b>PCR:</b>	<i>do inglês “Polimerase chain reaction”</i>
<b>RNA:</b>	<i>do inglês “Ribonucleic acid”</i>
<b>RT-PCR:</b>	<i>do inglês “Reverse transcriptase-polymerase chain reaction”</i>
<b>SITC:</b>	<i>Sociedade Internacional de Terapia Celular</i>
<b>SP:</b>	<i>do inglês “Shotgun Proteomics”</i>
<b>TA:</b>	<i>Temperatura Ambiente</i>
<b>TGF-<math>\beta</math>:</b>	<i>do inglês “Transforming Growth Factor-<math>\beta</math>”</i>
<b>v/v:</b>	<i>Volume/Volume</i>
<b>VEGF:</b>	<i>do inglês “Vascular endothelial growth factor”</i>
<b><math>\mu</math>g:</b>	<i>Micrograma</i>
<b><math>\mu</math>l:</b>	<i>Microlitro</i>
<b><math>\mu</math>m:</b>	<i>Micrômetro</i>

## SUMÁRIO

RESUMO.....	XI
ABSTRACT .....	XIII
LISTAS DE ILUSTRAÇÕES .....	XV
LISTAS DE TABELAS .....	XIX
LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS.....	XXI
1. INTRODUÇÃO.....	2
1.1. Definição e classificação das células-tronco.....	2
1.2. Células-tronco adultas e sua plasticidade celular .....	3
1.3. Células-tronco mesenquimais .....	6
1.4. Células-tronco mesenquimais e diferenciação em osteoblastos.....	12
1.5. Abordagem proteômica .....	14
2. OBJETIVOS .....	17
2.1. Objetivo geral .....	17
2.2. Objetivos específicos .....	17
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1. Obtenção das células-tronco mesenquimais de medula óssea de rato .....	19
3.2. Obtenção de células-tronco mesenquimais de medula óssea humana .....	20
3.2.1. Caracterização imunofenotípica das células-tronco mesenquimais humanas .....	20
3.3. Padronização das condições de diferenciação osteoblástica .....	21
3.4. Caracterização da diferenciação osteoblástica .....	22
3.4.1. Determinação dos níveis enzimáticos de fosfatase alcalina .....	22
3.4.2. Análise da formação da matriz extracelular e mineralização por colorimetria utilizando “Alizarin red S” .....	23
3.4.3. Ensaio de proliferação celular .....	24
3.5. Análise da expressão gênica dos marcadores da diferenciação osteoblástica.....	24
3.5.1. Extração de RNA total.....	24
3.5.2. Quantificação de RNA.....	25
3.5.3. Construção do cDNA.....	26
3.5.4. Análise da diferenciação osteoblástica por pcr em tempo real (Real-time PCR) .....	26
3.6. Análise proteômica.....	30
3.6.1. Obtenção dos extratos protéicos de células-tronco mesenquimais de medula óssea de rato e humana .....	30
3.6.2. Caracterização de proteínas por “shotgun proteomics” .....	30
3.6.3. Marcação isobárica para quantificação absoluta e relativa - iTRAQ.....	33
4. RESULTADOS.....	38
4.1. Imunofenotipagem de células mesenquimais obtidas de medula óssea humana.....	38
4.2. Caracterização da diferenciação osteoblástica .....	40
4.2.1. Atividade de fosfatase alcalina.....	40

4.2.2. Avaliação do processo de calcificação.....	42
4.2.3. Proliferação celular.....	44
4.3. Análise da expressão gênica durante a diferenciação osteoblástica .....	45
4.4. Análise proteômica de células mesenquimais de medula óssea de rato em diversas fases de diferenciação osteoblástica .....	47
4.4.1. Identificação de proteínas por 1D-LC-MALDI-TOF/TOF .....	47
4.4.2. Quantificação relativa de proteínas presentes nas diferentes fases da diferenciação osteoblástica utilizando isóbaros iTRAQ .....	57
4.5. Análise proteômica de células mesenquimais da medula óssea humana em diversas fases de diferenciação osteoblásticas .....	63
5. DISCUSSÃO.....	72
6. CONCLUSÃO.....	83
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	85
8. ANEXOS.....	101

# **INTRODUÇÃO**

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Definição e classificação das células-tronco

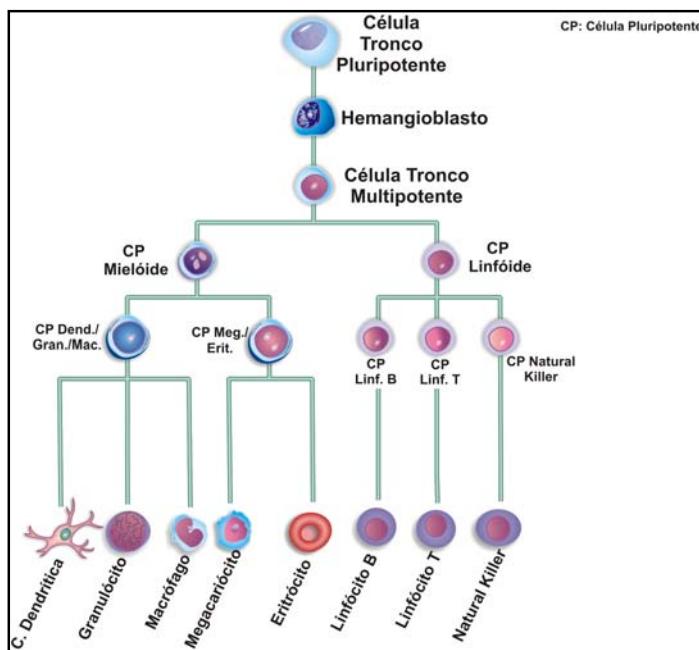
As células-tronco (CT) são definidas como as células que se encontram no topo da hierarquia de uma linhagem com capacidade de auto-renovação contínua (proliferação), possibilitando originar células funcionalmente e morfologicamente diferenciadas de um determinado tecido (diferenciação) (KOOY *et al.*, 2000).

Com relação à sua origem e suas propriedades biológicas, as CTs podem ser classificadas em embrionárias e adultas. As células-tronco embrionárias são derivadas da camada interna do embrião, na fase de desenvolvimento do blastocisto e possuem capacidade de originar mais de 200 tipos celulares diferentes (ZHANG *et al.*, 2006). Já as células-tronco adultas estão presentes em órgãos ou tecidos diferenciados, como cérebro, medula óssea, vasos sanguíneos, pele e fígado (BARRY; MURPHY, 2004) e são responsáveis pela manutenção da integridade dos tecidos, pelo reparo diante de lesões e pela remodelação dos tecidos (ZAGO; COVAS, 2006).

Com relação ao potencial de diferenciação, as CTs podem ser classificadas em quatro categorias: totipotentes, pluripotentes, multipotentes e oligopotentes (ZHANG *et al.*, 2006).

As células-tronco totipotentes possuem o potencial de diferenciação em todos os tipos celulares desde os três folhetos embrionários (ectoderme, mesoderme e endoderme) até os anexos embrionários. Tais células têm a capacidade de originar um ser humano completo quando implantadas em um útero normal. Particularmente em mamíferos, apenas os zigotos são totipotentes (ZHANG *et al.*, 2006). Entretanto, na fase de blastocisto, as camadas mais internas podem originar células do folheto embrionário sendo denominadas de pluripotentes. Já a placenta originará células da camada mais externa (ZHANG *et al.*, 2006).

As células multipotentes podem se diferenciar em determinados tipos celulares dentro de um determinado órgão; por exemplo, as células-tronco hematopoiéticas adultas darão origem apenas a glóbulos vermelhos e brancos ou plaquetas (Figura 1). Células-tronco oligopotentes podem originar poucos tipos celulares especializados; por exemplo, as células mesenquimais se diferenciam em células ósseas, musculares, lipídicas e células de tecidos conectivos (ZHANG *et al.*, 2006).



**Figura 1. Representação esquemática da diferenciação da célula-tronco multipotente em determinados tipos celulares.**

## 1.2. Células-tronco adultas e sua plasticidade celular

As células-tronco adultas foram isoladas de vários tecidos, dentre eles: hematopoiético, neural, gastrointestinal, epidermal, hepático (JIANG *et al.*, 2002), vascular, muscular, pancreático (SPPES *et al.* 2003), cordão umbilical (KIM *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2004), dentre outros.

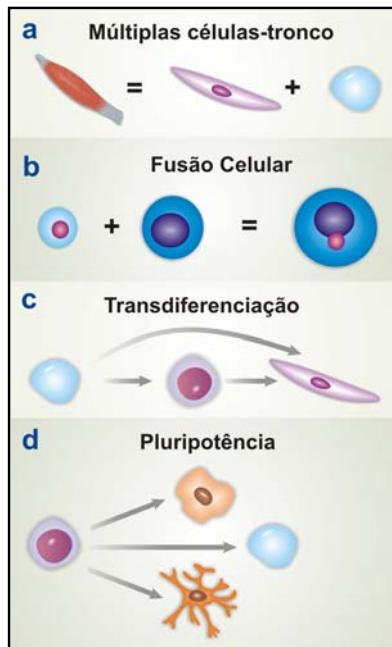
O papel fisiológico destas células em adultos ainda não está totalmente esclarecido. Entretanto, o seu potencial de diferenciação *in vitro* em vários tecidos está sendo explorado, visando a regeneração óssea (LUYTEN, 2004) e de outros tecidos (BOCELLI-TYNDALL *et al.*, 2007). As células-

tronco tecido-específicas, até pouco tempo, eram consideradas como células capazes de se diferenciar somente em células do tecido de origem, ou seja, multipotentes. Entretanto, Jiang e colaboradores (2002) demonstraram que tais células podem se diferenciar em outras linhagens além das do tecido de origem (JIANG *et al.*, 2002).

Tal atributo, em relação à potência das células-tronco adultas, é denominado como plasticidade celular. Herzog e colaboradores (2003) definiram que a plasticidade se refere às novas habilidades, descritas na literatura, das células-tronco adultas de atravessar barreiras de linhagem e adquirir fenótipos funcionais de células de outros tecidos (HERZOG *et al.*, 2003), sendo tal definição a mais aceita pela comunidade científica.

Experimentos *in vivo* demonstraram o processo de plasticidade através de modelos de lesão induzida e observações da migração e diferenciação dessas células para as áreas lesadas com subsequente regeneração (HERZOG *et al.*, 2003). Quatro hipóteses são propostas para explicar a plasticidade observada em experimentos *in vivo* (Figura 2), entre elas: (1) múltiplas células-tronco (células de um determinado tecido podem existir em um órgão não relacionado); (2) fusão celular; (3) transdiferenciação e (4) pluripotência (persistência de células-tronco pluripotentes em tecidos adultos). A primeira é atribuída à presença de CT em um dado tecido que poderiam se diferenciar em células de um tecido não-relacionado, dando a falsa impressão de plasticidade (VERFAILLIE, 2002). Um mecanismo alternativo seria a fusão celular de uma célula-tronco adulta com uma célula diferenciada, o que converteria o padrão de expressão da célula-tronco no padrão de célula diferenciada. Entretanto, experimentos *in vitro* têm mostrado que este parece ser um evento bastante raro ( $1/10^4$  a  $1/10^6$ ) (JIANG *et al.*, 2002; HERZOG *et al.*, 2003; VERFAILLE, 2002). Há ainda a possibilidade de uma célula diferenciada sofrer reprogramação genética e tornar-se pluripotente, fenômeno denominado transdiferenciação ou desdiferenciação (VERFAILLIE, 2002). Uma última

explicação seria a permanência de células-tronco pluripotentes em tecidos adultos (JIANG, *et al.*, 2002; VERFAILLIE, 2002). A presença desses tipos celulares no organismo adulto não é completamente aceita na comunidade científica, devido às contradições nos experimentos realizados *in vitro* e *in vivo*.



**Figura 2. Representação esquemática dos possíveis processos de plasticidade celular.** **A)** Existência de células de um determinado tecido em um órgão não-relacionado. **B)** Fusão entre célula-tronco e célula diferenciada. **C)** Reprogramação genética. **D)** Presença de células-tronco pluripotentes em tecidos adulto.

Song e Tuan (2004) mostraram que células-tronco mesenquimais humanas podem sofrer transdiferenciação *in vitro* em outros tipos celulares de acordo com o estímulo externo. Ou seja, quando o agente indutor de diferenciação é trocado, as células totalmente diferenciadas (osteoblastos, condrócitos e adipócitos) poderiam sofrer transdiferenciação a um estágio indiferenciado através de reprogramação genética. Esses autores conseguiram originar adipócitos e condrócitos a partir de osteoblastos derivados de CTMs, bem como osteócitos e condrócitos a partir de adipócitos e osteoblastos e adipócitos a partir de condrócitos (SONG & TUAN, 2004).

Outros estudos mostraram uma série de eventos de transdiferenciação: células de músculo esquelético (células satélites) em células sanguíneas (TSAL; KITTAPPA; MCKAY, 2002; CAPLAN; BRUDER, 2001); do sistema nervoso central em musculares, hepatócitos, miocárdio e neurais; hematopoéticas em epitélio e tecidos endodérmicos e ectodérmicos (TSAL; KITTAPPA; MCKAY, 2002). A falta de consenso na literatura envolve o fato de que os dados coletados são geralmente baseados em características morfológicas e ensaios imunohistoquímicos, o que pode ser insuficiente para concluir que estas células irão se integrar funcionalmente nos tecidos. Segundo estudos desenvolvidos por Verfaillie (2002), Grove e colaboradores (2004) a ausência de provas funcionais *in vivo* se torna insustentável a conclusão de que estas células são, de fato, plásticas.

### ***1.3. Células-tronco mesenquimais***

Dentre os diversos tipos de células-tronco adultas, as células-tronco mesenquimais (CTM) compõem um grupo que vem despertando grande interesse.

Segundo Minguell e colaboradores (2001), a multipotencialidade, bem como a facilidade de isolamento e sua expansão *in vitro*, tornam as CTMs uma alternativa terapêutica atrativa com um amplo espectro de aplicações clínicas no contexto de terapia celular (MINGUELL *et al.*, 2001). O interesse neste tipo celular cresceu nos últimos anos devido ao seu grande potencial de uso na regeneração de tecidos e órgão lesados, como vem sendo demonstrado nos estudos clínicos e pré-clínicos (BARRY; MURPHY, 2004). As CTMs são responsáveis pela manutenção do microambiente estromal da medula óssea e participam como agentes reguladores da hematopoiese (GARTNER; HIATT, 2007).

Em 1867, com estudos realizados pelo patologista Julius Friedrich Cohnheim, surgiu a primeira evidência de que células não hematopoéticas apresentavam potencial regenerativo. Cohnheim, com base em suas observações em trabalhos de reparo de feridas, identificou não só

células inflamatórias, mas também células com formato fibroblastóide agindo no local da cicatrização. Foi observado também que a maioria das células, as quais atuavam na cicatrização, eram, provavelmente, oriundas da medula óssea (FEHRER; LEPPERDINGER, 2005).

Após um século, as CTMs foram originalmente descritas por Alexander Friedenstein e colaboradores em 1966 e posteriormente em 1970 e 1974 (FRIEDENSTEIN *et al.*, 1966). No entanto, nestes estudos os autores propuseram somente a identificação de uma população de células fibroblastóides com capacidade de aderência e formação de colônias CFU-Fs (“*colony-forming units-fibroblast*”) *in vitro*.

Arnold Caplan, em 1991, propôs que as CTMs poderiam ser isoladas da medula óssea de indivíduos adultos e seriam correspondentes às CTMs do embrião. Nesse trabalho, o autor relatou que essas células poderiam ser utilizadas terapeuticamente para tratamento de doenças ósseas e articulares.

As CTMs ganharam maiores destaque na comunidade científica há apenas quase uma década. Entretanto, evidências *in vivo* de que as referidas CTMs possuam características de célula-tronco (CT) como capacidade de auto-renovação, sobrevivência por um longo período e repopulação tecidual com potencial de diferenciação em múltiplas linhagens permanecem escassas (PHINNEY, 2002 e HORWITZ *et al.*, 2005) assim como estudos proteômicos relacionados com o processo de diferenciação dessas células.

A Sociedade Internacional de Terapia Celular (SITC), em 2005, com o objetivo de promover o uso de uma terminologia padronizada para facilitar o intercâmbio de conhecimento entre pesquisadores da área, propôs que as células aderentes ao plástico, atualmente chamadas células-tronco mesenquimais, sejam nomeadas como células estromais mesenquimais multipotentes. A terminologia células-tronco mesenquimais deve ser utilizada apenas para um

subgrupo destas células que demonstrem atividade de células-tronco através de critérios mínimos (HORWITZ *et al.*, 2005). A SITC estabeleceu três critérios mínimos para definir as células estromais mesenquimais multipotentes: (1º) essas células devem manter a propriedade de aderência ao plástico quando submetidas a uma condição padrão de cultura; (2º) obrigatoriamente devem expressar como moléculas de superfície celular os marcadores CD105, CD73 e CD90 e, simultaneamente, não expressar CD45, CD34, CD14 (ou CD11b, CD79a ou CD19) e HLA-DR e (3º) esses tipos celulares devem, pelo menos, diferenciar em condroblastos, adipócitos e osteoblastos *in vitro* (DOMINICI *et al.*, 2006). A versatilidade e a abundância de fontes para obtenção destas células são notáveis. Assim como as demais células-tronco adultas, vários estudos demonstram a plasticidade destas células *in vivo* e *in vitro* (Figura 3). Todavia, no presente trabalho, somente por razões de conveniência, as células estromais mesenquimais multipotentes serão denominadas de células-tronco mesenquimais.

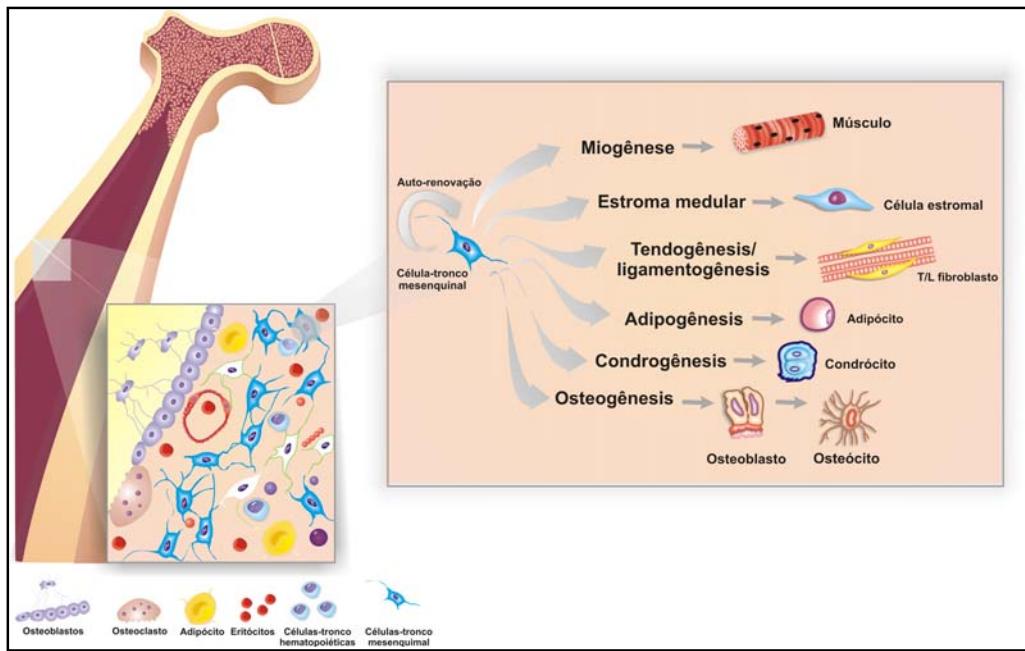


Figura 3. Potencialidade de diferenciação das células-tronco mesenquimais da medula óssea.

As CTMs são consideradas progenitores multipotentes e podem ser caracterizadas *in vitro* pelo seu potencial de diferenciação (sob estímulo adequado) em: osteócitos, condrócitos e adipócitos. Essas células também possuem grande habilidade para a produção de um número variado de citocinas e fatores de crescimento (AWAD *et al.*, 1999; CAPLAN; BRUDER, 2001 e CHATEAUVIEUX *et al.*, 2007). As CTMs estão sendo testadas para o tratamento de doenças cardíacas isquêmicas e degenerativas, lesões ósseas, condrais, tendinosas, pulmonares, da medula espinhal, do sistema nervoso central, do fígado e em doença genéticas como a osteogênese imperfeita (ZAGO; COVAS, 2006).

Como parte do nicho das CT hematopoiéticas, as CTMs participam na regulação da sobrevivência, quiescência e diferenciação em células sanguíneas maduras. As CTMs exercem uma influência na formação inicial de linfócitos B, sendo a interação com as células estromais da medula óssea fundamental para o desenvolvimento normal dos progenitores de linfócitos B. Foi demonstrado que a galectina-1 é um ligante da célula estromal para o receptor pré-B humano, que é

indispensável para a sobrevivência do linfócito B imaturo. Interessantemente, a galectina-1 é altamente expressa em CTMs (AGGARWAL; PITTINGER, 2005).

Nos estudos com células de medula óssea já era conhecida a existência de um grande número de células que se aderiam ao plástico na cultura, proporcionando um microambiente para o crescimento das CT hematopoiéticas e para a diferenciação em granulócitos e eritrócitos. Observou-se que os precursores hematopoiéticos interagiam diretamente com estas células aderentes e estas compartilham muitas características com as CTMs (PROCKOP, 1997).

Pitterger e colaboradores (1999) realizaram o isolamento, a expansão e a caracterização destas células a partir de medula óssea humana extraída da crista ilíaca. Estas células multipotentes, responsáveis pela composição em torno de 0,001% a 0,01% das células nucleadas da medula óssea adulta, crescem *in vitro* de maneira aderente, como células fibroblastóides em meio de cultura apropriado. Observou-se ainda a capacidade das células expandidas de se diferenciar, mediante estímulos específicos, em linhagens mesenquimais tais como: ossos, cartilagens, adipócitos, tendões, músculos e estroma medular (PITTERGER *et al.*, 1999).

Do ponto de vista fisiológico, a diferenciação de CTM em osteoblastos é importante na manutenção das espículas trabeculares ósseas, que compõem a medula óssea. Por outro lado, com a idade, a medula é parcialmente substituída por tecido adiposo, o que explicaria a diferenciação em adipócitos. Com relação aos condroblastos, pode estar relacionada ao reparo inicial de fraturas (PROCKOP, 1997).

As CTMs são encontradas tipicamente na fração estromal da medula óssea adulta, porém nos últimos anos, células exibindo características morfológicas de CTM foram isoladas de tecido adiposo (ZUK *et al.*, 2001), trabéculas ósseas (SOTTILE *et al.*, 2002), cordão umbilical (LEE *et al.*, 2004;

KIM *et al.*, 2004) sangue fetal, fígado, pulmão, vilo coriônico da placenta e fluido amniótico (JACKSON *et al.*, 2007).

A presença destas células em sangue periférico adulto é controversa. O estudo conduzido por Zvaifler *et al.* (2000) demonstrou que existem CTMs no sangue periférico de indivíduos normais. Já DA SILVA MEIRELLES; CHAGASTELLES; NARDI (2006) demonstraram que as CTMs são encontradas em todos os tecidos, exceto em sangue periférico, sugerindo que o compartimento perivascular deva ser considerado um novo nicho para estas células.

O método de isolamento tradicional baseia-se na característica das CTMs aderirem seletivamente em superfícies plásticas, enquanto as hematopoiéticas são removidas com as trocas de meio de cultura. Não há um marcador específico que a identifique, por isso diferentes grupos têm optado por uma variedade de combinações de marcadores, a maioria inclui CD29 e CD105 (JACKSON *et al.*, 2007).

A diferenciação de células-tronco mesenquimais em células neurais foi demonstrada em vários trabalhos tanto *in vitro* como *in vivo*. Entretanto, a capacidade de geração de neurônios com capacidade funcional é hipotética. De acordo com o estudo de Mareschi e colaboradores (2006), a presença de marcadores e morfologia neurais, somadas às propriedades eletrofisiológicas características, demonstram a capacidade de células-tronco mesenquimais de medula óssea gerar células que se assemelham a neurônios.

Reyes e colaboradores (2002) mostraram que as MAPCs (*Multipotent adult progenitors cells*) diferenciam em células com morfologia e fenótipo endotelial tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Ferrari e Mavilio (2002) observaram que as células de medula óssea entravam em processo de diferenciação miogênica frente a danos musculares, participando assim do reparo muscular. Outros estudos sugerem ainda que CTMs podem dar origem a endotélio, hepatócitos, células neurais após

injeção em blastocistos (TSAI; KITTAPPA; MCAY, 2002; MINGUELL; ERICES; CONGET, 2001; CAPLAN; BRUDER, 2001).

#### **1.4. Células-tronco mesenquimais e diferenciação em osteoblastos**

O modelo de diferenciação *in vitro* de CTMs em osteoblastos é clássico e de fácil reproduzibilidade para estudos de diferenciação celular.

Jaiswal e colaboradores (1997) desenvolveram um sistema-modelo de indução de diferenciação de CTMs humanas adultas em osteoblastos. O protocolo otimizado inclui meio de cultura (DMEM ou α-MEM) suplementado com indutores (dexametasona 100nM, β-gliceroftofato 10nM e ácido ascórbico 0,05nM).

Os glicocorticoides endógenos estão envolvidos no remodelamento e formação óssea. A dexametasona é um potente corticosteróide muito utilizado na avaliação de respostas celulares *in vitro*. O ácido ascórbico, essencial em culturas de células osteogênicas, age como cofator na hidroxilação de resíduos de lisina e prolina do colágeno, atuando ainda como promotor da síntese de matriz óssea (JAISWAL *et al.*, 1997).

Segundo Long (2001), a osteopoiese pode ser definida como o processo de desenvolvimento de células ósseas que geram osteoblastos a partir de células-tronco mesenquimais. O termo *osteogênese* deve ser reservado para a geração de matriz óssea mineralizada por osteoblastos maduros.

A indução da osteopoiese é observada pelo aparecimento de morfologia de osteoblastos (forma cubóide), pelo aumento na atividade de fosfatase alcalina e formação de matriz extracelular mineralizada (JAISWAL *et al.*, 1997).

Quatro estágios na maturação destas células são observados, de acordo com critérios morfológicos e histoquímicos: pré-osteoblasto, osteoblasto, osteócito e células de revestimento ósseo (AUBIN, 1998).

Segundo Long (2001), pode-se compartmentalizar de acordo com o estágio do desenvolvimento em: CTM, células osteoprogenitoras, pré-osteoblastos e osteoblastos. As osteoprogenitoras seriam células comprometidas com a linhagem óssea.

Osteoblastos são definidos como células pós-proliferativas, cuboides, fortemente positivas para fosfatase alcalina, que revestem a matriz óssea em regiões ativas de produção de matriz. Os osteoblastos podem ainda ser identificados pela capacidade de sintetizar macromoléculas fenótipo-específicas, como proteínas da matriz óssea, receptores de hormônios, citocinas e fatores de crescimento. O fenótipo de um osteoblasto maduro é definido pela habilidade de síntese de tecido mineralizado, conhecido como osso (AUBIN, 1998).

Aproximadamente 10-20% de osteoblastos são incorporados na matriz extracelular recém-formada fazendo parte do estágio maduro de diferenciação da linhagem osteoblástica, os osteócitos. Estes, são menores que os precursores, perdem muitas organelas citoplasmáticas e são considerados metabolicamente inativos (AUBIN, 1998).

Os ossos são responsáveis pelas funções de locomoção, suporte e proteção de órgãos vitais (encéfalo, medula espinhal, coração e pulmões), suporte da hematopoiese na medula óssea, reserva de minerais, especialmente cálcio, apoio para músculos, ligamentos e tendões.

A deposição óssea e a reabsorção, efetuados por, respectivamente, osteoblastos e osteoclastos, são processos dinâmicos que ocorrem continuadamente (COHEN, 2006).

A compreensão dos processos celulares e mecanismos moleculares da formação óssea requer a identificação de genes e proteínas envolvidos no comprometimento das CTMs, proliferação

de osteoprogenitores, diferenciação e mineralização (LONG, 2001; NAKASHIMA; CROMBRUGGHE, 2003).

A obtenção de osteoblastos funcionais a partir de células-tronco mesenquimais tem sido utilizada amplamente na engenharia de tecidos e terapia celular. Ohgushi e colaboradores (2004) desenvolveram um estudo envolvendo mais de 30 pacientes usando CTMs para reconstrução de ossos após excisão cirúrgica. As células foram extraídas da medula óssea e cultivadas sobre próteses de hidroxiapatita e fosfato tricálcio e então implantadas nos locais lesados.

Infusões intravenosas de CTM humanas expandidas *ex vivo* foram bem toleradas em pacientes voluntários e parecem ser seguras (DEANS; MOSELEY, 2000).

### **1.5. Abordagem proteômica**

Vários estudos têm demonstrado que a medula óssea (MO) é dos locais em que se encontram as células-tronco mesenquimais. De acordo com Baksh e colaboradores (2004), as células-tronco mesenquimais adultas expressam oito genes essenciais durante a diferenciação em condroblastos, osteoblastos e adipócitos. De acordo com os achados desses autores, 235 genes são comuns entre os processos de adipogênese e osteogênese, quando comparado com 3 genes comuns entre a condrogênese e osteogênese, e 10 genes comuns para adipogênese e condrogênese, sendo que os dois tipos celulares (adipócitos e osteoblastos) vieram de um mesmo precursor. Ou seja, os processos celulares e moleculares da diferenciação de CTMs foram elucidados em nível genômico (ÇELEBI et al. 2010).

Recentemente, foi relatado que proteínas são reguladas através de períodos específicos durante o processo de diferenciação das CTMs, podendo desempenhar um papel na diminuição do potencial de proliferação de CTMs de medula óssea de ratos durante os períodos de cultivo celular (ÇELEBI et al. 2009).

A possibilidade de diferenciação de CTMs-MO de ratos em condições de cultura, na ausência de estímulos, em outros tipos celulares é um processo lento e contínuo (ÇELEBI et al. 2009). Nesse contexto, a utilização da ferramenta proteômica na análise das proteínas que estão sendo expressas durante o processo de diferenciação das CTMs é praticamente ausente.

A espectrometria de massas é atualmente o método para identificação e para análise estrutural utilizado em estudos proteômicos, devido à sua alta sensibilidade e a capacidade de produzir informações estritamente com base em estrutura de proteínas e peptídeos. A proteína é identificada por correlação com sequências depositadas em banco de dados, utilizando-se de parâmetros restritivos, tais como grupo de massas de peptídeos e sequências de aminoácidos parciais ou totais obtidas de peptídeos que foram produzidos por proteólise limitada (GRAVES & HAYSTEAD, 2002).

Ye e colaboradores (2006) demonstraram os efeitos do indutor de cardiomiócitos, 5-azacitidina, em CTMs-MO de ratos, sendo que 9, entre as 34 proteínas identificadas pela análise por MALDI-TOF-MS, mostraram distinta regulação protéica depois do tratamento com o indutor. Estudos realizados por Sun e colaboradores (2006) mostraram mudanças no perfil proteômico durante a diferenciação de CTMs humanas no processo da osteogênese.

A abordagem “*shotgun proteomics*” (SP) comprehende a produção de uma mistura complexa de peptídeos, obtidos por tratamento enzimático com tripsina de proteínas extraídas a partir de células inteiras. A análise proteômica por SP é complementar ao método de separação de proteínas por gel bidimensional. O método de SP é extremamente útil para a identificação de classes de proteínas de difícil análise em gel bidimensional, dentre elas, as proteínas de membrana, proteínas com ponto isoelettrico muito alcalino e proteínas de alta massa molecular (FOURNIER et al., 2007).

Outra abordagem proteômica consiste na marcação isobárica (iTRAQ) para quantificação absoluta e relativa que se baseia na derivação de grupos amino primários de peptídeos obtidos após o processo de digestão. Esse método permite marcar peptídeos de diferentes amostras com diferentes isóbaros denominado iTRAQ (8 plex, m/z 113, 114, 115, 116, 117 e 118). Estas amostras são reagrupadas após a derivação química, separadas por nano-HPLC e, posteriormente, submetidas à análise em espectrometria de massas. Durante o processo de fragmentação dos íons peptídeos tripsínicos que foram marcados, ocorre a formação de íons repórteres de baixa massa (m/z 113, 114, 115, 116, 117 e 118) (*"low mass zoom"*) que são utilizados para a quantificação relativa da proteína nas diversas amostras em uma análise única, seguindo o princípio da diluição isotópica, como descrito por Shadforth e colaboradores (2005).

Os trabalhos na literatura, relacionando a diferenciação das CTMs em osteoblastos, são escassos, havendo a necessidade de uma análise minuciosa do perfil protéico dessas células para entendermos os aspectos biológicos referentes ao processo de diferenciação celular *in vitro* para a utilização das mesmas no auxílio dos biomateriais que são usados em processos ortopédicos.

## **OBJETIVOS**

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. *Objetivo geral*

- Investigar o perfil protéico, por análise proteômica, nas diversas fases da diferenciação osteoblástica (células indiferenciadas, pré-osteoblastos e osteoblastos) de células-tronco mesenquimais de medula óssea de ratos e humana, visando obter subsídios para a compreensão de eventos celulares e moleculares envolvidos no processo de diferenciação celular.

### 2.2. *Objetivos específicos*

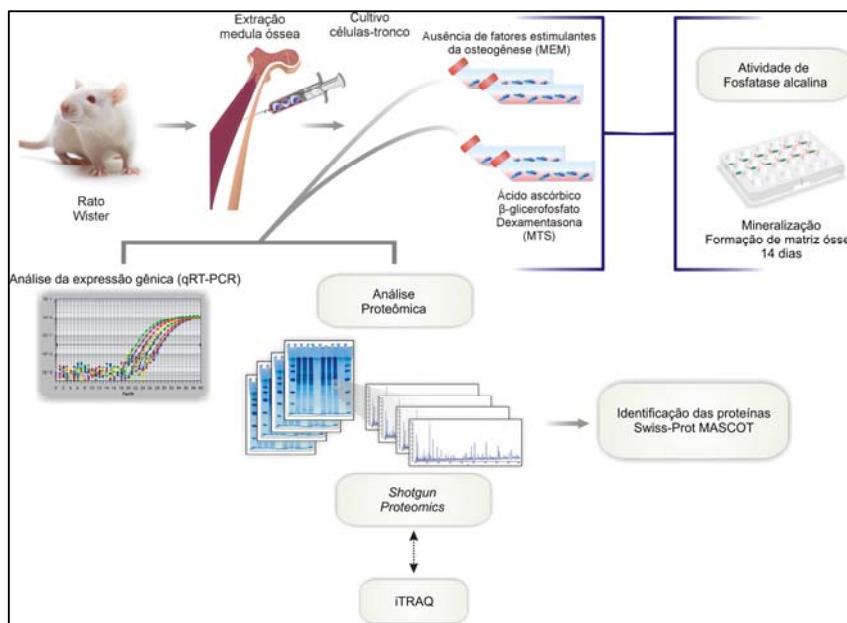
- Cultivo e caracterização morfológica e imunofenotípica de células-tronco mesenquimais de medula óssea de rato e humana em diferentes estágios de diferenciação osteoblástica durante 7, 14 e 21 dias após estímulos osteogênicos.
- Análise proteômica dos extratos de células mesenquimais de medula óssea de rato e humana em diferentes estágios de diferenciação osteoblástica pela combinação de eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS seguida de cromatografia de alta performance de fase reversa e identificação de proteínas por espectrometria de massas tipo MALDI-TOF/TOF.
- Quantificação relativa de proteínas nos diferentes extratos celulares utilizando a marcação com isóbaros e espectrometria de massas.
- Análise da expressão gênica de células-tronco mesenquimais de medula óssea de rato e humana quanto ao grau de diferenciação osteoblástica através de Real Time PCR.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Obtenção das células-tronco mesenquimais de medula óssea de rato

Células mesenquimais de medula óssea de rato foram obtidas e submetidas ao estudo genômico e proteômico segundo o delineamento experimental mostrado na figura 4.



**Figura 4. Delineamento experimental para estudo da diferenciação das células-tronco mesenquimais de medula óssea de rato.**

Células mesenquimais foram obtidas de fêmures de quatro ratos da espécie Wistar, sob aprovação prévia do Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Catanduva (Fundação Padre Albino) (ANEXO A). Estas células foram cultivadas em frascos de cultura de 75mm<sup>2</sup> em meio essencial mínimo, modificação alfa (Gibco-Life Technologies, EUA), suplementado com 15% de soro fetal bovino (Gibco), 50µg/mL de vancomicina (Acros Organics, Bélgica), 20µg/mL de ampicilina (USB Corporation, EUA) e 0,3µg/mL de fungisona (Gibco) durante cerca de 6-7 dias. Durante

todo o período, as células foram mantidas a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar atmosférico, sendo os meios trocados a cada 3 dias.

### ***3.2. Obtenção de células-tronco mesenquimais de medula óssea humana***

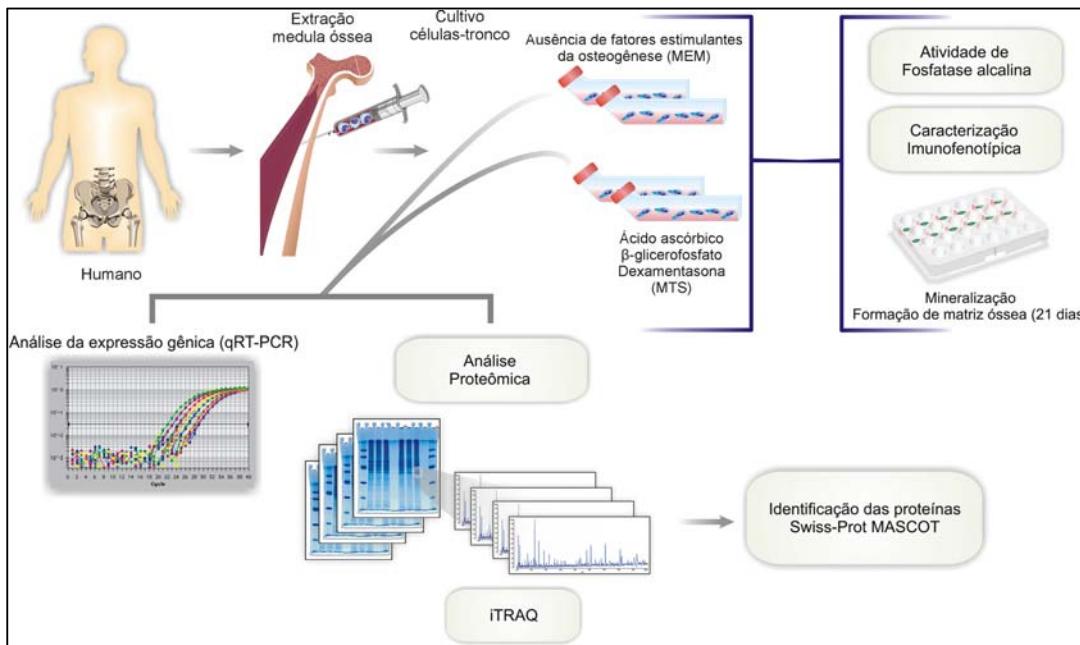
A figura 5 apresenta o delineamento experimental utilizado no presente trabalho para o estudo genômico e proteômico de células mesenquimais de medula óssea humana.

Células mesenquimais foram obtidas de descartes de pacientes, entre 20 a 25 anos, submetidos a cirurgias ortopédicas no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP), sob aprovação prévia do Comitê de Ética da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP-USP) (ANEXO B). Estas células foram cultivadas em frascos de cultura de 75mm<sup>2</sup> em meio essencial mínimo, modificação alfa (Gibco-Life Technologies, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco), 20µg/mL de ampicilina (USB Corporation, EUA) e 0,3µg/mL de fungisona (Gibco) durante cerca de 4-5 dias. Durante todo o período, as células foram mantidas a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar atmosférico, sendo os meios trocados a cada 3 dias.

#### ***3.2.1. Caracterização imunofenotípica das células-tronco mesenquimais humanas***

As células-tronco mesenquimais humanas foram caracterizadas por imunofenotipagem nos diferentes graus de diferenciação celular (pré-osteoblastos e osteoblastos) por citometria de fluxo com diferentes anticorpos monoclonais de moléculas de superfície celular (CD45, CD14, CD61, CD44, CD29, CD13, CD90, HLA classe

1, HLA classe 2, CD34, CD73, CD49e, CD105, caderina, CD54, CD31, CD106, CD166 e CD146 – BD Biosciences) conforme instruções do fabricante.



**Figura 5. Delineamento experimental para estudo da diferenciação das células-tronco mesenquimais de medula óssea humana.**

### 3.3. Padronização das condições de diferenciação osteoblástica

Ao final de 6-7 dias (para CTM de rato) ou 4-5 dias (para CTM humana), as células foram removidas dos frascos de cultura por lavagem com solução contendo EDTA 1mM (Gibco, EUA) e tripsina 0,25% (Gibco, EUA) e contadas em hemocitômetro. Células obtidas da cultura primária foram cultivadas em frascos de cultura de 25 mm<sup>2</sup> na ausência (MEM) ou na presença dos estimuladores da osteogênese (MTS): ácido ascórbico (Gibco) na concentração final de 5µg/mL, β-glicerofosfato 7mM (Sigma) e dexametasona 0,1µM (Sigma, EUA).

### **3.4. Caracterização da diferenciação osteoblástica**

#### **3.4.1. Determinação dos níveis enzimáticos de fosfatase alcalina**

As células foram caracterizadas aos 7, 10 e 14 dias, quanto ao grau de diferenciação celular (pré-osteoblastos e osteoblastos) pela determinação da atividade enzimática de fosfatase alcalina (ALP) (proteína presente nos estágios iniciais de diferenciação dos osteoblastos).

A atividade de ALP foi medida através da liberação de timolftaleína pela hidrólise do substrato timolftaleína monofosfato, utilizando kit comercial (Labtest Diagnóstica SA, MG, Brasil) de acordo com as instruções do fabricante. Foram utilizados tubos de ensaio denominados de branco, padrão e testes. Em todos os tubos foram adicionados 0,05 mL de substrato e 0,5 mL de tampão. No tubo padrão, foi acrescentado 0,05 mL da solução padrão. Os tubos foram mantidos a 37°C por 2 minutos. Em seguida, foi adicionado, em cada tubo teste, 0,05 mL do lisado de células (obtido pela incubação com lauril sulfato de sódio 0,1%) dos mesmos poços utilizados para medida da proteína total. Os tubos foram mantidos a 37°C por 10 minutos. Após esse período, foram adicionados em todos os tubos (branco, padrão e testes) 2mL do reagente de cor do kit comercial e, em seguida, a absorbância foi medida em espectrofotômetro (Cecil CE 3021 Cambridge, Reino Unido) em comprimento de onda de 590nm. A atividade de ALP foi expressa em  $\mu$ mol de timoftaleína/h/mL, sendo calculada a partir da medida do tubo padrão e normalizada pelo conteúdo de proteína total.

O conteúdo de proteína total foi determinado em 7, 10 e 14 dias de cultura, de acordo com o método descrito por Lowry e colaboradores (1951). Os poços das microplacas de cultura de células foram preenchidas com 2 mL de água deionizada.

Após 5 ciclos de choque térmico (temperatura alternada entre 15 min a 37°C e 20min a -20°C), 1 mL de cada amostra do poço foi misturado com 1 mL de solução de Lowry (Sigma) por 20 min a temperatura ambiente (TA). Após isto, 0,5 mL de reagente fenol de Folin e Ciocalteau (Sigma) foi adicionado a cada tubo e incubado por 30 minutos a TA. A absorbância foi medida utilizando um espectrofotômetro (Cecil CE 3021 Cambridge, Reino Unido) em 680nm. O conteúdo de proteína total foi calculado utilizando-se uma curva padrão de soroalbumina bovina e expresso em miligramas de proteínas/mL.

#### ***3.4.2. Análise da formação da matriz extracelular e mineralização por colorimetria***

##### ***utilizando “Alizarin red S”***

Ao final de 14 dias de cultura (para CTM de rato) e 21 dias (para CTM humana) em microplaca (densidade em torno de  $2,0 \times 10^4$  células/mL), o meio foi removido e os poços lavados três vezes com salina tamponada com fosfato (PBS, “phosphate buffered saline”) aquecida a 37°C e preenchidos com solução fixadora de glutaraldeído 3% em tampão fosfato (pH 7,3). Em seguida, os poços foram desidratados em série crescente de alcoóis (etanol 30%, 50%, 70% e absoluto), processados para coloração com *Alizarin red S* (ARS) a 2% (que cora em vermelho os nódulos de mineralização, ricos em cálcio) e as placas foram estocadas a -20°C. Para a captura das imagens, foi retirado o excesso de ARS, obtidas digitalmente com a câmera de alta resolução (Canon EOS Digital Rebel, 6.3 megapixels, com lente macro EF100 f/2.8).

### **3.4.3. Ensaio de proliferação celular**

A proliferação celular foi determinada nos períodos de 24 horas, 3, 7 e 10 dias de cultivo pelo ensaio colorimétrico MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio], Sigma). O MTT é um sal de cor amarela que é reduzido para cristais de formazan, de cor púrpura, por proteinases mitocondriais, ativas apenas em células viáveis (MOSMANN, 1983).

O ensaio foi realizado pela incubação das culturas primárias com MTT a 10% em meio de cultura, por 4 h a 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar atmosférico. Após esse período, as culturas foram lavadas com 1mL de PBS aquecido. Em seguida, foi adicionado 1mL de solução de isopropanol ácido (100mL de isopropanol e 134µL de HCl) em cada poço sob agitação por 5 min, para a solubilização completa do precipitado formado. Alíquotas de 100µL foram retiradas dos poços e transferidas para placa de 96 poços para medida colorimétrica em espectrofotômetro em 570–650 nm (µQuanti, Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, VT, EUA). Os dados da proliferação celular foram expressos em densidade óptica (DO).

## **3.5. Análise da expressão gênica dos marcadores da diferenciação osteoblástica**

### **3.5.1. Extração de RNA total**

A extração do RNA total foi realizada nos períodos 7, 10 e 14 dias (para CTM de rato) e 7 e 14 dias (para CTM humana) utilizando o reagente Trizol (Invitrogen™, Carlsbad, CA, EUA) e kit para extração (Promega, Madison, WI, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Inicialmente, as células foram tripsinizadas e centrifugadas em tubos de 50 mL. O *pellet* de cada amostra foi transferido para um tubo tipo *eppendorf*,

no qual foi adicionado o reagente Trizol (1 mL) e mantido a temperatura ambiente por 15 minutos. Para 1 mL da suspensão foram adicionados 200 $\mu$ L de clorofórmio (Sigma) e os tubos centrifugados a 12000 $\times$ g por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo, onde foi acrescentado etanol 70% (v/v). A solução amostra/etanol foi delicadamente agitada e transferida para uma coluna de afinidade a RNA. Foram adicionados tampões específicos, intercalados por centrifugações de 15 segundos a 8000 $\times$ g. Após os processos de lavagens com diferentes tampões, as amostras de RNA foram eluídas da coluna com 23 $\mu$ L de água deionizada e tratada com dietilpirocarbonato (DEPC, Acros Organics), livre de RNase, sendo armazenada a -70°C até a construção do DNA complementar (cDNA). Para o preparo da água, adicionou-se 1 mL de DEPC (Acros Organics) em 999 mL de água deionizada, sendo esta mistura incubada por 24 horas e autoclavada por 30 minutos a 120 mmHg.

### ***3.5.2. Quantificação de RNA***

Para a quantificação de RNA total das amostras, uma alíquota de 3 $\mu$ L foi diluída em 300 $\mu$ L de água previamente tratada com DEPC (Acros Organics) e analisada por espectrofotometria utilizando o aparelho Biomate 3 spectrophotometer Thermospectronic (Rochester, NY, EUA). A leitura foi realizada nos comprimentos de onda de 230, 260, 280 e 320 nm, para estimativa da concentração de RNA/ $\mu$ L nas amostras e contaminação por interferentes (fenol e proteínas).

### 3.5.3. Construção do cDNA

O cDNA foi sintetizado a partir de 2 µg de RNA total, através da reação de transcrição reversa, com a utilização do kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems). A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi realizada utilizando a enzima *Taq polimerase* (Gibco) no termociclador Mastercycle Gradient (Eppendorf, Hamburg, Alemanha), nas seguintes condições: (a) trinta ciclos de 1 minuto a 94°C, (b) 1 minuto a 42°C e (c) 2 minutos a 72°C, acrescido de um passo de extensão final de 7 minutos a 72°C.

### 3.5.4. Análise da diferenciação osteoblástica por PCR em tempo real (Real-time PCR)

Para a reação de PCR em tempo real, foram utilizadas sondas SYBER Green® (Invitrogen), sendo as reações feitas em aparelho CFX96TM (BioRad Laboratories, Inc.). As reações foram realizadas em quadruplicata, com volume final de 15µL e quantidade de cDNA correspondente a 12,5 ng do RNA inicial. A reação de amplificação foi composta por: a) 50°C por 2 min; b) 95°C por 10 min e, c) 40 ciclos a 95°C por 15 s e 60°C por 1 min (desnaturação e extensão). Os resultados foram analisados com base no valor de Ct (*cycle threshold* ou ciclo limiar), sendo esse o ponto correspondente ao número de ciclos em que a amplificação das amostras atinge um limiar (determinado entre o nível de fluorescência dos controles negativos e a fase de amplificação exponencial das amostras), permitindo a análise quantitativa da expressão do fator avaliado.

No caso das células mesenquimais de medula óssea de rato foi analisada a expressão de mRNA para os seguintes genes: RUNX2 (fator de transcrição relacionado ao runt 2); OC (osteocalcina); OSTERIX (fator de transcrição dedo de zinco); ALP

(fosfatase alcalina); BSP (sialoproteína óssea); MSX2 (Msh homeobox 2). Como controle endógeno, foi utilizada a expressão de GADPH (gliceraldeído 3-fosfato), gene constitutivo.

No caso das células mesenquimais de medula óssea humana foram analisados os seguintes genes: RUNX2 (fator de transcrição relacionado ao runt 2); COL I (colágeno tipo 1); ALP (fosfatase alcalina); BSP (sialoproteína óssea); OP (osteopontina); OC (osteocalcina); RANK-L (ativador do receptor do fator ligante nuclear kappa B). Como controle endógeno, foi utilizado a expressão de ACTIN ( $\beta$ -actina), gene constitutivo.

Os valores de Ct do controle endógeno foram aplicados para a normalização dos níveis de expressão do gene alvo. Uma amostra negativa (água) foi submetida à reação com cada par das sequências dos *primers* utilizados. O método comparativo de  $2^{-ddCt}$  foi utilizado para comparar a expressão de mRNA das culturas com ausência de fatores estimuladores da osteogênese (MEM) e na presença dos mesmos (MTS), nas diferentes condições experimentais. As sequências dos *primers* utilizados estão descritos na Tabela 1 (para CTM de rato) e Tabela 2 (para CTM humana).

**Tabela 1 – Primers utilizados para a reação de *Real time PCR* para amostras de células-tronco de medula óssea de rato.**

Gene Alvo*	Sequência dos primers	T.A. (°C)	T.D. (°C)	bp
GAPDH	AAATGCTTCTAGGCGGACTG GGTTTGTCAGAACAGAAAGGGTG	58	78	60
RUNX2	CACAAACAACCACAGAACAC TTGCTGTCCCTGGAGAAA	56	77	137
OC	GCAGACACCATGAGGACCT CCGGAGTCTATTCAACCACCTACTG	61	83	153
OSTERIX	CAAGAGTCGGATTCTAGGATTGGAT CAAACTTGCTGCAGGCTGCT	62	84	208
ALP	CCAACTCATTGTGCCAGAG CAGGGCATTTCAGGTCTC	57	74	75
BSP	CTACTTTATCCTCCTTGAAACGGTT GCTAGCGGTTACCCCTGAGA	59	81	202
MSX2	GAAACAGTACCTCTCCATCGCAGAG TTTGGCAGCCATTTCAGCT	59	81	151

\*GADPH – gliceraldeído 3-fosfato; ALP – fosfatase alcalina; OC - osteocalcina; RUNX2 – fator de transcrição relacionado ao runt 2; OSTERIX – fator de transcrição dedo de zinco; BSP – sialoproteína óssea; MSX2 - Msh homeobox 2. T.A. – temperatura de anelamento; T.D. – temperatura de dissociação; bp – pares de base.

**Tabela 2 – Primers utilizados para a reação de *Real time PCR* para amostras de células-tronco de medula óssea humana.**

Gene Alvo*	Sequência dos primers	T.A. (°C)	T.D. (°C)	bp
ACTIN	ATGTTGAGACCTCAACA CACGTCAGACTCATGATGG	56	75	495
RUNX2	TATGGCACTCGTCAGGATCC AATAGCGTGCTGCCATTG	61	83	110
COL I	TGACGAGACCAAGAACTG CCATCCAAACCACTGAAACC	61	84	114
OP	AGACACATATGATGGCCGAGG GGCCTTGATGCACCATTCAA	58	79	154
ALP	ACGTGGCTAAGAACATGTCATC CTGGTAGGCGATGTCCTTA	60	86	475
BSP	AATCTGTGCCACTCACTGCCTT CCTCTATTTGACTCTCGATGCAA	58	79	201
OC	CAAAGGTGCAGCCTTGTGTC TCACAGTCCGGATTGAGCTCA	62	85	150
RANK-L	CAGCCTTGCTCATCTCACT TTATGGGAACCAGATGGGAT	60	85	112

\*ACTIN – β-actina; RUNX2 – fator de transcrição relacionado ao runt 2; COL I – colágeno tipo 1; ALP – fosfatase alcalina; BSP – sialoproteína óssea; OP - osteopontina; OC - osteocalcina; RANK-L - ativador do receptor do fator ligante nuclear kappa B. T.A. – temperatura de anelamento; T.D. – temperatura de dissociação; bp – pares de base.

### **3.6. Análise proteômica**

#### **3.6.1. Obtenção dos extratos protéicos de células-tronco mesenquimais de medula óssea de rato**

Para a obtenção do extrato protéico, durante as fases de diferenciação osteoblástica (7 e 14 dias), as células (aproximadamente  $1,5 \times 10^6$  células) foram submetidas à lise em 150 $\mu$ L de tampão de lise de eletroforese contendo 2,2 M tioúreia, 8M uréia, 4% CHAPS e, posteriormente, realizado o processo de sonicação. As proteínas extraídas foram quantificadas pelo método colorimétrico de Bradford (1976), utilizando soroalbumina bovina como padrão).

#### **3.6.2. Caracterização de proteínas por “shotgun proteomics”**

“Shotgun proteomics” (SP), em seu sentido mais amplo, compreende a produção de uma mistura complexa de peptídeos por tratamento enzimático com tripsina de proteínas solubilizadas por detergentes a partir de células inteiras, seguida da combinação de cromatografia líquida de troca iônica e fase reversa e análise das frações por espectrometria de massas. No presente trabalho, adotamos a eletroforese unidimensional (1D), seguida de cromatografia líquida de fase reversa e análise “off-line” do eluato por espectrometria de massas tipo MALDI-TOF/TOF.

Os extratos protéicos extraídos das amostras de células obtidas durante as fases de diferenciação osteoblástica foram submetidos à eletroforese vertical (GE Healthcare) (LAEMMLI, 1970) utilizando mini-géis (10x10,5cm) de poliacrilamida a 12,5% homogêneo na presença de dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE). As condições de corrida utilizadas foram: máximo de 300 V, 12 mA constante por gel. Foram aplicados 25 $\mu$ g de

proteínas de cada amostra em cada poço do gel. Após a corrida eletroforética, o gel foi fixado em etanol, ácido acético e água (40:10:50, v/v) por 1 hora e corado com solução de Coomassie Blue Coloidal (NEUHOFF *et al.*, 1988). Para a obtenção da imagem do gel foi utilizado o scanner ImageScanner (Pharmacia Biotech) através do software MagicScan (GE-Healthcare). O gel foi dividido em bandas que foram recortadas posteriormente. Cada banda foi subdividida em 5 partes para garantir uma digestão eficiente por tripsina.

Para a digestão com tripsina, as bandas foram lavadas com solução de bicarbonato de amônio 50 mM e acetonitrila 50% (v/v) para a remoção de SDS e corante, sendo em seguida adicionado acetronitrila. As bandas completamente secas em SpeedVac foram reidratadas com uma solução contendo 0,5µg de tripsina (Promega, Madison, EUA) em solução de bicarbonato de amônio 50mM. A reação foi mantida a 37°C por 24 horas e interrompida pela adição de 5µL de ácido fórmico. Foram adicionados 100µL de solução contendo 50% de acetonitrila e 5% de ácido fórmico para completa extração dos peptídeos, seguidos de coleta em único tubo e de secagem completa em SpeedVac. Após a digestão, as bandas que apresentavam duplidade foram reunidas em um único tubo ( $a+b=A$ ,  $c+d=B$ ). Os peptídeos tripsínicos das amostras foram extraídos e dessalinizados em “micro-tips” contendo resina de fase reversa (POROS R2, Perseptive Biosystems, USA).

As amostras foram ressuspensas em 5µL de acetonitrila pura e submetidas a vórtex. Posteriormente, foram adicionados 100µL de ácido fórmico 0,1%. As amostras foram centrifugadas a 12000rpm por 3 minutos e submetidas à cromatografia de fase reversa utilizando um sistema nano-HPLC (Shimadzu) equipado com uma coluna

monolítica GL Science (100mm×100μm diâmetro interno). A cromatografia foi desenvolvida com fluxo de 0,4 μL/min, com um gradiente linear de 5% a 95% de solvente B. Solvente A foi ácido fórmico a 0,1% em água e o solvente B 95% de acetonitrila em solução de ácido fórmico a 0,1%. As frações foram coletadas automaticamente em sistema AccuSpot Axima (Shimadzu), diretamente em placa de MALDI, em um volume de 0,4μL por fração (1 minuto).

Após separação cromatográfica das bandas, cada fração coletada na placa de MALDI foi recoberta com 1μL de ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico (10mg/mL). A placa foi deixada a temperatura ambiente para cristalização completa da matriz. Depois foi analisada por espectrometria de massas MALDI-TOF-TOF (espectrômetro Axima Performance – Kratos-Shimadzu, Manchester, UK). Os espectros de massas obtidos mediram a massa por carga do(s) íon(s) precursores e de seus íons obtidos por fragmentação por colisão induzida (CID-MS/MS) por gás inerte (hélio) e uma energia de colisão fixa de 20 keV.

Os espectros de massa obtidos foram submetidos automaticamente ao programa MASCOT versão 2.2.04 e pesquisados contra o banco de dados de proteínas SwissProt 57.2.fasta (contendo 466.739 sequências). Os seguintes parâmetros foram considerados: digestão por tripsina, 1 falha de clivagem permitida, tolerância de massa molecular do íon precursor de 0,5 Da e 0,8 para os íons fragmentos, modificação fixa por carboxiamidometilação de cisteínas e modificação variável por oxidação de metionina. Somente foram considerados os dados estatisticamente significantes obtidos pelo programa MASCOT ( $p \leq 0,05$ ) com escore mínimo de 30 para cada peptídeo. As proteínas identificadas pela estratégia de SP foram aceitas como identificações positivas, no

mínimo, com 2 peptídeos com escores acima de 30 ou com 1 peptídeo, quando o escore foi maior que 40. Nesta última situação o peptídeo foi inspecionado manualmente para que tivesse mais de 60% de cobertura da sequência em aminoácidos.

### **3.6.3. Marcação isobárica para quantificação absoluta e relativa - iTRAQ**

Os extratos protéicos das células-tronco mesenquimais obtidas durante as fases de diferenciação osteoblástica foram separados por SDS-PAGE, conforme descrito na seção 3.6.1. Cada poço do gel foi carregado com 30 µg de proteínas de cada amostra.

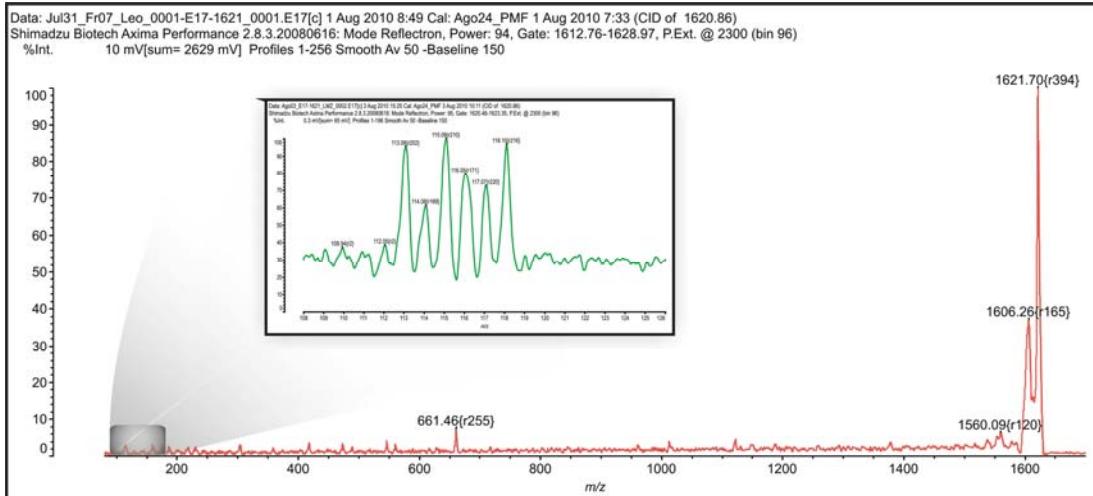
Para a digestão com tripsina, as bandas selecionadas foram lavadas com solução de acetronitrila 50% e água milli-Q 50% para a remoção de SDS e corante, sendo, em seguida, adicionados 100µL de acetronitrila pura para desidratar a banda de gel. As bandas completamente secas em SpeedVac foram reidratadas com uma solução contendo 0,5µg de tripsina (Promega, Madison, EUA) em solução de trietilamônio bicarbonato (TEAB) 0,1 M. A reação foi mantida a 37°C por 24 horas. Para a completa extração dos peptídeos foram adicionados 100µL de solução contendo 50% de acetonitrila e 5% de ácido fórmico, seguido de transferência do solvente para um único tubo e de secagem completa em SpeedVac.

Após a digestão, as bandas que correspondiam às diferentes fases de diferenciação em osteogênese foram ressuspensas em 50µL da solução de TEAB 0,1M e isopropanol 60%. Foi utilizado o reagente iTRAQ 8-plex (Applied Biosystems) sendo utilizados os isóbaros: (A) 113 - MEM 7 dias, (B) 114 - MTS 7dias, (C) 115 - controle interno 1, (D) 116 - MEM 14 dias, (E) 117 - MTS 14 dias e (F) 118 – controle interno 2. Os controles correspondem à metade da massa aplicada de cada amostra, representando os períodos de 7 e 14 dias. Os isóbaros foram ressuspensos de acordo com o

protocolo do fabricante. Foram adicionado 8 $\mu$ L de cada isóbaro nas respectivas amostras e a mistura incubada por 2 horas em 60 $\mu$ L de tampão TEAB 0,1M pH>8 contendo 60% isopropanol. Ao final da reação, as amostras foram transferidas para um único tubo em volume fixo de 40 $\mu$ L e secas em SpeedVac. As amostras foram ressuspensas em 5 $\mu$ L de acetonitrila pura e submetidas ao vórtex como descrito na seção 3.6.2 e, em seguida, pipetadas manualmente em placas de MALDI, cobertas com ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico (10mg/mL) e submetidas à espectrometria de massas MALDI-TOF/TOF, no modo automático.

Após inspeção visual dos espectros, aqueles que indicaram a marcação dos isóbaros na região de baixa massa, foram re-analisados manualmente. Para cada espectro foi realizado o procedimento “*low mass zoom*”, ou seja, foram determinados os valores de intensidade (keV), ou Apex, que correspondiam às intensidade dos íons de baixa massa detectados (determinação dos íons repórteres 113, 114, 115, 116, 117 e 118). A figura 6 mostra um exemplo da marcação com iTRAQ do peptídeo da proteína

#### *Ras-related protein Rab-1A.*



**Figura 6.** Exemplo de espectro de massa de peptídeo obtidos por em uma fração de nano-HPLC em que a fragmentação do íon  $m/z$  1620.86 [ $M+H^+$ ] por CID-MS/MS para a visualização da marcação com

**iTRAQ. (Fração 7, SDS-PAGE).** A proteína *Ras-related protein Rab-1A* foi identificada utilizando o software MASCOT contra o banco de dados Swiss Prot versão 57.2.fasta.

## **RESULTADOS**

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Imunofenotipagem de células mesenquimais obtidas de medula óssea humana

A medula óssea humana contém três tipos de células progenitoras: a) hematopoiéticas, b) endoteliais e c) mesenquimais. Fenotipicamente, células progenitoras mesenquimais expressam os marcadores de superfície CD13, CD29, CD105, CD73, CD90 e CD166. Por outro lado, não expressam os marcadores CD34, CD45 (células progenitoras hematopoiéticas), CD14 (monócitos), CD31, caderina 5, CD54, CD106 e CD51/61 (células endoteliais) (COVAS *et al.*, 2005; MARTINEZ *et al.*, 2007). Assim, este experimento foi realizado para garantir que estávamos cultivando CTM humanas.

Células mesenquimais provenientes de: a) dois doadores de medula óssea humana (21 e 26 anos, feminino) foram cultivadas por 14 dias (cultura primária) em meio de cultura sem fatores estimuladores da osteogênese (MEM); b) três doadores de medula óssea humana (37 e 45 anos, masculino e 21 anos, feminino) foram cultivadas por 14 dias em meio de cultura com fatores estimuladores da osteogênese (MTS).

Após este período, as células foram removidas por tripsinização e cultivadas a uma densidade de  $1,4 \times 10^5$  células por garrafa ( $75 \text{ mm}^2$ ) de cultura celular, durante 7 dias (células de primeira passagem), em MEM e MTS. A imunofenotipagem celular foi obtida por citometria de fluxo (FACSCalibur, BD Biosciences, EUA) após a incubação das mesmas com diferentes anticorpos monoclonais de moléculas de superfície celular (CD45, CD14, CD51, CD61, CD44, CD29, CD13, CD90, HLA classe 1, HLA classe 2, CD34, CD73, CD49e, CD105, caderina, CD54, CD31, CD106, CD166, CD146 – BD Biosciences), conforme instruções do fabricante. Os anticorpos utilizados foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas sendo a citometria de fluxo realizada na Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto.

Os resultados obtidos indicaram que células obtidas a partir de medula óssea humana, cultivadas em meio de cultura com e sem fatores estimuladores da osteogênese, apresentam marcadores de superfície expressos por células mesenquimais (Tabela 3).

Na primeira imunofenotipagem de células mesenquimais utilizamos vários anticorpos para marcação das moléculas de superfície. As demais análises foram realizadas utilizando apenas os anticorpos CD105, CD14, CD13, CD31, CD34, CD44, CD45, CD54, CD73 e CD90. Nós optamos por este procedimento, porque a análise por citometria de fluxo exige um número elevado de células e, muitas vezes, a quantidade de células obtida por experimento foi menor que o considerado satisfatório para a realização das marcações.

**Tabela 3.** Características imunofenotípicas de células mesenquimais obtidas de medula óssea humana cultivadas em meios de cultura sem fatores estimuladores da osteogênese (MEM) e com fatores estimuladores da osteogênese (MTS) com pacientes entre 21 a 45 anos.

Marcador de Superfície	Cultura Primária (%)						MEM (%)	MTS (%)		
Caderina 5	1,34	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CD105	96,56	92,32	95,3	-	72,85	93,64	90,25	91,88	-	73,73
CD106	3,88	-	-	-	-	0,25	-	-	-	-
CD13	95,31	95,2	86,9	93,82	93,06	98,49	92,84	95,65	99,32	90,66
CD14	0,36	1,58	3,4	1,13	1,47	0,32	0,8	0	0,15	0,81
CD146	82,41	-	-	-	-	70,3	-	-	-	-
CD166	94,25	-	-	-	-	91,43	-	-	-	-
CD29	94,74	-	-	-	-	94,32	-	-	-	-
CD31	0,57	0,05	3,6	0	0	0,002	0,28	0,15	0,55	0,12
CD34	6,58	1	0,9	0,17	0,54	0,59	0,75	3,19	0,34	0,13
CD44	88,73	64,05	35,94	35,94	25,35	71,79	3,69	51,95	51,95	1,97
CD45	0,4	0,82	9	0,69	0,7	0,105	0,57	0,07	0,14	0,32
CD49e	93,19	-	-	-	-	87,64	-	-	-	-
CD51/61	37,57	-	-	-	-	2,515	-	-	-	-
CD54	37,34	43,59	5,8	32,56	25,55	5,9	12,81	33,75	37,98	56,38
CD73	95,82	92,48	73,1	89,09	77	94,53	90,14	92,55	96,31	74,35
CD90	98,54	94,78	62,2	87,76	77,26	96,42	92,41	97,51	94,64	65,08
HLA-classe I	91,82	-	-	-	-	73,83	-	-	-	-
HLA-DR	0,67	-	-	-	-	0,12	-	-	-	-

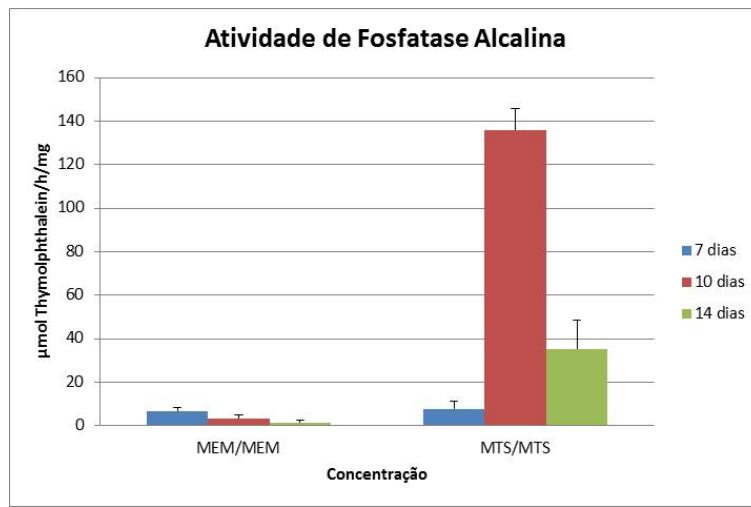
## 4.2. Caracterização da diferenciação osteoblástica

### 4.2.1. Atividade de fosfatase alcalina

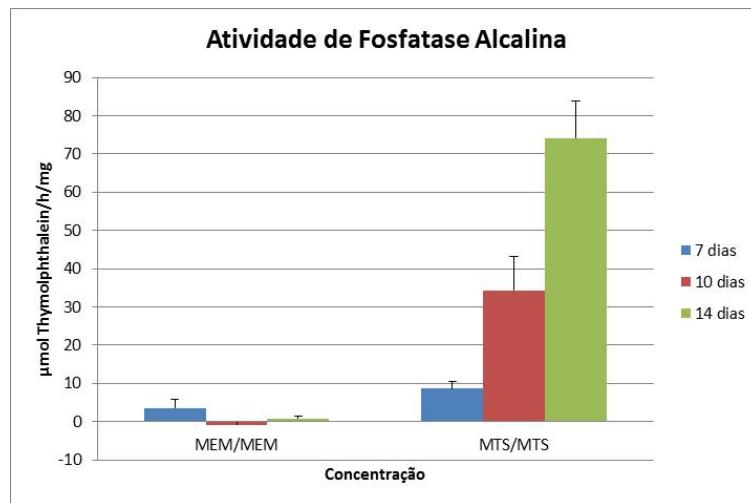
A enzima fosfatase alcalina é considerada um marcador bioquímico do metabolismo ósseo, relacionado à formação ou à reabsorção óssea. Como a formação é dependente da ação dos osteoblastos, os marcadores de formação (fosfatase alcalina), na realidade, medem os produtos decorrentes da ação destas células. Os marcadores de formação são todos frutos da síntese osteoblástica. A fosfatase alcalina óssea é uma glicoproteína específica encontrada na superfície dos osteoblastos. Sua função ainda não está de todo elucidada, porém seu papel na mineralização do tecido ósseo está confirmado (TANIMURA *et al.*, 1983). A figura 6 mostra os níveis de atividade de ALP, expressa em  $\mu\text{mol}$  de timoftaleína/h/mL, das células-tronco mesenquimais de medula óssea de rato cultivadas em meio essencial mínimo (MEM) e em meio de cultura suplementado com os fatores estimuladores de osteogênese (MTS), nos diferentes tempos de cultivo.

Foi possível observar o aumento dos níveis de ALP nas células cultivadas em MTS, nos dois tipos de CTMs (rato e humana) por 7 e 14 dias, quando comparadas aquelas cultivadas em MEM. A atividade de ALP foi maior aos 10 dias nas CTM de rato (Figura 7), diferentemente da humana (Figura 8), que foi maior aos 14 dias de cultivo.

Os níveis de atividade de fosfatase alcalina foram elevados nas células mesenquimais cultivadas em MTS em todos períodos estudados, quando comparadas aquelas cultivadas em MEM.



**Figura 7.** Atividade da fosfatase alcalina de células osteogênicas derivadas da medula óssea de ratos Wistar cultivadas durante o período de 7, 10 e 14 dias. Desvio padrão – MEM (7 dias: 1,4978; 10 dias: 1,6915; 14 dias: 1,1068) e MTS (7 dias: 3,2634; 10 dias: 9,9566; 14 dias: 13,1430). Os dados são reportados como média  $\pm$  desvio padrão ( $n=4$ ).



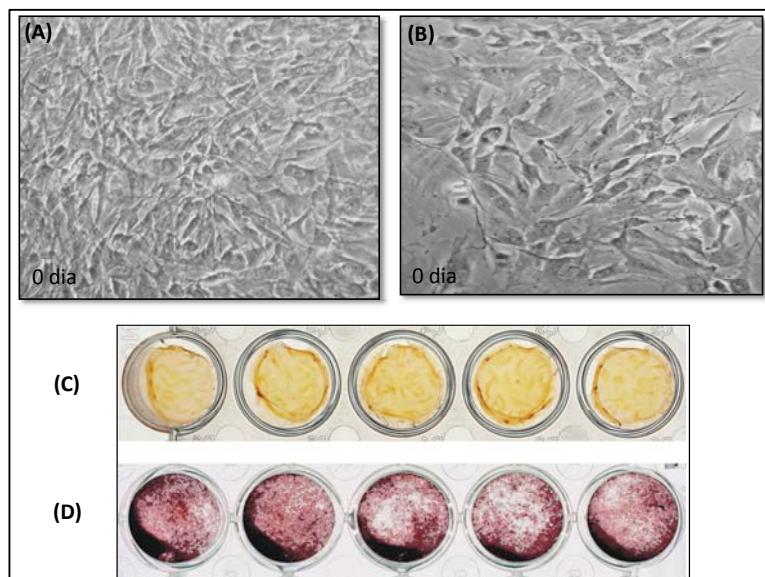
**Figura 8.** Atividade da fosfatase alcalina de células osteogênicas derivadas da medula óssea humana cultivadas durante o período de 7, 10 e 14 dias. Desvio padrão – MEM (7 dias: 2,2545; 10 dias: 0,9862; 14 dias: 0,7623) e MTS (7 dias: 1,7540; 10 dias: 9,0064; 14 dias: 9,6961). Os dados são reportados como média  $\pm$  desvio padrão ( $n = 3$ ).

#### 4.2.2. Avaliação do processo de calcificação

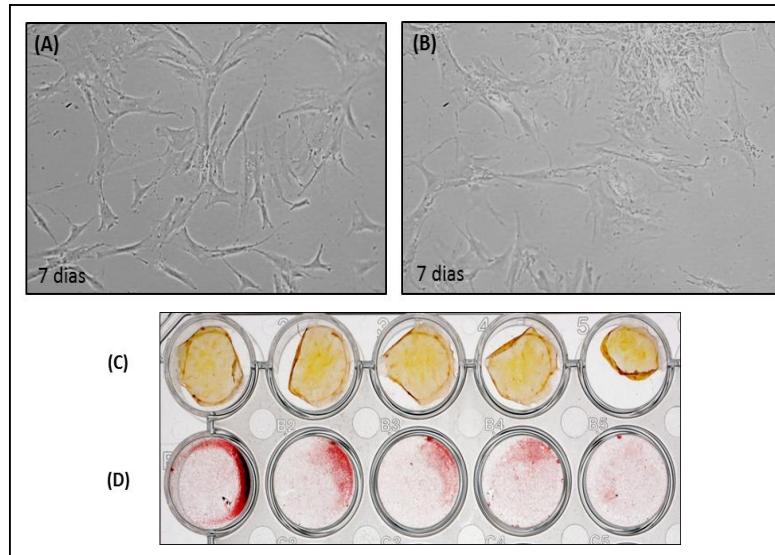
A ossificação endocondral é o mecanismo pelo qual o esqueleto cartilaginoso é substituído por osso e seguido por subsequente crescimento longitudinal. Esse é o modelo utilizado na formação dos ossos em vertebrados superiores (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1992; HALL e MIYAKE, 1992). O processo de calcificação ocorre em sítios conhecidos como matriz vesicular, presentes nas lacunas mineralizantes da cartilagem. Acredita-se que eles acumulem cálcio e fosfato inorgânico que servem como agentes na formação de hidroxiapatita (principal componente inorgânico do osso) (ANDERSON, 1969; WU *et al.*, 1995).

O processo de mineralização pode ser avaliado por uma série de métodos histoquímicos, incluindo calceína fluorescente ligante (HALLE *et al.*, 2000), Von Kossa (ANSELME *et. al.*, 2002) e incorporação de “*Alizarin red S*” (ARS) (PUTCHLER *et. al.*, 1969; STANFORD *et. al.*, 1995). Tanto Von Kossa e coloração ARS permitem avaliação simultânea da distribuição de mineralização e das estruturas por microscopia de contraste de fase. A coloração ARS é particularmente versátil na medida em que o corante pode ser extraído a partir das monocamadas coradas e facilmente dosado. Essa técnica possibilitou, no presente trabalho, a determinação da mineralização das CTMs de rato que foram submetidas ao cultivo com os fatores de diferenciação osteogênica no período de 14 dias (Figura 9). A uma média de absorvância em 405nm foi de 0,0004 (células cultivadas em MEM) e 0,559 (células cultivadas em MTS).

Como descrito na seção 3.4.2 a coloração ARS que nós verificássemos a presença de mineralização das CTMs humana que foram submetidas ao cultivo com os fatores de diferenciação osteogênico no período de 21 dias (Figura 10).



**Figura 9. Processo de mineralização das células osteogênicas derivadas da medula óssea de ratos Wistar cultivadas durante 14 dias.** Microscopia de contraste de fase: (A) células cultivadas em MEM 15%; (B) células cultivadas em MTS 15%. Coloração pelo método *Alizarin red S*: (C) cultura de células mesenquimais com ausência de estímulos de diferenciação osteogênica (MEM 15%); (D) cultura de células mesenquimais na presença de estímulos para a osteogênese (MTS 15%).

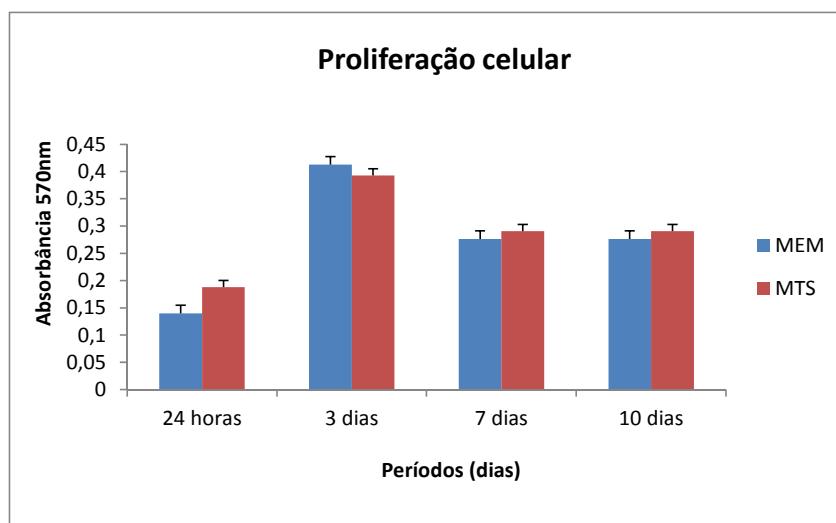


**Figura 10. Processo de mineralização das células osteogênicas derivadas da medula óssea humana cultivadas durante 21 dias.** Microscopia de contraste de fase: (A) células cultivadas em MEM 10%; (B) células cultivadas em MTS 10%. Coloração pelo método de *Alizarin red S*: (C) cultura de células mesenquimais com ausência de estímulos de diferenciação osteogênica (MEM 10%); (D) cultura de células mesenquimais na presença de estímulos para a osteogênese (MTS 10%).

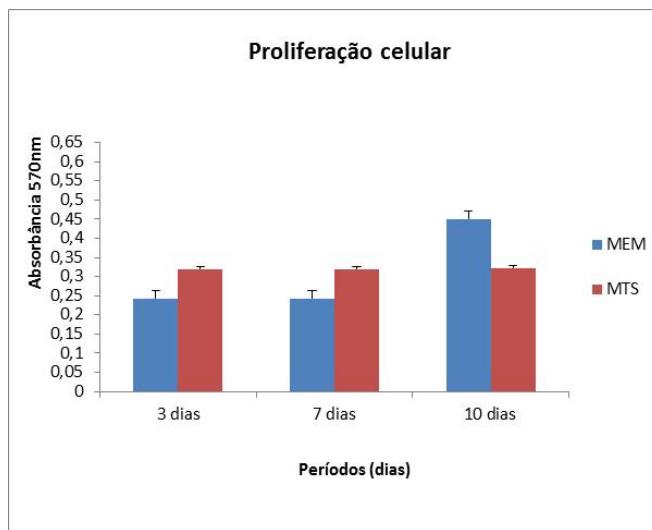
#### 4.2.3. Proliferação celular

No ensaio colorimétrico com MTT não foi possível observar diferenças significantes na proliferação celular das culturas crescidas na ausência (MEM) e na presença (MTS) de estímulos à diferenciação osteogênica, exceto no período de 24 horas (Figura 11).

Assim como descrito na seção 3.4.3 podemos observar que no período de 10 dias as células crescidas com ausência de estímulos (MEM) tiveram maior proliferação celular do que as células crescidas na presença de estímulos à diferenciação osteogênica (MTS) (Figura 12).



**Figura 11.** Viabilidade celular (média±desvio padrão, em densidade óptica) de culturas de células-tronco mesenquimais na ausência (MEM) e na presença (MTS) de estímulos para a diferenciação osteogênica nos períodos de 24 horas, 3, 7 e 10 dias, determinada pelo ensaio colorimétrico MTT.

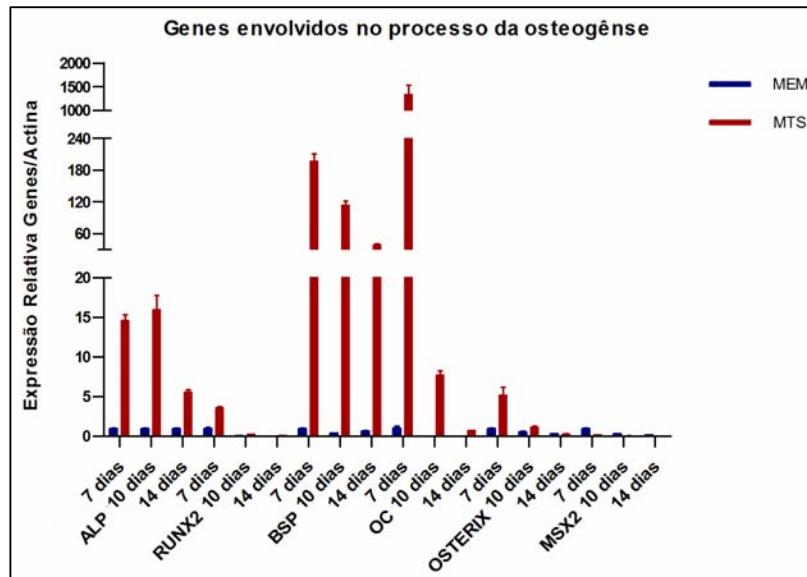


**Figura 12.** Viabilidade celular (média ± desvio padrão, em densidade óptica) de culturas de células-tronco mesenquimais na ausência (MEM) e na presença (MTS) de estímulos para a diferenciação osteogênica nos períodos de 3, 7 e 10 dias, determinada pelo ensaio colorimétrico MTT.

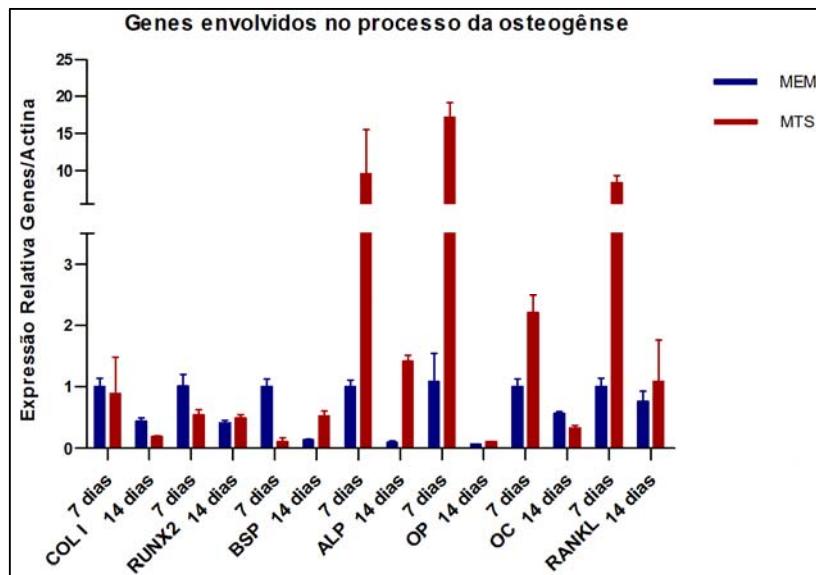
#### 4.3. Análise da expressão gênica durante a diferenciação osteoblástica

Em 7 dias, o ensaio de PCR em tempo real mostrou diferenças em nível de expressão de ALP, RUNX2, BSP, OC e OSTERIX ( $p<0,01$  para cada marcador na Figura 13). Entretanto, o nível de expressão de MSX2 mostrou um decréscimo durante os períodos e o nível de expressão de ALP e BSP foi maior durante os três períodos em comparação à expressão dos mesmos nas células com ausência de estímulos osteogênicos (MEM).

Em 7 dias, o ensaio de PCR em tempo real mostrou altos níveis de expressão de ALP, OP, OC e RANKL ( $p<0,01$  para cada marcador na Figura 14) nas células que foram estimuladas para a diferenciação osteogênica (MTS). No período de 14 dias foi possível observar elevado nível de expressão de ALP (Figura 17). Entretanto os níveis de expressão de COL I, RUNX2 e BSP, em 7 dias, mostram mais elevados nas células cultivadas com ausência de estímulo para diferenciação (MEM).



**Figura 13.** Análise da expressão gênica dos marcadores de diferenciação osteoblástica ALP, RUNX2, BSP, OC, OSTERIX e MSX2 em culturas com ausência (MEM) e na presença (MTS) de estímulos para a diferenciação osteogênica nos períodos de 7, 10 e 14 dias. Os valores foram normalizados pelo gene constitutivo GAPDH e calibrados pelos valores obtidos para o grupo MEM.



**Figura 14.** Análise da expressão gênica dos marcadores de diferenciação osteoblástica COL I, RUNX2, BSP, ALP, OP, OC e RANKL em culturas com ausência (MEM) e presença (MTS) de estímulos de diferenciação osteogênica nos períodos 7 e 14 dias. Os valores foram normalizados pelo gene constitutivo ACTIN ( $\beta$ -actina) e calibrados pelos valores obtidos para o grupo MEM.

#### **4.4. Análise proteômica de células mesenquimais de medula óssea de rato em diversas fases de diferenciação osteoblástica**

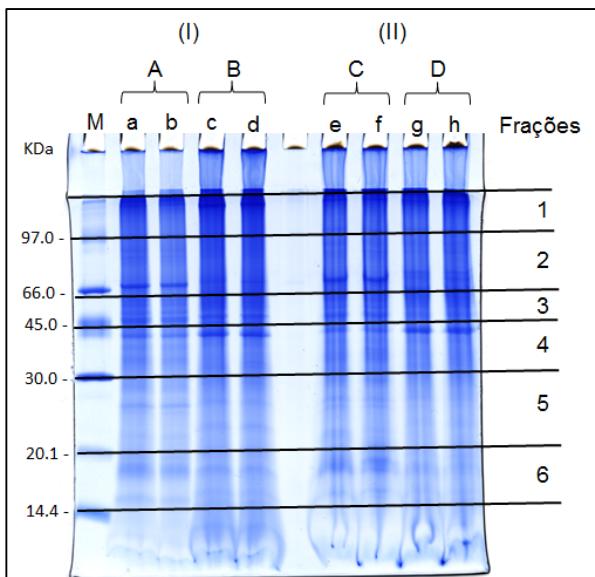
Como descrito na seção 3.6.1, utilizamos um tampão contendo 2,2M tiouréia, 8M uréia e 4% CHAPS para a realização da extração de proteínas dos períodos 7 e 14 dias de cultura das células mesenquimais. As proteínas foram quantificadas de acordo com o método colorimétrico de Bradford (1976). Obtivemos para as células cultivadas em meio MEM 15%, após 7 dias de cultivo, uma concentração em proteínas de  $6,31\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (extrato obtido com  $3,3 \times 10^6$  células) e, após 14 dias,  $6,76\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (extrato obtido a partir de  $1,68 \times 10^6$  células). Para as células cultivadas em meio MTS 15%, obtivemos  $3,37\mu\text{g}/\mu\text{L}$  em proteínas ( $1,86 \times 10^6$  células) para 7 dias e  $3,46\mu\text{g}/\mu\text{L}$  ( $1,06 \times 10^6$  células), para 14 dias.

##### **4.4.1. Identificação de proteínas por 1D-LC-MALDI-TOF/TOF**

Como descrito anteriormente, seção 3.6.2, utilizamos mini-géis de poliacrilamida a 12,5% homogêneo submetidos à eletroforese vertical sendo aplicados  $25\mu\text{g}$  de proteínas totais de cada amostra em duplicata. O perfil eletroforético obtido está ilustrado na Figura 15. Cada banda foi submetida à cromatografia de fase reversa e análise off-line por espectrometria de massas tipo MALDI-TOF/TOF.

Foram identificadas 146 proteínas totais (ANEXO C) nas células que foram cultivadas em MEM 15% e MTS 15%. Tais proteínas foram selecionadas com escore (tanto de proteína quanto de peptídeo) maior que 35, totalizando 50 proteínas identificadas em MEM 15% (Tabela 3) e 55 proteínas identificadas em MTS 15% (Tabela 4). Estas proteínas foram analisadas quanto aos processos biológicos em que estão envolvidas através da utilização do banco de dados *Gene Ontology* (BABELOMICS v.3.2). Dentre elas, 25 proteínas foram

relacionadas aos seguintes processos biológicos: secreção, localização celular, transdução de sinal, organização de organelas e biogênese, diferenciação celular e transporte (Figura 16). A identificação das proteínas encontradas em ambos os tipos de cultivo estão descritas na Tabela 5. As proteínas exclusivas às células cultivadas em MEM 15% estão descritas na Tabela 6 e as proteínas exclusivas de células cultivadas em MTS 15% encontram-se na Tabela 7.



**Figura 15. SDS-PAGE obtido de extratos de células mesenquimais de medula óssea de rato.** Foram submetidos à eletroforese 25 $\mu$ g de proteínas de cada amostra em duplicata. (I) células cultivadas em MEM 15%: as bandas foram recortadas do gel e submetidas à hidrólise enzimática por tripsina. As bandas que apresentaram em duplicidade, foram unidas em um único tubo (a+b=A: 7 dias, c+d=B: 14 dias). (II) células cultivadas em MTS 15%: as bandas sofreram os mesmos procedimentos do (I), sendo (e+f=C: 7 dias, g+h=D: 14 dias). M: marcador de peso molecular – LMW (*Protein and Peptide Molecular Weight Markers*) GE Healthcare.

**Tabela 4.** Identificação das proteínas por MALDI-TOF-TOF detectadas a partir de células cultivadas em MEM 15% com score ≥ 35.

Prot. Acesso	Fração	Proteína	Proteína			Peptídeo		
			Score	MW (kDa)	Matches	Cover (%)	Score	
Sequência								
ACTN1_RAT	A1	Alpha-actinin-1	39	103530		0,9	38,52	TIPWLENR
MYH9_RAT	A1	Miosina-9	40	227705		0,4	39,76	VVFQEFR
NLRX1_RAT	A1	NLR family member X1	38	108616		1,1	37,57	DLGGSGEGGAR
AMD_RAT	A1	Peptidyl-glycine alpha-amidating monooxygenase	39	109530	1	1	38,67	KAGIEVQEIK
ENPL_RAT	A2	Endoplasmina	43	93055		1,4	42,64	SILFVPTSAPR
EZRI_RAT	A2	Ezrin	56	69504		1,7	56,21	APDFVFYAPR
ATPB_RAT	A3	ATP sintase mitocondrial de subunidade beta	40	56353		2,3	40,28	IMNVIGEPIDER
EF1A1_RAT	A3	Elongation factor 1-alpha 1	57	50456	2	5	30,56	IGGIGTVPVGR
PDIA6_RAT	A3	Proteína disulfeto-isomerase A6	43	48572		6,4	30,27	GESPVVDYDGR
SERPH_RAT	A3	Serpina H1	36	46631	1	4,1	35,57	LSSLIILMPHHVEPLER
TBB5_RAT	A3	Tubulina de cadeia beta-5	63	50127	3	10,8	44,2	LAVNMVPFPR
VIME_RAT	A3	Vimentina	202	53789	6	12,4	32,19	LQEEMLQR
ACTC_RAT	A4	Actin, alpha cardiac muscle 1	383	42361	10	23,3		
ACTB_RAT	A4	Actin, cytoplasmic 1	486	42019	11	26,9	87,64	AGFAGDDAPR
ACTH_RAT	A4	Actin, gamma-enteric smooth muscle	368	42276	10	23,4		
ANXA2_RAT	A4	Anexina A2	91	38963	3	9,7	72,7	TNQELQEINR
ANXA5_RAT	A4	Anexina A5	38	35801	1	3,8	38,3	GTVTDFSGFDGR
CNN1_RAT	A4	Calponina-1	38	33514		3	38,42	GMTVYGLPR
G3P_RAT	A4	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	147	36113	2	8,4	67,48	LVINGKPITIFQER
GBLP_RAT	A4	Guanine nucleotide-binding protein	37	35533	1	3,5	37,45	LWDLTTGTTTR

		subunit beta-2-like 1						
ROA1_RAT	A4	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	41	34383	5,6	40,87	NQGGYGGSSSSSYGSGR	
ROA3_RAT	A4	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	55	39880	5,8	54,51	SSGSPYGGGYGSGGGGGGYGSR	
MDHM_RAT	A4	Malato desidrogenase mitocondrial	80	36140	4,1	79,98	VDFPQDQLATLTGR	
RS7_RAT	A5	proteína S7 ribosomal 40S	35	22127	4,1	34,81	HVVFIAQR	
HSPB1_RAT	A5	proteína Heat shock beta-1	90	22949	2	8,7	DWYPAHSR	
GDIR1_RAT	A5	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	35	23464	1	3,4	35,46	YIQHTYR
TAGL_RAT	A5	Transgelina	107	22660	3	13,4	84,95	AAEDYGVTK
RS13_RAT	A6	proteína S13 ribosomal 40S	51	17222	1	6	50,92	DSHGVAQVR
RS18_RAT	A6	proteína S18 ribosomal 40S	92	17718	2	12,5	56,89	IPDWFLNR
RS19_RAT	A6	proteína S19 ribosomal 40S	48	16085		6,2	47,75	DVNQQEFVR
RS24_RAT	A6	proteína S24 ribosomal 40S	44	15423		9	44,4	TTPDVIFVFGFR
RL27A_RAT	A6	proteína L27a ribosomal 60S	45	16732	1	6,8	45,36	LWTLVSEQTR
H31_RAT	A6	Histona H3.1	35	15518		6,6	35,18	YRP GTVALR
MYL6_RAT	A6	Miosina leve polipeptídeo 6	46	17146		5,3	45,55	EAFQLFDR
NDKB_RAT	A6	Nucleosídeo difosfato quinase B	55	17397	2	14,5	37,31	DRPFFPGLVK
PROF1_RAT	A6	Profilina-1	58	15128	1	10	58,41	SSFFVNLTLGGQK
GRP78_RAT	B2	proteínas de glicose-regulada 78 kDa	87	72346	2	4,3	35,38 81,13	SDIDEIVLVGGSTR ITPSYVAFTPEGER
HSP72_RAT	B2	proteína Heat shock 2 de 70 kDa	84	69641	2	3,6	62,47	FEELNADLFR
EF1G_RAT	B3	Elongation factor 1-gamma	60	50060		3,4	59,98	VLSAPPHFHFGQTNR
1433B_RAT	B4	proteína 14-3-3 beta/alpha	68	28054		4,1	68,34	DSTLIMQLLR
ANXA1_RAT	B4	Anexina A1	70	38829	1	3,2	69,63	TPAQFDADEL R
DBPA_RAT	B4	proteína DNA-ligante A	36	38851		2,2	36,45	NGYGFINR

ROA2_RAT	B4	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	36	37477	2,3	35,97	DYFEEYGK
CA201_RAT	B4	UPF0490 protein C1orf201 homolog	38	37533	2,6	38,27	AGFLSKTPR
RAB15_RAT	B5	Ras-related protein Rab-15	57	24283	5,2	57,06	IQIWDTAGQER
RAB1A_RAT	B5	Ras-related protein Rab-1A	57	22677	5,4		LQIWDTAGQER
COF1_RAT	B6	Cofilina-1	51	18532	6,6	50,62	YALYDATYETK
LEG1_RAT	B6	Galectina-1	69	14857	7,4	69	DDGTWGTEQR
SSRD_RAT	B6	proteína Translocon associada a subunidade delta	58	18979	6,4	58,05	FFDEESYSLLR

**Tabela 5.** Identificação das proteínas por MALDI-TOF-TOF detectadas a partir de células cultivadas em MTS 15% com score ≥ 35.

Prot. Acesso	Fração	Proteína	Proteína				Peptídeo	
			Score	MW (kDa)	Matches	Cover (%)	Score	Sequência
LIPA3_RAT	C1	Liprin-alpha-3	39	133998	1	0,8	38,88	QKLQQQLQK
NEST_RAT	C1	Nestina	36	209651	1	0,5	35,58	LSQAVRGAR
AMD_RAT	C1	Peptidyl-glycine alpha-amidating monooxygenase	39	109530	1	1	39,28	KAGIEVQEIK
GOGA5_RAT	C2	Golgin subfamily A member 5	45	82333	1	1,4	44,92	VDQGAATALR
HSP7C_RAT	C2	Heat shock cognate 71 kDa protein	37	71098	1	1,7	36,53	VEIIANDQGNR
LMNA_RAT	C2	Lamina-A	59	74608	2	3,3	49,93	LQEKEDLQELNDR
EF1A1_RAT	C3	Elongation factor 1-alpha 1	54	50456	1	2,6	53,73	YYVTIIDAPGHR
SERPH_RAT	C3	Serpina H1	41	46631	1	2,9	41,47	DNQSGSLLFIGR
TBA1A_RAT	C3	Tubulina de cadeia alfa-1A	48	50820	1	2,7	48,21	QLFHPEQLITGK
TBB5_RAT	C3	Tubulina de cadeia beta-5	142	50127	4	9	37,2	IREEYPDR
VIME_RAT	C3	Vimentina	212	53789	7	15,7	55,63	DNLAEDEIMR
ACTB_RAT	C4	Actin, cytoplasmic 1	204	42079	3	8,8	92,8	AGFAGDDAPR
ANXA1_RAT	C4	Anexina A1	36	39171	1	3,2	35,97	TPAQFDADEL R
ANXA2_RAT	C4	Anexina A2	84	38963	1	2,9	83,68	TNQELQEINR
EF1D_RAT	C4	Elongation factor 1-delta	66	31444	2	9,3	54,85	IASLEVENQNL R
G3P_RAT	C4	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	57	36113	1	4,2	57,19	LVINGKPITIFQER
ROA1_RAT	C4	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	77	34383	2	5,3	45,99	DYFEQYGK
ROA3_RAT	C4	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	46	39880	1	2,1	45,99	DYFEKYGK

ROA2_RAT	C4	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	113	37534	4	11,9	38,45	GGNFGFGDSR
LDHA_RAT	C4	L-lactate dehydrogenase A chain	38	36735	1	3	37,67	VTLTPDEEAR
RS7_RAT	C5	proteína S7 ribossomal 40S	39	22127	1	4,1	38,8	HVVFIAQR
HSPB1_RAT	C5	Heat shock protein beta-1	68	22949	2	8,7	30,94	DWYPAHSR
RAB15_RAT	C5	Ras-related protein Rab-15	59	24625	1	5,2	58,55	IQIWDTAGQER
RAB1A_RAT	C5	Ras-related protein Rab-1A	59	22906	1	5,4	58,55	LQIWDTAGQER
RAB2A_RAT	C5	Ras-related protein Rab-2A	50	23706	1	6,1	50,05	LQIWDTAGQESFR
TAGL_RAT	C5	Transgelina	73	22660	2	9	43,41	AAEDYGVTK
RS16_RAT	C6	proteína S16 ribossomal 40S	65	16559	1	8,2	64,85	GGGHVAQIYAIR
RS19_RAT	C6	proteína S19 ribossomal 40S	53	16085	1	6,2	53,37	DVNQQEFVR
RL31_RAT	C6	proteína L31 ribossomal 60S	38	14463	1	7,2	38,05	SAINEVVTR
MYL6_RAT	C6	Miosina leve polipeptídeo 6	44	17146	2	15,2	34,12	NKDQGTYEDYVEGLR
NDKA_RAT	C6	Nucleosídeo difosfato quinase A	146	17307	3	23,7	56,25	DRPFFSGLVK
NDKB_RAT	C6	Nucleosídeo difosfato quinase B	125	17397	3	23,7	36,31	DRPFFPGLVK
PPIA_RAT	C6	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	42	18102	1	5,5	41,76	FEDENFILK
PROF1_RAT	C6	Profilina-1	74	15128	2	20	44,51	DSLLQDGEFTMDLR
SSRD_RAT	C6	proteína Translocon associada a subunidade delta	88	19208	1	6,4	88,45	FFDEEYSLLR
ACTN1_RAT	D1	Alpha-actinin-1	167	103530	5	6,1	37,63	TIPWLENR
ACTN4_RAT	D1	Alpha-actinin-4	170	105370	5	5,9	40,35	TIPWLEDR
CLH_RAT	D1	Clatrina de cadeia pesada tipo 1	39	193308	1	0,5	39,2	LLPWLEAR

CO1A1_RAT	D1	Colágeno de cadeia alfa-1(I)	99	138979	1	1,2	99,48	GETGPAGPAGPIGPAGAR
CO1A2_RAT	D1	Colágeno de cadeia alfa-2(I)	87	130076	1	1,1	86,64	GEAGAAGPSGPAGPR
CNTN3_RAT	D1	Contactina-3	45	113529	1		45,32	VAGNQTSAVLR
RTN4_RAT	D1	Reticulon-4	36	126843	1	1,1	35,67	GPLPAAPPAAPER
GRP78_RAT	D2	proteínas de glicose-regulada 78 kDa	50	72517	2	2,9	37,35 39,8	ALSSQHQAR FEELNMDLFR
CALX_RAT	D2	Calnexina	75	67653	1	2,5	75,03	KIPNPDFFEDLEPFR
ENPL_RAT	D2	Endoplasmina	35	93055	1	1,4	35,23	SILFVPTSAPR
HSP72_RAT	D2	Heat shock-related 70 kDa protein 2	123	69926	3	6,2	50,32	FEELNADLFR
DESM_RAT	D3	Desmina	39	53513	1	3	38,52	FASEASGYQDNIAR
PDIA6_RAT	D3	proteína disulfeto-isomerase A6	142	48572	2	5,5	68,47	NKPEDYQGGR
TBB2A_RAT	D3	Tubulina de cadeia beta-2A	40	50306	1	5,8	39,62	SGPFGQIFRPDNFVFGQSGAGNNWAK
GBLP_RAT	D4	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1	56	35533	1	3,2	56,26	DETNYGIPQR
MDHM_RAT	D4	Malato desidrogenase mitocondrial	56	36140	1	4,1	56,22	VDFPQDQLATLTGR
CA201_RAT	D4	UPF0490 protein C1orf201 homolog	37	37876	1	2,6	37,17	AGFLSKTPR
RB11A_RAT	D5	Ras-related protein Rab-11A	53	24507	1	5,1	53,2	AQIWDTAGQER
CALM_RAT	D6	Calmodulina	46	16837	1	10,7	46,3	VFDKDGNGYISAAELR

**Tabela 6.** Identificação de proteínas por MALDI-TOF-TOF comuns entre as células cultivadas em MEM 15% e MTS 15%.

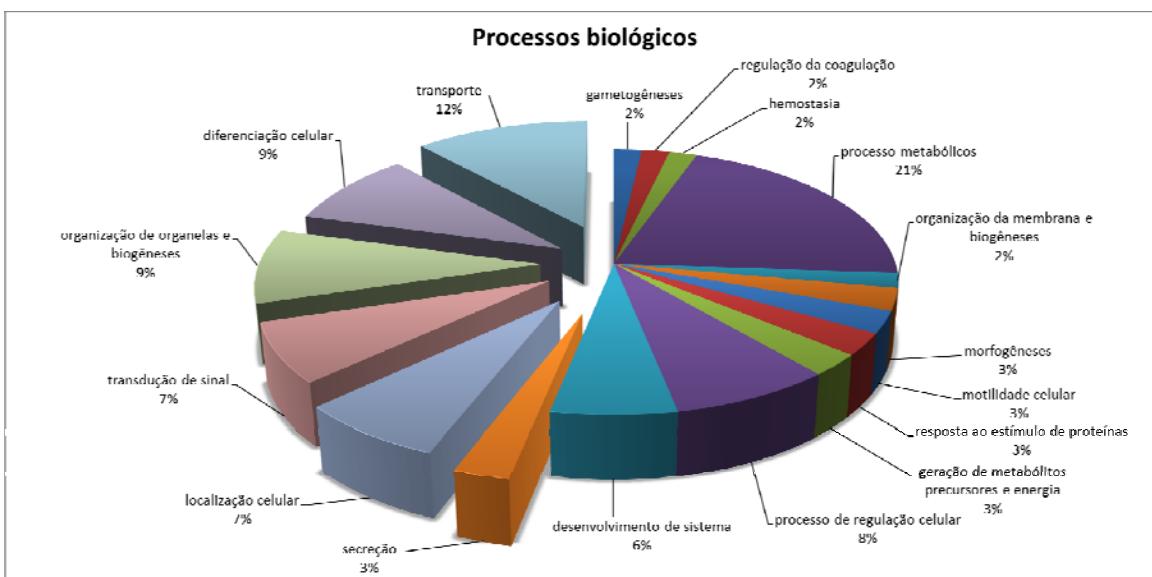
Prot. Acesso	Fração	Proteína	Proteína				Peptídeo	
			Score	MW (kDa)	Matches	% Cover	Score	Sequência
RS19_RAT	A6	40S ribosomal protein S19	48	16085	1	6,2	47,75	DVNQQEFVR
	C6		53				53,37	
	B2		87				35,38	SDIDEIVLVGGSTR
	B3						81,13	ITPSYVAFTPEGER
GRP78_RAT	D2	78 kDa glucose-regulated protein	50	72346	2	4,3	37,35	ALSSQHQAR
	D3						39,8	FEELNMDLFR
	A5		147				67,48	LVINGKPITIFQER
G3P_RAT	C4	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	57	36113	1	8,4	57,19	
	A4		37				37,45	LWDLTTGTTTR
GBLP_RAT	D4	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1	56	35533	1	3,5	56,26	DETNYGIPQR
	B2		84				62,47	
HSP72_RAT	D2	Heat shock-related 70 kDa protein 2	123	69641	2	3,6	50,32	FEELNADLFR
	A4		84				40,87	NQGGYGGSSSSSYGSGR
ROA1_RAT	C4	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	41	34383	1	5,6	45,99	DYFEQYGK
	A4		77				54,51	SSGSPYGGGYGSGGGSGGYGSR
ROA3_RAT	C4	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	55	39880	1	5,8	45,99	DYFEKYGK
	A6		46				58,41	SSFFVNGLTLGGQK
PROF1_RAT	C6	Profilin-1	58	15128	2	10	44,51	DSLLQDGEFTMDLR
	B5		74				57,06	IQIWDTAGQER
RAB15_RAT	C5	Ras-related protein Rab-15	57	24283	1	5,2	58,55	
	B5		59				57,06	LQIWDTAGQER
RAB1A_RAT	C5	Ras-related protein Rab-1A	57	22677	1	5,4	58,55	
	A3		59				44,2	LAVNMVPFPR
TBB5_RAT	C3	Tubulin beta-5 chain	63	22906	3	10,8	37,2	IREEYPDR
	C3		142				32,19	LQEEMLQR
VIME_RAT	A3	Vimentin	202	53789	6	12,4	55,63	DNLAEDIMR
	C3		212					

**Tabela 7.** Identificação de proteínas por MALDI-TOF-TOF exclusivas das células cultivadas em MEM 15%.

Prot. Acesso	Fração	Proteína	Proteína				Peptídeo	
			Score	MW (kDa)	Matches	% Cover	Score	Sequência
ANXA5_RAT	A4	Anexina A5	38	35801	1	3,8	38,3	GTVTDFSGFDGR
LEG1_RAT	B6	Galectina-1	69	14857	1	7,4	69	DDGTWGTEQR
MYH9_RAT	A1	Miosina-9	40	227705	1	0,4	39,76	VVFQEFR

**Tabela 8.** Identificação de proteínas por MALDI-TOF-TOF exclusivas das células cultivadas em MTS 15%.

Prot. Acesso	Fração	Proteína	Proteína				Peptídeo	
			Score	MW (kDa)	Matches	% Cover	Score	Sequência
ACTN4_RAT	D1	Alpha-actinin-4	170	105370	5	5,9	40,35	TIPWLEDR
							64,35	LASDLLEWIR
							53,28	VGWEQLLTTIAR
							76,37	GYEEWLNEIR
							46,84	LSNRPAFMPSEGR
CALM_RAT	D6	Calmodulina	46	16837	1	10,7	46,3	VFDKDGNGYISAAELR
CO1A1_RAT	D1	Colágeno de cadeia alfa-1(I)	99	138979	1	1,2	99,48	GETGPAGPAGPIGPAGAR
CO1A2_RAT		Colágeno de cadeia alfa-2(I)	87	130076	1	1,1	86,64	
GOGA5_RAT	C2	Golgin subfamily A member 5	45	82333	1	1,4	44,92	VDQGAATALR
	C2		59		2	3,3	36,83	LADALQELR
							49,93	LQEKEDLQELNDR
							47,55	LSPSPTSQR
LMNA_RAT		Lamina-A		74608			67,03	LADALQELR
	D2		190		7	10,7	43,84	SLETENAGLR
							45,09	AAYEAEELGDAR
							76,7	AQHEDQVEQYK
							43,55	LQEKEDLQELNDR
RB11A_RAT	D5	Ras-related protein Rab-11A	53	24507	1	5,1	53,2	AQIWDTAGQER
RAB2A_RAT	C5	Ras-related protein Rab-2A	50	23706		6,1	50,05	
RTN4_RAT	D1	Reticulon-4	36	126843	1	1,1	35,67	GPLPAAPPAAPER
TBB2A_RAT	D3	Tubulina de cadeia beta-2A	40	50306	1	5,8	39,62	SGPFGQJFRPDNFVFGQSGAGNNWAK



**Figura 16.** Análise por *Gene Ontology* (BABELOMICS v3.2) das proteínas identificadas por MS de células-tronco mesenquimais de medula óssea de rato durante a indução da osteogênese.

#### **4.4.2. Quantificação relativa de proteínas presentes nas diferentes fases da diferenciação osteoblástica utilizando isóbaros iTRAQ**

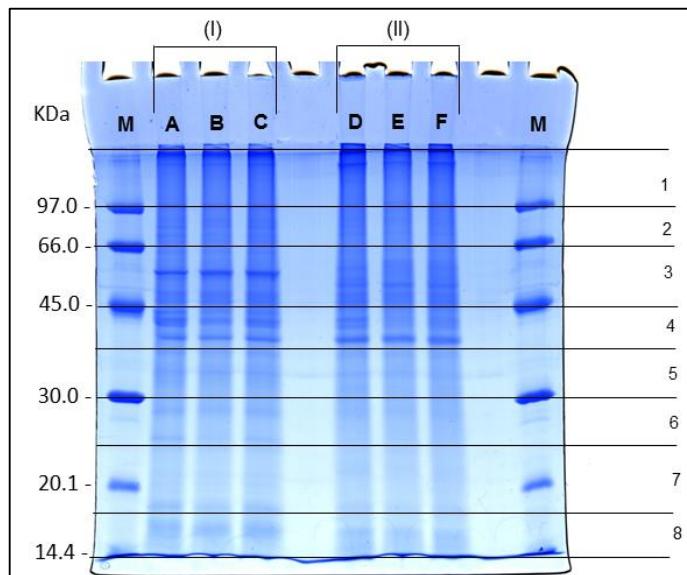
Como descrito na seção 3.6.2, utilizamos mini-gel de poliacrilamida a 12,5% homogêneo submetidos à eletroforese vertical sendo aplicado 30 $\mu$ g de proteínas totais de cada amostra, correspondente aos períodos 7 e 14 dias do processo de diferenciação. Foram utilizados dois controles internos, que correspondem à metade de cada amostra (15 $\mu$ g) misturadas na mesma proporção. Dessa forma, o nível de proteínas medidas no controle interno deve corresponder à somatória do nível da mesma proteína nas amostras MEM e MTS. Esse controle interno foi marcado com isóbaro específico e foi utilizado para detecção da variação do ensaio completo (digestão por tripsina, marcação por isóbaro e análise por espectrometria de massas) entre as amostras como demonstrado na Figura 17. O gel foi dividido em oito bandas que foram recortadas e submetidas à hidrólise enzimática por tripsina. Os peptídeos originados foram extraídos por eluição passiva sempre no mesmo volume para cada uma das oito bandas. Para a realização da marcação com o iTRAQ, foi

utilizado o kit 8-plex (Applied Biosystems) como descrito na seção 3.6.3. Não foi observada marcação com iTRAQ nas frações 1 e 2.

As proteínas identificadas com marcação com iTRAQ (ANEXO D) foram selecionadas - com base no escore de proteína  $\geq 35$  e no perfil de marcação. Aquelas proteínas que tiveram escore  $\geq 35$  e não tiveram um bom perfil de marcação foram eliminadas da análise. Para a identificação das proteínas marcadas com iTRAQ, foi realizado o cálculo da mediana dos valores de Apex para o isóbaro específico no período de 7 dias: MEM 15% (113), MTS 15% (114); 14 dias: MEM 15% (116), MTS 15% (117), respectivamente (Tabela 8).

A identificação das proteínas encontradas no período de 7 dias está descrita na Tabela 9 e no período de 14 dias, na Tabela 10.

Através dos valores do Apex, obtidos pelo procedimento de *low mass zoom*, foi possível realizar a quantificação relativa dos peptídeos das proteínas identificadas. O valor esperado é o somatório da metade das massas aplicadas no gel de cada período e a porcentagem de variação corresponde à razão entre o valor esperado e o controle.



**Figura 17. Eletroforese em SDS-PAGE obtido de extratos de células mesenquimais de medula óssea de rato para a marcação com iTRAQ.** Foram submetidos à eletroforese 30µg de proteínas de cada amostra. (I) células cultivadas até o período de 7 dias (7D). (A) MEM 15%; (B) MTS 15% e (C) Controle interno 1 (15µg → MEM 7D + 15µg → MTS 7D). (II) células cultivadas até o período de 14 dias (14D). (D) MEM 15%; (E) MTS 15% e (F) Controle interno 2 (15µg → MEM 14D + 15µg → MTS 14D). M: marcador de peso molecular – LMW-SDS Marker Kit GE Healthcare. As frações foram recortadas do gel e submetidas à hidrólise enzimática por tripsina.

**Tabela 9.** Identificação de proteínas por MALDI-TOF-TOF marcadas com iTRAQ nos períodos 7 e 14 dias das células cultivadas em MEM 15% e MTS 15%.

Prot. Acesso	Fração	Proteína	Proteína			Peptídeo			7 dias 114/113			Controle % Var.			Expressão Mediana			14 dias 117/116			Controle % Var.			Expressão Mediana		
			Score	MW (kDa)	Matches	Cover (%)	Score	Sequência																		
H4_RAT	8	Histona H4	112	11360	7	35,9	12,99	VFLENVIR	0,51	37,10	1,95	38,55	0,66	2,97	1,53	13,31	68,41	ISGLIYEETR	0,87	35,21	1,15	0,76	6,33	1,32		
	7		180	22588	6	29,4	39,58	LGFQVWLK	0,46	16,42	2,19	26,88	0,92	8,70	1,09	9,13										
TAGL_RAT	6	Transgelina a	47	22379	4	21,1	86,95	TDMFQTVDLFEGK	0,55	12,64	1,81	18,18	0,70	5,88	1,43	6,59	28,34	LGFQVWLK	0,74	2,13	1,35	0,72	4,00	1,38		
	7		59	23788	1	6,5	47,38	EFTDSQLQEGK	0,92	1,45	1,09	0,50	0,50	9,52	2,00	9,13										
TAGL2_RAT		Transgelina-2	57	19883	2	11,6	15,06	TLMNLGGGLAVAR	0,45	18,28	2,21	0,53	0,53	5,56	1,88		58,97	VYFDFQIGDEPVGR	0,71	20,75	1,41	0,82	9,80	1,22		
PPIB_RAT		Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	57	22095	1	5,5	33,91	EAFNMIDQNR	0,73	31,11	1,37	26,88	0,68	6,33	1,47											
MRLCA_RAT		Miosina regulatória de cadeia leve RLC-A	54	35805	1	4,2	36,72	QITINDLPVGR	0,84	16,05	1,19	0,73	0,73	1,20	1,37											
PRDX1_RAT		Peroxiredoxin-1	41992	20			54,04	LISWYDNEYGYNSR	0,89	33,33	1,12	33,33	0,74	9,09	1,36	9,09										
G3P_RAT	5	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	191	41982	19	27,6	12,73	IIAPPER	0,58	28,74	1,72	0,82	0,82	1,73	1,22											
ACTC_RAT		Actin, alpha cardiac muscle 1	41992	20			24,59	GILTLK	0,48	6,93	2,07	28,74	0,65	3,41	1,53	3,41										
ACTA_RAT	4	Actin, aortic smooth muscle	41982	19			16,22	DLTDYLMK	0,67	16,67	1,50	0,63	0,63	2,08	1,59											
ACTA_RAT			127	53700	8	16,5	24,35	QDVNDNASLAR	0,91	19,05	1,10	40,73	0,88	10,64	1,14	11,32										

\*Valores abaixo da mediana foram aceitos como medidas de expressão das proteínas por iTRAQ

**Tabela 10.** Identificação de proteínas por MALDI-TOF-TOF no período 7 dias das células cultivadas em MEM 15% (113) e MTS 15% (114).

Prot. Acesso	Fração	Proteína	Proteína			Peptídeo			7 dias 114/113	Controle % Var.	Expressão	Mediana
			Score	MW (kDa)	Matches	Cover (%)	Score	Sequência				
RLA1_RAT	8	60S acidic ribosomal protein P1	79	11491	1	14	79,31	AAGVNVEFWPGGLFAK	0,65	18,18	1,54	38,55
ACTC_RAT		Actin, alpha cardiac muscle 1			20	27,6	20,02	LDLAGR	1,00	8,33	1,00	
						27,6	12,73	IIAPPER	0,58	28,74	1,72	
ACTA_RAT	4	Actin, aortic smooth muscle	191	41992		27,6	14,91	LDLAGR	1,00	8,33	1,00	28,74
					19	27,6	24,59	GILTLK	0,48	6,93	2,07	
						27,6	16,22	DLTDYLMK	0,67	16,67	1,50	
ACTB_RAT		Actin, cytoplasmic 1	202	41710		24,3	35,32		0,46	8,73	2,19	
ANXA1_RAT		Anexina A1	36	38805		4,6	35,72	GLGTDEDLIEILTTR	1,00	13,33	1,00	
G3P_RAT	5	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	54	35805	1	4,2	54,04	LISWYDNEYGYSNR	0,89	33,33	1,12	33,33
HSPB1_RAT	6	proteína Heat shock beta-1	58	22879	4	20,9	12,76	RVPFSLLR	1,21	17,33	0,83	
H2A1C_RAT		Histona H2A tipo 1-C	42	14097	3	21,5	12,02	SPSWEPFRL	1,30	15,79	0,77	18,18
						20,9	28,28	AGLQFPVGR	0,75	19,48	1,33	
	8	Histona H4	112	11360	7	35,9	12,99	VFLENVIR	0,51	37,10	1,95	38,55
H4_RAT						35,9	19,67		1,00	15,00	1,00	
NPM_RAT	5	Nucleofosmina	67	32540	2	12	56,75	ISGLIYEETR	0,87	35,21	1,15	
PPIB_RAT		Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	59	23788	1	6,5	58,97	MTDQEAIQDLWQWR	0,88	53,33	1,14	33,33
PRDX1_RAT		Peroxiredoxin-1	37	22095		5,5	36,72	VYFDFQIGDEPVGR	0,71	20,75	1,41	
RAB14_RAT		Ras-related protein Rab-14	23912		3	12,6	32,51	QTINNDLPVGR	0,84	16,05	1,19	
			42			12,6	42,25	LQIWDTAGQER	0,63	26,92	1,60	
RAB15_RAT		Ras-related protein Rab-15	24268		2	5,2	32,51	IQIWDTAGQER	0,63	26,92	1,60	
	7					5,2	42,25		0,71	23,08	1,41	26,88
RAB1A_RAT		Ras-related protein Rab-1A	46	22663		9,3	32,51		0,63	26,92	1,60	
					3	9,3	42,25	LQIWDTAGQER	0,71	23,08	1,41	
RAB4A_RAT		Ras-related protein Rab-4A	42	23891		15	32,51		0,63	26,92	1,60	
						15	42,25		0,71	23,08	1,41	
								LGFQVWLK	0,46	16,42	2,19	
TAGL_RAT	6	Transgelina	180		6	29,4	39,58		0,55	12,64	1,81	
				22588		29,4	86,95	TDMFQTVDLFEGK				
					2	9,5	28,34	LGFQVWLK	0,74	2,13	1,35	
						9,5	47,38	EFTDSQLQEGK	0,92	1,45	1,09	18,18
TAGL2_RAT	7	Transgelina-2	68	22379	4	21,1	5,63	GPSYGLSR	0,95	21,37	1,05	
						21,1	15,06	TLMNLGGGLAVAR	0,45	18,28	2,21	26,88
						21,1	43,31	ENFQNWLK	0,58	26,83	1,73	
						16,5	47,05	LGDLYEEEMR	0,71	26,32	1,41	
VIME_RAT	3	Vimentina	127	53700	8	16,5	10,63	LDLER	0,85	36,00	1,17	40,73
						16,5	24,35	QDVVDNASLAR	0,91	19,05	1,10	

**Tabela 11.** Identificação de proteínas por MALDI-TOF-TOF no período 14 dias das células cultivadas em MEM 15% (116) e MTS 15% (117).

Prot. Acesso	Fração	Proteína	Proteína				Peptídeo		14 dias 117/116	Controle % Var.	Expressão	Mediana
			Score	MW (kDa)	Matches	Cover (%)	Score	Sequência				
1433Z_RAT	6	proteína 14-3-3 zeta/delta	33	27754	1	3,3	33,49	VVSSIEQK	0,83	1,33	1,21	6,59
ACTC_RAT	4	Actin, alpha cardiac muscle 1	191	41992	20	27,6	14,91	LDLAGR	0,64	0,70	1,55	
							12,73	IIAPPER	0,82	1,73	1,22	
ACTB_RAT		Actin, cytoplasmic 1	202	41710	19	24,3	24,59	GILTLK	0,65	3,41	1,53	3,41
							16,22	DLTDYLMK	0,63	2,08	1,59	
G3P_RAT	5	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	54	22879	4	4,2	15,85	ILTER	0,86	2,53	1,16	
							46,72	AVFPSIVGRPR	0,89	0,92	1,12	
H2B1_RAT		Histona H2B tipo 1	195	13982	7	40,8	54,04	LISWYDNEYGYNSNR	0,74	9,09	1,36	9,09
							57,91	LFDQAFGVPR	0,78	5,62	1,28	
H2B1A_RAT	8	Histona H2B tipo 1-A	42	14216	3	24,4	31,05	EIQTAVR	0,79	8,57	1,26	
							45,22	ESYSVYVYK	0,83	12,33	1,21	
H4_RAT		Histona H4	112	11360	7	35,9	98,23	AMGIMNSFVNDIFER	0,96	9,43	1,04	13,31
							31,05	EIQTAVR	0,79	8,57	1,26	
MRLCA_RAT	7	Miosina regulatória de cadeia leve RLC-A	57	19883	2	11,6	12,99	VFLENVIR	0,66	2,97	1,53	
							68,41	ISGLIYEETR	0,76	6,33	1,32	
NPM_RAT	5	Nucleofosmina	67	32540		12	33,91	EAFNMIDQNR	0,68	6,33	1,47	
							54,06	GNFNYIEFTR	1,00	8,82	1,00	
PPIB_RAT	7	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	59	23788	1	6,5	56,75	MTDQEAIQDLWQWR	0,88	6,67	1,14	9,09
							58,97	VYDFDFQIGDEPVGR	0,82	9,80	1,22	
PRDX1_RAT		Peroxiredoxin-1	37	22095	1	5,5	36,72	QITINDLPVGR	0,73	1,20	1,37	
							36,58	QWLQEIDR	0,90	5,00	1,11	
RAB1A_RAT		Ras-related protein Rab-1A	46	22663	3	9,3	39,58	LGFQVWLK	0,92	8,70	1,09	
							180	22588	6	7,78	1,54	
TAGL_RAT	6	Transgelina	47		2	9,5	75,93	EFTDSQLQEGK	0,65	5,88	1,43	
							86,95	TDMFQTVDLFEGK	0,70	4,00	1,38	6,59
TBA1A_RAT	7	Tubulin de cadeia alfa-1A	37	50104	1	3,3	28,34	LGFQVWLK	0,72	5,56	1,88	
							15,06	TLMNLGGGLAVAR	0,53	9,43	1,41	
VIME_RAT	3	Vimentina	127	53700	8	16,5	36,75	AVFVDLEPTVIDEV	0,71	10,64	1,14	
							24,35	QDVDNASLAR	0,88	1,19	0,87	11,32
							45,57	VEVERDNLAEDIMR	1,14	2,80	0,83	
							40,41	LQDEIQNMKEEMAR	1,20			

#### 4.5. Análise proteômica de células mesenquimais da medula óssea humana em diversas fases de diferenciação osteoblásticas

Como descrito na seção 3.6.1. utilizamos um tampão contendo 2,2 M tioúreia, 8M uréia, e 4% CHAPS para a realização da extração de proteínas dos períodos 7 e 14 dias de cultura das células mesenquimais. As proteínas foram quantificadas de acordo com o método colorimétrico de Bradford (1976). As células cultivadas em meio MEM 10% apresentaram, no período de 7 dias uma concentração de  $3,26\mu\text{g}/\mu\text{L}$  ( $1,0 \times 10^6$  células);  $3,45\mu\text{g}/\mu\text{L}$  ( $1,7 \times 10^6$  células) e em 14 dias:  $24,19\mu\text{g}/\mu\text{L}$  ( $6,9 \times 10^6$  células),  $13,19\mu\text{g}/\mu\text{L}$  ( $4,2 \times 10^6$  células). Já para as células que foram cultivadas em meio MTS 10%, a concentração de proteínas obtidas foi, no período de 7 dias:  $0,94\mu\text{g}/\mu\text{L}$  ( $0,4 \times 10^6$  células);  $2,2\mu\text{g}/\mu\text{L}$  ( $1 \times 10^6$  células) e 14 dias:  $10,64\mu\text{g}/\mu\text{L}$  ( $3,24 \times 10^6$  células),  $3,47\mu\text{g}/\mu\text{L}$  ( $1,04 \times 10^6$  células). Para cada condição de crescimento, antes da extração de proteínas foi estimado o número de células presentes. Devido à escassez de amostra foi feito um *pool* das medulas ósseas humanas para posterior análise por *shotgun proteomics* e iTRAQ.

Como descrito na seção 3.6.2, utilizamos mini-gel de poliacrilamida a 12,5% homogêneo submetidos à eletroforese vertical sendo aplicado  $30\mu\text{g}$  de proteínas totais de cada amostra correspondente aos períodos 7 e 14 dias do processo de diferenciação. Foram utilizados dois controles internos, que correspondem à metade de cada amostra ( $15\mu\text{g}$ ) misturada na mesma proporção, dessa forma a expressão das proteínas medidas no controle interno deve corresponder à somatória da expressão da mesma proteína nas amostras MEM e MTS. Esse controle interno foi marcado com isóbaro específico e foi utilizado para detecção da variação do ensaio completo (digestão por tripsina, marcação por isóbaro e análise por espectrometria de massas) da marcação iTRAQs entre as amostras como

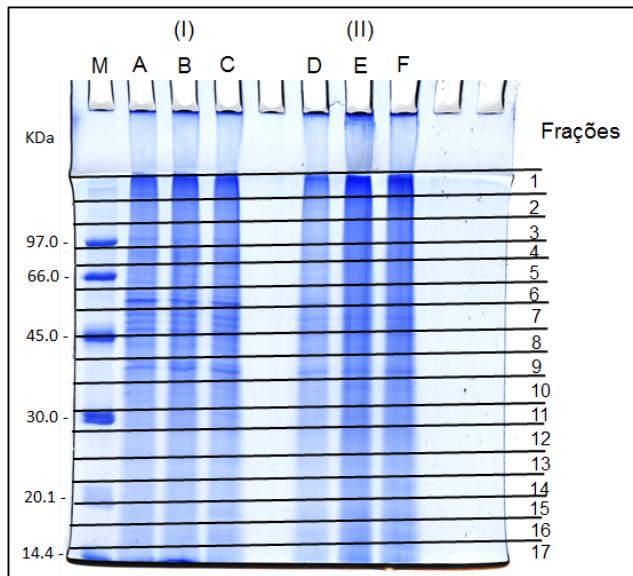
demonstrado na figura 18. O gel foi dividido em dezessete bandas, que foram recortadas e submetidas à hidrólise enzimática por tripsina e os peptídeos originados extraídos por eluição passiva sempre no mesmo volume para cada banda. Para a realização da marcação com o iTRAQ, foi utilizado o kit 8-plex (Applied Biosystems) como descrito na seção 3.6.3.

Nas células humanas foram identificadas 61 proteínas totais (ANEXOS E e F) na presença e na ausência de estímulos para a osteogênese. Tais proteínas foram selecionadas com escore de proteína  $\geq 35$ , em relação ao perfil de marcação, totalizando 59 proteínas identificadas sendo as proteínas identificadas (37 proteínas) durante os estímulos para a osteogênese (MTS) foram relacionadas quanto aos processos biológicos através da utilização do banco de dados *Gene Ontology*. Dentre elas, 19 proteínas foram relacionadas aos seguintes processos biológicos: transporte, diferenciação celular, secreção, transdução de sinal e sinalização intracelular (Figura 19). Aquelas proteínas que tiveram escore  $\geq 35$  e não tiveram um bom perfil de marcação foram eliminadas da análise. Para a identificação das proteínas marcadas com iTRAQ, utilizamos o parâmetro no qual foi realizado o cálculo da mediana obtida através dos valores do Apex para o isóbaro específico no período de 7 dias: MEM 10% (113), MTS 10% (114); 14 dias: MEM 10% (116), MTS 10% (117), respectivamente.

A identificação das proteínas com único peptídeo marcado, em ambos os períodos, estão descritas na Tabela 12, no período de 7 dias identificação de proteínas com dois peptídeos marcados durante o processo de diferenciação (MTS) estão na Tabela 13.

Através dos valores do Apex, obtidos pelo procedimento de *low mass zoom*, foi possível realizar a quantificação relativas dos peptídeos das proteínas identificadas sendo que o valor esperado é o somatório da metade das massas aplicadas no gel de um

determinado período e a porcentagem de variação consiste na razão entre o valor esperado e o controle multiplicado por cem.



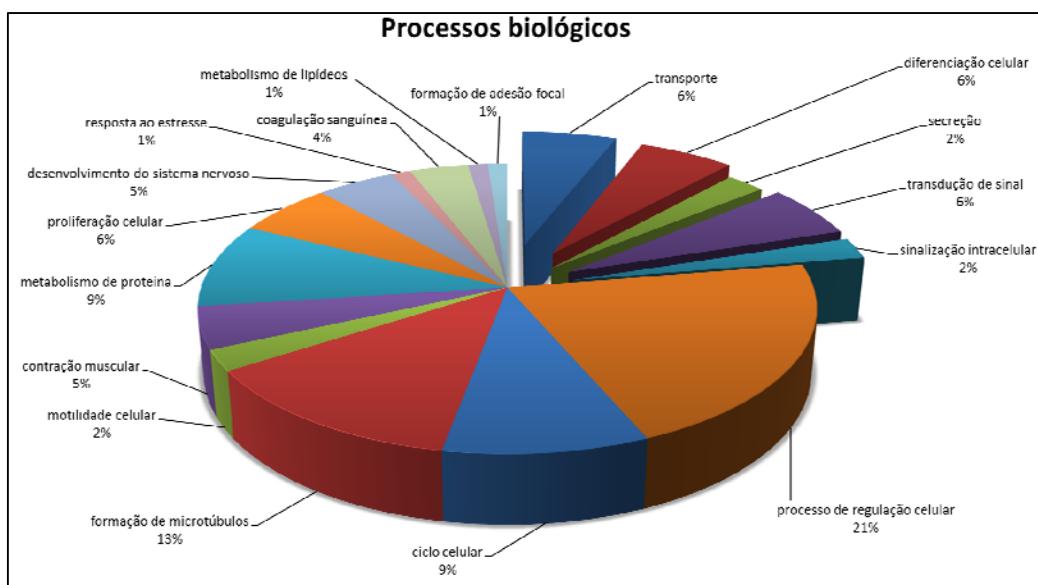
**Figura 18. Eletroforese em SDS-PAGE obtido de extratos de células mesenquimais de medula óssea humana para a marcação com iTRAQ.** Foram submetidos à eletroforese 30µg de proteínas de cada amostra. (I) células cultivadas até o período de 7 dias (7D). (A) MEM 10%; (B) MTS 10% e (C) Controle interno 1 (15µg → MEM 7D + 15µg → MTS 7D). (II) células cultivadas até o período de 14 dias (14D). (D) MEM 10%; (E) MTS 10% e (F) Controle interno 2 (15µg → MEM 14D + 15µg → MTS 14D). M: marcador de peso molecular – *LMMW-SDS Marker Kit GE Healthcare*. As frações foram recortadas do gel e submetidas à hidrólise enzimática por tripsina.

**Tabela 12.** Identificação de proteínas por MALDI-TOF-TOF com único peptídeo marcado com iTRAQ nos períodos 7 e 14 dias das células cultivadas em MEM 10% e MTS 10%.

Prot. Acesso	Fração	Proteína	Proteína			Peptídeo			7 dias 114/113	Controle % Var.	Expressão	Mediana	14 dias 117/116	Controle % Var.	Expressão	Mediana
			Score	MW (kDa)	Matches	Cover (%)	Score	Sequência								
ENOA_HUMAN	2	Alfa-enolase	57	47139	1	3,9	56,55	LAMQEFMILPVGAANFR	1,14	0,00	0,88	9,68	1,62	5,88	0,62	19,05
ANXA2_HUMAN	6	AnexinaA2	74	38580	1	4,1	74,39	GVDEVTIVNILTNR	1,21	7,14	0,83	11,11	1,48	17,07	0,67	8,60
CATD_HUMAN	11	Cathepsin D	57	44524	1	3,2	57,13	LVDQNIIFSFYLSR	1,26	7,69	0,79	10,71	1,24	42,86	0,81	13,60
EF2_HUMAN	4	Elongation factor 2	45	95277	1	2,1	44,73	ALLELQLPEELYQTFQR	1,05	2,56	0,95	3,57	1,00	11,11	1,00	16,00
FLNA_HUMAN	4	Filaminaa-A	35	280564	1	0,5	35,07	AEAGVPAEFSIWTR	1,25	5,56	0,80	3,57	1,53	15,79	0,65	16,00
KPYM_HUMAN	7	Isoenzima piruvato quinase M1/M2	92	57900	1	3	92,47	FGVEQDVDMVFASFIR	0,92	1,41	1,09	7,04	1,35	29,63	0,74	38,30
PTRF_HUMAN	15	Polymerase I and transcript release factor	35	43476	1	10,6	35,28	VPPPTFHVK	1,00	9,52	1,00	14,06	3,82	13,21	0,26	13,21
PDIA3_HUMAN	11	Proteína disulfeto-isomerase A3	69	56747	1	2,2	68,99	ELSDFISYLR	0,93	10,71	1,07	10,71	1,23	12,36	0,82	13,60
RAB15_HUMAN	13	Ras-related protein Rab-15	44	24676	1	44,41	44,41	IQIWDTAGQER	1,10	19,05	0,91	9,97	1,86	26,98	0,54	29,23
SERPH_HUMAN	9	Serpina H1	55	46411	1	3,6	54,61	LYGPSSVSFADDFVR	1,04	1,96	0,96	11,11	1,14	6,67	0,88	12,33
SMD3_HUMAN	17	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D3	41	14030	1	20,9	40,58	VAQLEQVYIR	1,24	6,38	0,81	10,60	1,00	4,35	1,00	9,92
TBA1A_HUMAN	11	Tubulina de cadeia alfa-1A	37	50104	1	3,3	36,82	AVFVDLEPTVIDEV	1,16	7,32	0,86	10,71	1,40	0,00	0,71	13,60
TBB2A_HUMAN	6	Tubulina de cadeia beta-2A	38	49875	1	3,4	37,79	AILVDLEPGTMDSVR	1,00	3,03	1,00	11,11	1,13	22,45	0,88	8,60

**Tabela 13.** Identificação de proteínas por MALDI-TOF-TOF com dois peptídeos marcados com iTRAQ no período 7 dias das células cultivadas em MTS 10%.

Prot. Acesso	Fração	Proteína	Proteína			Peptídeo		7 dias 114/113	Control e % Var.	Expressão	Mediana	
			Score	MW (kDa)	Matches	Cover (%)	Score	Sequência				
RLA1_HUMAN	16	60S acidic ribosomal protein P1	110	11628	2	18,4	110	AAGVNVEFWPGGLFAK	2,17	9,59	0,46	46,39
ENOA_HUMAN	9	Alfa-enolase	53	47139	2	7,1	33,4	VVIGMDVAASEFFR	0,95	2,33	1,05	11,11
ANXA1_HUMAN	11	Anexina A1	35	38690	2	9	34,7	GLGTDEDTLIEILASR	1,16	0,00	0,86	10,71
ANXA2_HUMAN	8	Anexina A2	61	38580	2	6,8	61,2	GVDEVTIVNILTNR	1,07	3,23	0,94	6,26
CALM_HUMAN	16	Calmodulina	91	16837	2	68,3	68,3	VFDKDNGYISAAELR	1,55	42,86	0,65	46,39
	17		117		2	22,1	69,5		0,97	0,00	1,03	10,60
CALX_HUMAN	4	Calnexina	42	67526	2	4,1	41,6	KIPNPDDFEDLEPFR	1,07	3,45	0,93	3,57
CALR_HUMAN	6	Calreticulina	79	48112	2	4,3	78,9	EQFLDGDGWTSR	0,81	1,66	1,23	11,11
COF1_HUMAN	16	Cofilina-1	38	18730	2	12	26,3	KSSTPEEVK	2,20	33,33	0,45	46,39
	3				2		38,1	YALYDATYETK	1,82	16,67	0,55	46,39
CKAP4_HUMAN	6	Cytoskeleton-associated protein 4	73	65983	2	2,7	35,5	VQSLQATFGTFESILR	1,07	3,23	0,94	11,11
	3		53		2		52,7		1,17	2,56	0,86	7,29
G3P_HUMAN	11	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	60	36030	2	4,2	42,6	LISWYDNEFGYSNR	0,90	10,00	1,11	10,71
					2		54,7		1,04	6,12	0,96	10,71
KPYM_HUMAN	6	Isoenzima piruvato quinase M1/M2	94	57900	2	6,2	26,4	EAAAMYLQLFEELRR	0,88	9,68	1,14	11,11
ML12A_HUMAN	15	Miosina regulatória de cadeia leve 12A	59	19851	2	20,5	59	GNFNYIEFTR	0,91	14,75	1,10	14,06
RAB10_HUMAN	14	Ras-related protein Rab-10	53	22769	2	11	53	AFLTLAEDILR	1,33	7,14	0,75	9,09
STMN1_HUMAN	15	Stathmin	56	17302	2	14,8	28,8	DLSLEEIQK	1,08	7,41	0,93	14,06
					2		56,4	ASGQAFELILSPR	0,89	5,75	1,12	14,06
TBA1A_HUMAN	4	Tubulina alpha-1A chain	58	50104	2	5,3	58,5	AVFVDLEPTVIDEV	1,13	0,00	0,89	3,57
TBA1B_HUMAN	5	Tubulina de cadeia alfa-1B	56	50120	2	6,4	56,4		1,06	2,86	0,94	9,31
TBA8_HUMAN	3	Tubulina de cadeia alfa-8	42	50062	2	8	41,6	FDGALNVDLTFQTNLV PYPR	1,00	5,56	1,00	7,29



**Figura 19.** Análise por *Gene Ontology* das proteínas identificadas por MS de células-tronco mesenquimais de medula óssea humana durante a indução da osteogênese.

## **DISCUSSÃO**

## 5. DISCUSSÃO

As células-tronco mesenquimais (CTMs) isoladas da medula óssea, do tecido adiposo e do cordão umbilical são definidas como células multipotentes, capazes de auto-renovação e que podem diferenciar em adipócitos, condrócitos e osteoblastos (PITTENGER *et al.*, 1999). Estas características fazem das células-tronco uma fonte excelente para a terapia celular e gênica aplicada a várias doenças (ABDALLAH; KASSEM, 2008; CAPLAN; BRUDER, 2001; KASSEM; KRISTIANSEN; ABDALLAH, 2004).

Nos últimos 20 anos, vários pesquisadores vem trabalhando para desenvolver novas estratégias de isolamento, expansão e diferenciação dessas células, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, tentando controlar suas funções e estabelecer novos perfis terapêuticos. Para isto duas abordagens têm sido sugeridas: a da genética e a do microambiente. Na primeira, fatores de transcrição específicos são super-expressos com a finalidade de induzir a diferenciação em um determinado tipo celular. Na segunda, as CTMs são expostas a diferentes estímulos contendo fatores de transcrição, hormônios e componentes da matriz extracelular para induzir a diferenciação em um tipo celular específica em função dos sinais recebidos pela célula em seu microambiente (KASSEM; KRISTIANSEN; ABDALLAH, 2004). Portanto, é esperado que o entendimento dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos na osteogênese pode fornecer novos recursos para o melhor entendimento e tratamento das doenças degenerativas do osso incluindo a osteoporose (KASSEM; ABDALLAH; SAEED, 2008).

Embora estudos transcricionais tenham avançado nesse sentido, para que tenhamos uma compreensão completa dos mecanismos que regulam a auto-renovação e a plasticidade das células-tronco faz-se necessário a integração entre o transcriptoma, proteoma e interatoma. Um dos primeiros trabalhos a determinar um mapa proteômico

bidimensional de referência de CTM foi realizado em 2006 por Wagner e colaboradores (WAGNER *et al.*, 2006). Os autores analisaram o padrão proteômico e transcriptômico diferencial de preparações de CTM da medula óssea humana, isoladas e cultivadas em diferentes meios de cultura (10% ou 2% de soro bovino fetal). Cento e trinta e quatro “spots” protéicos foram analisados por MADI-TOF-MS, correspondendo a 81 proteínas diferentes, a maior parte pertencente à categoria de proteínas do citoesqueleto (WAGNER *et al.*, 2006). Um número relativamente pequeno de estudos investigativos, utilizando estratégia proteômica e mapeamentos de perfis de proteínas de células-tronco foi publicado.

O objetivo do presente estudo foi analisar o perfil proteômico das fases de diferenciação das células-tronco mesenquimais da medula óssea de rato e humana durante o processo de osteogênese.

O critério de isolamento das CTMs da medula óssea de ratos foi a capacidade destas células em aderir à superfície plástica. Os resultados da fosfatase alcalina e da formação de mineralização das amostras indicam que as células utilizadas em nosso estudo apresentaram diferenciação osteogênica. No período de 10 dias, as CTMs de rato foram diferenciadas (MTS) (Figura 7) tiveram o maior nível de expressão de fosfatase alcalina. Este aumento está bem caracterizado como marcador das fases iniciais de osteopoiese (COHEN, 2006). Em osteoblastos, a fosfatase alcalina tem o papel de gerar fosfato inorgânico para a mineralização a partir de ésteres de fosfato, como β-glicerofosfato (ADDISON *et al.*, 2007). A propriedade de formar matriz óssea é uma das principais funções dos osteoblastos maduros comprovando que os mesmos estão diferenciados e funcionais (Figura 9). O ensaio de proliferação celular demonstrou que os estímulos para a diferenciação em osteoblasto

(ácido ascórbico,  $\beta$ -glicerofosfato e dexametasona) afetaram a capacidade proliferativa das células. Para CTMs de rato, a taxa de proliferação teve um pequeno aumento após 24 horas, entretanto nos outros períodos praticamente essa taxa se manteve contínua em relação ao experimento controle (Figura 11).

A expressão gênica e a capacidade das CTMs diferenciarem em osteoblastos após os estímulos também foram avaliadas. Após os estímulos para a diferenciação, as CTMs apresentaram diferenças no nível de expressão gênica no período de 7 dias. Isso ocorreu devido ao fato que os genes ALP, RUNX2, BSP, OC e OSTERIX estão diretamente relacionados com processo de diferenciação osteoblástica. Embora o gene MSX2 seja um regulador de transcrição no desenvolvimento ósseo (TOWLER *et al.*, 1994), houve aumento do seu nível de expressão nas células cultivadas com ausência de estímulo para a diferenciação. Estudos demonstram que as células-tronco apresentam-se em uma estado multidiferenciado, com expressão de genes relacionados às diferentes vias de diferenciação que as mesmas podem assumir (ZIPORI, 2004a; ZIPORI, 2004b; 2005; WOODBURY REYNOLDS e BLACK, 2002). Durante a diferenciação, de acordo com Zipori (2004a), o conjunto de genes seria reduzido, enquanto que um pequeno grupo de genes teria os níveis de expressão aumentados devido à diferenciação, nesse caso genes relacionados à osteogênese. Entretanto, estudos mostram que ocorre a expressão do gene PPARG, característico de adipócitos, ao longo da diferenciação em osteoblasto contradizendo a hipótese de Zipori (AKUNE *et al.*, 2004).

Devido à importância da fosfatase alcalina (ALP) na diferenciação osteogênica, esta é considerada um marcador específico de osteoblastos (MINGUELL; ERICES; CONGET, 2001). Estudos têm demonstrado que a expressão do gene ALP se inicia a partir do quarto dia de

diferenciação osteogênica e diminui durante a fase de mineralização que ocorre a partir do décimo quarto ao vigésimo primeiro dia da diferenciação (KULTERER *et al.*, 2007).

O fator de transcrição RUNX2 (RUNX2 – *Runt-related Transcription fator*) é o primeiro fator específico de osteoblastos identificado com o papel na manutenção do fenótipo osteogênico (LONG, 2001). A ocorrência de mutação nesse gene causa disfunção óssea, indicando que este é importante no processo de formação óssea (NAKASHIMA; CROMBRUGGHE, 2003).

A sialoproteína óssea (BSP) é uma glicoproteína ácida fosforilada e sulfatada que é achada quase que exclusivamente em tecidos conjuntivos mineralizados. Das proteínas ósseas não colágenas caracterizadas, a BSP é a única que parece ter as propriedades físicas e químicas para exercer o papel de nucleação dos cristais de hidroxiapatita durante o processo de mineralização de tecidos conjuntivos, como osso e cimento. (GANSS *et al.*, 1999) Portanto, parece ter papel fundamental no processo de mineralização tecidual, *in vivo* (COGAN *et al.*, 2004), devido também à sua capacidade de se ligar, simultaneamente, à hidroxiapatita e a integrinas de superfícies celulares. A expressão do gene da BSP é induzida por osteoblastos recém-formados e regulada por fatores e citocinas que estimulam e suprimem a formação óssea.

A osteocalcina (OC) é um peptídeo secretado por osteoblastos maduros, condróцитos hipertrofiados e odontoblastos (VIEIRA, 1999; GUNDBERG, 2000). Apesar de ser primariamente depositada na matriz óssea recém-formada, uma pequena fração entra em circulação, caracterizando essa proteína como marcador da atividade osteoblástica. Apesar de ser depositada em quantidades significativas na matriz óssea, sendo uma das proteínas não colágenosas mais abundantes, não é um marcador de reabsorção óssea, pois é

totalmente destruída devido ao processo de reabsorção promovida pelos osteoclastos. Adicionalmente, estudos indicam que o aparecimento e aumento da produção dessa proteína são coincidentes com o início do processo de mineralização. A produção de osteocalcina é o marcador de osteoblasto maduro (VIEIRA, 1999; GUNDBERG, 2000). Outros estudos, *in vitro* e *in vivo*, sugerem que a osteocalcina tenha importante papel no recrutamento e diferenciação dos osteoclastos (CHENU, 1994).

O fator de transcrição dedo de zinco ou de osteoblasto (OSTERIX) é o responsável pelo direcionamento da diferenciação das células-tronco até o estágio pré-osteoblasto (MEURY *et al.*, 2006). O grau de diferenciação das células-tronco mesenquimais para osteoblastos pode ser controlado pelas células endoteliais, iniciando o recrutamento de células osteoprogenitoras no local da remodelação óssea e mantendo-as em estágio de pré-osteoblastos para evitar a deposição de mineral dentro dos vasos. A formação óssea é um processo finamente regulado e caracterizado por uma sequência de eventos que se inicia pelo comprometimento das células mesenquimais indiferenciadas que se diferenciam em osteoprogenitoras e são recrutadas para o local da remodelação óssea mantendo-as em estágio pré-osteoblastos para evitar a deposição de mineral dentro dos vasos. Desta forma, os pré-osteoblastos têm de migrar para os vasos em direção ao local de remodelação/formação óssea e rapidamente diferenciar em osteoblastos maduros depositando a matriz osteóide e posteriormente a mineralização. Tanto o processo de diferenciação quanto a sua função são governados por fatores de transcrição, principalmente, RUNX2 e OSTERIX (KARSENTY & WAGNER, 2002; NAKASHIMA *et al.*, 2002).

No estudo proteômico das fases de diferenciação osteoblástica utilizamos duas abordagens metodológicas: “*shotgun proteomics*” para a catalogação de proteínas durante o processo e marcação com iTRAQ para quantificação relativa.

Na primeira abordagem foram identificadas proteínas que estão envolvidas com o processo de diferenciação como anexina A1 (Tabela 4), que também foi identificada na segunda abordagem. A anexina A1 é uma proteína ligadora de fosfolipídeo-cálcio que promove a fusão da membrana celular e está envolvida no processo de exocitose, no entanto, é responsável pela regulação da atividade da fosfolipase A2. Outras anexinas estão envolvidas nesse processo de ligação a lipídeos como Anexina A2 e A4 (MORSCZECK *et al.*, 2009). A Anexina A2 está geralmente envolvida na mineralização osteoblástica e também no *up-regulated* na CTMs após a indução por fator transformador de crescimento beta-1 (TGF-β-1: *Transforming grow factor β-1*) (GILLETE; NIELSEN-PREISS, 2004; WANG, 2004).

Outras proteínas que também foram identificadas durante o processo de diferenciação osteogênica foram: endoplasmina, vimentina, cofilina-1 e destinina (Tabela 3). Endoplamina é uma proteína chaperona que atua no processamento e transporte de proteínas secretadas e também tem o papel de atividade ATPase. Vimentina é encontrada em vários filamentos intermediários nas células não-epiteliais e, especialmente, nas células mesenquimais. Cofilina-1 e destinina são proteínas-controles da realização dos procedimentos de polimerização e despolimerização de actina na célula (MORSCZECK *et al.*, 2009).

Na segunda abordagem, foi identificada a proteína nucleofosmina (Tabela 9) que participa de diversos processos celulares dentre eles: proliferação celular, regulação de supressores tumorais, duplicação do centrossoma dentre outros (COLOMBO *et al.*, 2002;

GIMENEZ *et al.*, 2010; PIANTA *et al.*, 2010). Outras proteínas identificadas foram a Rab-1A, Rab-4A, Rab-14 e Rab-15 (Tabela 9), pertencente à família das pequenas GTPases, responsáveis pelo tráfego de endossomos e transdução de sinal de pequenas GTPases (PREKEIRS *et al.*, 2000; SCALES *et al.*, 2002). A proteína transgelina (Tabela 9), também foi identificada, sendo um dos primeiros marcadores de diferenciação do músculo liso durante a embriogênese. A expressão de transgelina também é observado em tecidos embrionários esquelético e cardíaco (LI *et al.*, 2008). Apesar da variação obtida por esse método, este é bastante eficaz tendo em vista que a metodologia de eletroforese bidimensional utiliza valores duas vezes maiores em relação à intensidade do spot o que equivale à variação de 100% das proteínas diferencialmente expressas.

O isolamento de células-tronco da medula óssea humana baseou-se na capacidade destas células aderirem à superfície plástica e no padrão de marcação de marcadores específicos para CTM. Os marcadores de superfície CD13, CD29, CD105, CD73, CD90 e CD166 foram positivos enquanto que os marcadores CD24, CD45, CD14, CD31, CD54, CD106, caderina 5 e CD51/61 (Tabela 11) não expressaram mostrando que as células em estudo eram células mesenquimais (COVAS *et al.*, 2005; DA SILVA MEIRELLES *et al.*, 2006; MARTINEZ *et al.*, 2007).

A imunofenotipagem de células mesenquimais cultivadas em MEM (Tabela 11) revelou, na cultura primária, uma discreta contaminação de células CD34+ e CD54 sendo que, após 7 dias de cultura, estes valores foram reduzidos. A cultura primária apresentou uma população celular heterogênea, composta por células progenitoras hematopoiéticas, endoteliais e mesenquimais.

Os resultados de fosfatase alcalina e do processo de mineralização (Figura 10) indicam que as células utilizadas apresentaram diferenciação osteogênica. No período de 10 dias, as células que foram diferenciadas (MTS) (Figura 8) tiveram um menor nível de expressão de fosfatase alcalina quando comparado com o período de 14 dias. Ambos os períodos apresentaram maior nível de expressão quando comparado com as células que foram cultivadas com ausência de estímulo osteogênico.

O ensaio de proliferação celular demonstrou que os estímulos para a diferenciação em osteoblasto afetaram a capacidade proliferativa das células. A taxa de proliferação teve um pequeno aumento nos períodos de 3 e 7 dias, entretanto no período de 10 dias ocorreu um decréscimo, em relação ao experimento controle (Figura 12). Tal fato pode ser atribuído à diferenciação das células progenitoras em osteoblastos maduros que são responsáveis pela formação da matriz óssea (VIEIRA, 1999; GUNDBERG, 2000).

Após os estímulos para a diferenciação, as CTMs apresentaram diferenças no nível de expressão gênica, principalmente no período de 7 dias. Os genes: ALP, OP, OC e RANK-L estão diretamente relacionados com processo de diferenciação osteoblástica (Figura 14). Apenas o gene ALP teve sua expressão aumentada em 14 dias. Já os genes: COL I, RUNX2 e BSP tiveram baixa expressão quando comparado com a expressão das células controle.

Durante o processo de reparo do tecido conjuntivo, na fase inicial, predomina a formação de colágeno, principalmente do tipo I (COL I), um dos principais constituintes nos tecidos e uma proteína de importância fundamental na constituição da matriz extracelular, sendo responsável por grande parte de suas propriedades físicas (COTRAN, 1996). As proteínas da matriz extracelular (MEC) do osso e da dentina são semelhantes, consistindo primariamente de colágeno tipo I, proteínas ácidas e proteoglicanas. Embora o colágeno

forme um arcabouço para a deposição dos íons cálcio e fosfato na formação de hidroxiapatita, as proteínas não colágenas controlam o início e o crescimento desses cristais. Apesar dessas similaridades, essas proteínas são encontradas em concentrações diferentes entre as matrizes, assim a osteopontina (OP) é predominante no tecido ósseo e presente em pequena quantidade na dentina. A fosfatase alcalina, o colágeno tipo I e a osteocalcina são marcadores bioquímicos de formação no metabolismo ósseo, sendo os dois primeiros marcadores dos estágios iniciais de diferenciação osteoblástica, e o último, dos estágios mais avançados.

O ativador do receptor do fator ligante nuclear kappa ou RANKL induz a diferenciação terminal dos osteoclastos e a sua ativação, sendo que, a osteoprotegerina regula negativamente ligando-se ao RANKL, inibindo o “turnover” ósseo pelos osteoclastos.

Ikeda e colaboradores (2001) determinaram a existência de 3 isoformas, duas moléculas transmembrana, o RANKL1 e RANKL2, sendo que, o RANKL2 tem apenas um pequeno domínio intracelular e o RANKL3 que não apresenta domínio transmembrana e corresponde a forma solúvel do RANKL (sRANKL). Todas as três formas protéicas têm participações similar na biologia do osteoclasto (IKEDA *et al.*, 2001).

Para a análise proteômica durante as fases de diferenciação de CTM humana, foi utilizada a abordagem de marcação com iTRAQ para quantificação relativa. Através desse método foi possível identificar e estimar a expressão de proteínas envolvidas com os seguintes processos biológicos: transporte, diferenciação celular, secreção, transdução de sinal e sinalização intracelular (Figura 19). Novamente foi possível identificar proteína pertencente à família das pequenas GTPases, Rab-10, responsável pelo tráfego e transdução de sinal de pequenas GTPases (PREKEIRS *et al.*, 2000; SCALES *et al.*, 2002).

Mais recentemente, pesquisadores descobriram o papel de pequenas vesículas (microvesículas) na transferência de informação e na intercomunicação célula-célula. Essas microvesículas são consideradas micropartículas derivadas da membrana plasmática, as quais são naturalmente liberadas no ambiente extracelular, podendo ser produzidas por diferentes tipos celulares e plaquetas (CHEN *et al.*, 2010). Funcionalmente essas vesículas podem transferir qualquer tipo de molécula (proteínas, ácidos nucléicos ou lipídeos) podendo dessa forma inferir uma ação pleiotrópica em suas células alvo (BONVENTRE, 2009). Estudos realizados por Chen e colaboradores (2010) mostram que as CTMs podem atuar por meio de um mecanismo alternativo de comunicação celular secretando microvesículas enriquecidas com miRNAs para a regulação da biofisiologia tecidual (CHEN *et al.*, 2010).

A análise proteômica do presente estudo possibilitou a identificação de proteínas envolvidas nos processos de transdução de sinal, secreção e transporte celular. Isto pode auxiliar no maior entendimento das células-tronco e o seu processo de diferenciação. Entretanto, novos estudos proteômicos devem ser realizados para que possamos encontrar novas alternativas para procedimentos terapêuticos.

## **CONCLUSÃO**

## 6. CONCLUSÃO

Um das áreas da medicina regenerativa é a diferenciação das células-tronco na linhagem osteogênica para subsequente uso na engenharia de tecido ósseo e na cirurgia reconstrutiva. No entanto, o uso destas células depende principalmente da sua habilidade em alcançar a diferenciação osteogênica *in vitro*. Uma das limitações para este objetivo é a existência da variação individual entre os doadores assim como a variabilidade das células isoladas (de células progenitoras até células já inicialmente comprometidas para uma linhagem) devido aos métodos de isolamento ainda não muito específicos. Estas variações refletirão na capacidade das células em responder aos sinais osteogênicos, podendo, portanto, comprometer o seu uso terapêutico. A diferenciação osteogênica das células-tronco provavelmente envolve múltiplas vias de sinalização e muitos estudos procuram identificar fatores que participam desta via na tentativa de conhecer os mecanismos que governam a diferenciação e consequentemente obter uma estratégia cada vez mais eficiente para minimizar as variações e assim alcançar o objetivo maior que é a aplicação terapêutica.

Neste contexto, os nossos resultados nos levam a concluir que:

- as CTMs de medula óssea de rato Wistar expressam genes que estão envolvidos na diferenciação osteogênica quando estimuladas *in vitro* formando matriz óssea no período de 14 dias, ou seja, o fator estimulante no microambiente é de fundamental importância;
- as CTMs de medula óssea humana apresentaram resultados semelhantes com as CTMs de ratos em nível genômico durante a diferenciação osteogênica, entretanto quando estimuladas *in vitro* formaram a matriz óssea no período de 21 dias;

- utilizando duas abordagens proteômicas, foi possível identificar proteínas importantes que estão envolvidas no processo de diferenciação. Mas cabe salientar que, embora tenham sido detectados genes que parecem envolvidos no processo de diferenciação, isso não teve reflexo no proteoma dessas células nos períodos de 7 e 14 dias da indução de diferenciação à osteogênese, o que indica que a maior parte da funcionalidade dessas células quanto aos outros processos biológicos estão preservados, como por exemplo a proliferação celular permaneceu sem grandes alterações. Isso indica que manipulações de isolamento, cultivo e indução da diferenciação dessas células não afetaram o proteoma, com aspectos positivos para a utilização de células-tronco mesenquimais em terapia celular.
- do ponto de vista metodológico, esse trabalho abre perspectivas da utilização de estratégias proteômicas baseadas na marcação por isóbaros em combinação com separação de proteínas por eletroforese unidimensional SDS-PAGE para a análise de amostras biologicamente complexas e de quantidades limitadas de obtenção como células-tronco mesenquimais.

# **REFERÊNCIAS**

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLAH, B. M.; KASSEM, M. 2008. Human mesenchymal stem cells: from basic biology to clinical applications. **Gene Therapy**, vol. 15, p. 109-116.

ADDISON, W.N.; AZARI, F.; SORENSEN, E.S.; KAARTINEN, M.T.; MCKEE, M.D. 2007. Pyrophosphate Inhibits Mineralization of Osteoblast Cultures by Binding to Mineral, Up-regulating Osteopontin, and Inhibiting Alkaline Phosphatase Activity. **The Journal of Biological Chemistry**. 282(21):15872–15883.

AGGARWAL, S.; PITTINGER, M. F. 2005. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. **Blood**, 105 (4): 1815-1822.

AKUNE, T.; OHBA, S.; KAMEKURA, S.; YAMAGUCHI , M.; CHUNG, U.; KUBOTA, N.; TERAUCHI, Y.; HARADA, Y.; AZUMA, Y.; NAKAMURA, K.; KADOWAKI, T.; KAWAGUCHI, H. 2004. PPAR $\gamma$  insufficiency enhances osteogenesis through osteoblast formation from bone marrow progenitors. **The Journal of Clinical Investigation**. 113 (6): 846-855.

ANDERSON, H.C. 1969. Vesicles associated with calcification in the matrix of epiphysis cartilage. **J. Cell Biol.** 41 59–72.

ANSELME , K.; BROUX , O.; NOEL , B.; BOUXIN , B.; BASCOULERGUE , G.; DUDELMEL , A.F.; BIANCHI , F.; JEANWLS, J.; HARDOUIN , J., P. 2002. In vitro control of human bone marrow stromal cells for tissue engineering. **Tissue Eng.** 8 941–953.

AUBIN, J. E. Advances in the osteoblast lineage. **Biochem. Cell Biol.** 1998; 76: 899–910.

AWAD, H. A. et al. 1999. Autologous mesenchymal stem cell-mediated repair of tendon. **Tissue Engineering**, (5) : 267-277.

BAKSH, D.; SONG, L.; TUAN, R. S. 2004. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. **J. Cell. Mol. Med.** 8 (3), 301–316.

BARRY, F. P.; MURPHY, J. M. 2004. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, 36: 568–584.

BONVENTRE, J.V. 2009. Microvesicles from mesenchymal stromal cells protect against acute kidney injury. **Journal of the American Society of Nephrology**. 20(5):927-928.

BOCELLI-TYNDALL, C. et al. 2007. Bone marrow mesenchymal stromal cells (BM-MSCs) from healthy donors and auto-immune disease patients reduce the proliferation of autologous- and allogeneic-stimulated lymphocytes in vitro. **Rheumatology**, 46: 403–408.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. v.7, pp.248-254, 1976.

CAPLAN, A. I. 1991. Mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Research*, 9 (5), pp. 641-650.

CAPLAN, A. I.; BRUDER, S. P. 2001. Mesenchymal stem cells: Building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends in Molecular Medicine*, 7 (6), pp. 259-264.

ÇELEBI, B.; ELÇİN, Y. M. 2009. Proteome analysis of rat bone marrow mesenchymal stem cell subcultures. *J.Proteome Res.*, 8 (5), 2164–2172.

ÇELEBI, B.; ELÇİN, E.; ELÇİN, Y. M. 2010. Proteome analysis of rat bone marrow mesenchymal stem cell differentiation. *J.Proteome Res.* May, [Epub ahead of print].

CHATEAUVIEUX, S. et al. 2007. Molecular profile of mouse stromal mesenchymal stem cells. **Physiological Genomics**, 29 (2), pp. 128-138.

CHEN, T.S.; LAI, R.C.; LEE, M.M.; CHOO, A.B.; LEE, C.N.; LIM, S.K. 2010. Mesenchymal stem cell secretes microparticles enriched in pre-microRNAs. **Nucleic Acids Res.** 38(1):215-224.

COHEN MM JR. 2006. The new bone biology: Pathologic, molecular, and clinical correlates. Part A. **Am J Med. Genet.**, 2006; 140A: 2646–2706.

COLOMBO, E. et al., 2002. Nucleophosmin regulates the stability and transcriptional activity of p53. **Nature Cell Biology**, v.4 (7), pp. 529-533.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L.; SCROEN, F.J. 1996. Patologia Estrutural e Funcional. 4 ed. Rio de Janeiro, Ganabara Koogan.

COGAN, G.; BANSAL, A.K.; IBRAHIM, S.; ZHU, B.; GOLDBERG, H.A.; GANSS, B.; et al. 2004. Analysis of human bone sialoprotein in normal and pathological tissues using a monoclonal antibody (BSP 1.2 mab). **Connect Tissue Res.** 45(1):60-71.

CHENU, C.; COLUCCI, S.; GRANO, M.; et al. 1994. Osteocalcin induces chemotaxis, secretion of matrix proteins and calcium-mediated intracellular signaling in human osteoclasts-like cells. **J. Cell. Biol.** 127:1149-1158.

DA SILVA MEIRELLES L, CHAGASTELLES PC, NARDI NB. 2006. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J. Cell Sci.*, 119 (11):2204-2213.

DEANS, R.J.; MOSELEY, A. B. 2000. Mesenchymal stem cells: Biology and potential clinical uses. *Experimental Hematology*, 28: 875-884.

DOMINICI, M. et al., 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8 (4): 315- 317.

FEHRER, C.; LEPPERDINGER, G. 2005. Mesenchymal stem cell aging. *Experimental Gerontology* 40 (12), pp. 926-930.

FERRARI, G.; MAVILIO, F. 2002. Myogenic stem cells from the bone marrow: a therapeutic alternative for muscular dystrophy? *Neuromuscular Disorders*, 12: S7-S10.

FRIEDENSTEIN, A. J.; PIATEZKY-SHAPIRO, I. I.; PETRAKOVA, K. V. 1966. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 16 (3), pp. 381-390.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. 2007. *Tratado de Histologia em cores*. 3<sup>a</sup> Edição. Editora Guanabara Koogan S. A. Rio de Janeiro, RJ.

GANSS, B.; KIM, R.H.; SODEK, J. 1999. Bone sialoproteína. *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.* 10(1):79-98.

GILLETTE, J.M.; NIELSEN-PREISS, S. 2004. The role of annexin 2 in osteoblastic mineralization. *Journal of Cell Science*. 117, pp. 441-449.

GIMENEZ, M.; SOUZA, V.C.O.; IZUMI, C.; BARBIERI, M.R.; CHAMMAS, R.; OBA-SHINJO, S.M.; UNO, M.; MARIE, S.K.N.; ROSA, J.C. 2010. Proteomic analysis of low- to high-grade astrocytomas reveals an alteration of the expression level of rat kinase inhibitor protein and nucleophosmin. *Proteomics*. 15, pp. 2812-2821.

GRAVES, P.R.; HAYSTEAD, T.A.J. 2002. Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 66, p.39-63.

GROVE, J.E.; BRUSCIA, E.; KRAUSE, D.S. 2004. Plasticity of Bone Marrow-Derived Stem Cells. *Stem Cells*, 22:487-500.

GUNDBERG, C.M. 2000. Biochemical markers of bone formation. *Clin. Lab. Med.* 20(3):489-501.

HALE, L.V.; M.A.; Y.F.; SANTERRE, R.F. 2000. Semi-quantitative Xuorescence analysis of calcein binding as a measurement of in vitro mineralization. **Calcif. Tissue Int.** 67 80–84.

HERZOG EL, CHAI L, KRAUSE DS. 2003. Plasticity of marrow-derived stem cells. **Blood**, 102 (10): 3483-3493.

HORWITZ, E. M. et al. 2005. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, 7, (5) : 393-395.

IKEDA, T.; UTSUYAMA, M.; HIROKAWA, K. 2001. Expression profiles of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand, receptor activator of nuclear factor kappaB, and osteoprotegerin messenger RNA in aged and ovariectomized rat bones. **J. Bone Miner. Res.** 16: 1416–1425.

JACKSON, L. et al., 2007. Adult mesenchymal stem cells: differentiation potential and therapeutic applications. **J. Postgrad. Med.**, 53 (2): 121-126.

JAISWAL, N.; HAYNESWORTH, S. E., CAPLAN, A. I.; BRUDER, S. P. 1997. Osteogenic Differentiation of Purified, Culture-Expanded Human Mesenchymal Stem Cells In Vitro. **Journal of Cellular Biochemistry**, 64: 295–312.

JAISWAL, B.S., TUR-KASPA, I., DOR, J., MASHIACH, S. AND EISENBACH, M. 1999. Human sperm chemotaxis: is progesterone a chemoattractant? **Biol. Reprod.**, 60, 1314–1319.

JIANG, Y. *et al.*, 2002. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. **Nature**, 418: 41-49.

JUNQUERIA, L.C.; CARNERIO, J.; KELLY, R.O. 1992. Basic Histology, seventh ed., Prentice Hall, New York, pp. 132–140.

KARSENTY, G.; WAGNER, E.F. 2002. Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. **Dev. Cell.** 2(4):389-406.

KASSEM, M.; ABDALLAH, B.M.; SAEED, H. 2008. Osteoblastic cells: differentiation and transdifferentiation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, vol. 473, p. 183-187.

KASSEM, M.; KRISTIANSEN, M.; ABDALLAH, B. M. 2004. Mesenchymal Stem Cells: Cell Biology and Potential Use in Therapy. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, 95, 209-214.

KIM, J. W. *et al.*, 2004. Mesenchymal progenitor cells in the human umbilical cord. **Ann Hematol**, 83: 733–738.

KOY, D.; WEISS, S. 2000. Why stem cells? **Science**, 287: 1439-1441.

KULTERER, B. *et al.*, 2007. Gene expression profiling of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow during expansion and osteoblast differentiation. **BMC Genomics**, v.8 (70).

LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.15, pp. 680-685.

LEE OK, KUO TK, CHEN W, LEE K, HSIEH S, CHEN T. 2004. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. **Blood**, 103 (5): 1669-1675.

LI, M.; LI, S.; LOU, Z.; LIAO, X.; ZHAO, X.; MENG, Z.; BARTLAM, M.; RAO, Z. 2008. Crystal structure human transgelin. **Journal of Structural Biology**. 162:229-236.

LONG MW. 2001. Osteogenesis and Bone-Marrow-Derived Cells. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**. 27(3): 677–690.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v.193, n.1, p.265-75, Nov. 1951.

LUYTEN, F.P. Mesenchymal stem cells in osteoarthritis. 2004. **Curr. Opin. Rheumatol.**, 16:599–603.

MARESCHI, K. et al. 2006. Expansion of mesenchymal stem cells isolated from pediatric and adult donor bone marrow. **Journal of Cellular Biochemistry**, 97 (4), pp. 744-754.

MINGUELL, J.J.; ERICES, A.; CONGET, P. 2001. Mesenchymal Stem Cells. **Experimental Biology and Medicine**, 226 (6): 507-520.

MEURY, T.; VERRIER, S.; ALINI, M. 2006. Human endothelial cells inhibit BMSC differentiation into mature osteoblasts in vitro by interfering with osterix expression. **J. Cell Biochem.** 98(4):992-1006.

MORSCZECK, C.; et al., 2009. Comparison of human dental follicle cells (DFCs) and stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) after neural differentiation in vitro. **Clin. Oral Investig.**, Jul [Epub ahead of print].

MOSMANN, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v.65, n.1-2, p.55-63.

NAKASHIMA, K.; CROMBRUGGHE, B. D.E. 2003. Transcriptional mechanisms in osteoblast differentiation and bone formation. **TRENDS in Genetics**, 19 (8): 458-466.

NAKASHIMA, K. ZHOU, X.; KUNKEL, G. ZHANG, Z.; DENG, J.M.; BEHRINGER, R.R.; et al. 2002. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. **Cell**. 108(1):17-29

NEUHOFF, V.; AROLD, R.; TAUBE, P.; EHRHARDT, J.B. 1988. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing usig gels clear background at nanogram sesitivity usig Coomassie Brilliant Blue G-250. **Eletrophoresis**, v.9, pp.255-262.

OHGUSHI, H. *et al.*, 2004. Clinical Application of Marrow Mesenchymal Stem Cells for Hard Tissue Repair. **Yonsei Medical Journal**, 45: 61-67.

PHINNEY, D. G. 2002. Building a consensus regarding the nature and origin of mesenchymal stem cells. **Journal of cellular biochemistry, Supplement** 38, pp. 7-12.

PIANTA, A. *et al.*, 2010. Nucleophosmin is overexpressed in thyroid tumors. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.397 (3), pp. 499-1983.

PITTENGER, M.F. *et al.*, 1999. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. **Science**, vol. 284, p.143-147.

PREKERIS, R.; KLUMPERMAN, J.; SHELLER, R.H. 2000. A Rab11/Rip11 protein complex regulates apical membrane trafficking via recycling endosomes. **Mol. Cell**, v.6 pp. 1437-1448.

PROCKOP, D. J. 1997. Marrow Stromal Cells as Stem Cells for Nonhematopoietic Tissues. **Science**, 276: 71-74.

PUTCHLER , H.; MELOAN, S.; TERRY, M.S. 1969. On the history and mechanism of alizarin and alizarin red S stains for calcium. **J. Histochem. Cytochem.** 17 110–124.

REYES, M. *et al.*, 2002. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. **J. Clin. Invest.**, 109:337–346

SCALES, S.J. *et al.*, 2002. Amisyn, a novel syntaxin-binding protein that may regulate SNARE complex assembly. **J. Biol. Chem.**, 277, pp. 28271-28279.

SHADFORTH, I. P. *et al.*, 2005. "i-Tracker: For quantitative proteomics using iTRAQ". **BMC Genomics** 6: 145.

- SONG, L.; TUAN, R. S. 2004. Transdifferentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow. **FASEB Journal**, 18 (9): 980-982.
- SOTTILE, V. *et al.*, 2002. Stem Cell Characteristics of Human Trabecular Bone-derived Cells. **Bone**, 30 (5): 699-704.
- SPEES, J. L. *et al.*, 2003. Differentiation, cell fusion, and nuclear fusion during ex vivo repair of epithelium by human adult stem cells from bone marrow stroma. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 100 (5): 2397–2402.
- STENMARK, H.; OLKKONEN, V.M. 2001. The Rab GTPase family. **Genome Biology**. 2(5):1-7.
- SUN, H. J. *et al.*, 2006. A proteomic analysis during serial subculture and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cell. **J. Orthop. Res.**, 24, 2059–2071.
- TANIMURA, A. *et al.*, 1983. Matrix vesicles in atherosclerotic calcification. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** 172: 173–177.

TOWLER, D.A.; RUTLEDGE, S.; RODAN, G.A. 1994. Msx-2/Hox 8.1: a transcriptional regulator of the rat osteocalcina promoter. **Mol. Endocrinol.**, v.8, pp. 1484-1493.

TSAI RYL, KITTAPPA R, MCKAY RDG. 2002. Plasticity, Niches, and the Use of Stem Cells. **Developmental Cell**, 2: 707-712.

VIEIRA, J.G.H. 1999. Considerações sobre os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo e sua utilidade prática. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.** 43(6):415-422.

VERFAILLIE, C. M. 2002. Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. **TRENDS in Cell Biology**, 12 (11): 502-508.

WAGNER, W.; FELDMANN, R.E.; WEIN, F. 2006. The heterogeneity of human mesenchymal stem cell preparations--evidence from simultaneous analysis of proteomes and transcriptomes. **Exp. Hematol.**, 34:536-548.

WANG, D. *et al.*, 2004. Proteomic Profiling of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells upon Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 Stimulation. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 279, 42, pp. 43725-43734.

WOODBURY, D.; REYNOLDS, K.; BLACK, I.B. 2002. Adult Bone Marrow Stromal Stem Cells Express Germline, Ectodermal, Endodermal, and Mesodermal Genes Prior to Neurogenesis. **Journal of Neuroscience Research.** 96:908–917.

WU, L.N. *et al.*, 1995. Morphological and biochemical characterization of mineralizing primary cultures of avian growth plate chondrocytes: evidence for cellular processing of Ca<sup>2+</sup> and Pi prior to matrix mineralization. **J. Cell. Biochem.** 57 218–237.

YE, N. S. *et al.*, 2006. Effect of 5-azacytidine on the protein expression of porcine bone marrow mesenchymal stem cells in vitro. **Genomics, Proteomics Bioinf.**, 4 (1), 18–25.

ZAGO, M. A.; COVAS, D. T. 2006. Células-tronco, a nova fronteira da medicina. São Paulo: Ed. Atheneu.

ZHANG, Q. *et al.*, 2006. Stem cells and cardiovascular tissue repair: Mechanism, methods, and clinical applications. **Journal of Cardiothoracic-Renal Research,** 1: 3-14.

ZIPORI, D. 2004. The nature of stem cells: state rather than entity. **Nature Reviews in Genetics.** 5: 873-878.

ZIPORI, D. 2004. Mesenchymal stem cells: harnessing cell plasticity to tissue and organ repair. **Blood Cells, Molecules, and Diseases.** 33:211 –215.

ZUK, P. A. *et al.*, 2001. Multilineage Cells from Human Adipose Tissue: Implications for Cell- Based Therapies. **Tissue Engineering,** 7 (2): 211-228.

ZVAIFLER, N. J. *et al.*, 2000. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. **Arthritis Res.,** 2:477–488.

# **ANEXOS**

## 8. ANEXOS

### ANEXO A – Comitê de Ética no Uso de Animais - Faculdade de Medicina de Catanduva



**Faculdades Integradas “Padre Albino”**  
**Comissão de Ética no Uso de Animais - Faculdade de Medicina de Catanduva**  
 Av. São Vicente de Paulo, 1455 – Catanduva – SP – CEP: 15.809-145  
 Fone: (17) 3531-3229 – 3531-3780 – e-mail: [coremo.famceua@terra.com.br](mailto:coremo.famceua@terra.com.br)

### C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Trabalho (Protocolo nº 07.09.08-01), intitulado: **“Engenharia de tecido ósseo: avaliação in vitro e in vivo do biomaterial hábrido fosfato de cálcio/ácido poliláctico-co-glicólico e células osteoblásticas derivadas de células-tronco”**, de autoria de **Adalberto Luiz Rosa**, foi aprovado em 10.05.2007, por estar de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) das Faculdades Integradas “Padre Albino” – Catanduva - SP; de acordo com o parecer emitido pelo Prof. Dr. Izidro Pimenta de Moraes, membro efetivo desta Comissão.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEUA, os relatórios parciais e/ou final do desenvolvimento do Projeto de Pesquisa.

Catanduva (SP), 10 de maio de 2007.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'M. L. N. M.' followed by a stylized surname.

**Profa. Dra. Maria Luiza Nunes Mamede Rosa**  
 Presidente da CEUA

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Tânia Regina Bortolozzo Menegoli'.

**Tânia Regina Bortolozzo Menegoli**  
 Secretária da CEUA

**ANEXO B – Comitê de Ética no Uso de Células Humanas – Universidade de São Paulo  
(Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto)**



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
Avenida do Café, s/nº - Telefone: (016) 3602-3963  
14040-904 - Ribeirão Preto - SP - Brasil  
Fax: (016) 3633-0999

OF.CEP/114/FORP

Ribeirão Preto, 23 de março de 2009.

Senhor Professor,

**Ref.: Processo nº 2009.1.84.58.1  
CAAE nº 0004.0.138.000-09**

A pedido da Profa. Dra. Cláudia Helena Lovato da Silva, Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa, desta Faculdade, informamos que o referido Comitê em sua 96ª Sessão, realizada em 23 de março de 2009, **aprovou** o projeto de pesquisa intitulado: **"Influência do envelhecimento no desenvolvimento *in vitro* do fenótipo osteoblástico em células-tronco derivadas de medula óssea humana. Análises morfológica, bioquímica, proteômica e genômica".**

Na oportunidade, lembramos da necessidade de entregar na Secretaria do Comitê, com o formulário preenchido pelo pesquisador responsável, os **Relatórios Parciais** nos dias **30 de dezembro de 2009, 30 de setembro de 2010** e o **Relatório Final** no dia **30 de maio de 2011**.

Atenciosamente,

**Glauce Della Rosa**  
Secretária do Comitê de Ética em Pesquisa

Ilmo. Sr.

**Prof. Dr. ADALBERTO LUIZ ROSA**

Professor Associado do Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia – FORP/USP

GDR/gdr

\_\_\_\_\_  
Secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa - Glauce Della Rosa - e-mail: glauce@forp.usp.br

## ANEXO C – Identificação de proteínas das células-tronco mesenquimais de medula óssea de rato através do método de shotgun proteomics.

Prot. Acesso	Fração	Proteína	Proteína				Peptideo	
			Score	MW (kDa)	Matches	Cover (%)	Score	Sequência
1433B_RAT	B4	14-3-3 protein beta/alpha	68	28054	1	4,1	68,34	DSTLIMQLLR
RS13_RAT	A6	40S ribosomal protein S13	51	17222	1	6	50,92	DSHGVAQVR
RS18_RAT	A6	40S ribosomal protein S18	92	17718	2	12,5	56,89	IPDWFLNR
RS19_RAT	A6	40S ribosomal protein S19	48	16085	1	6,2	47,75	DVNQQEFVRF
RS24_RAT	A6	40S ribosomal protein S24	44	15423	1	9	44,4	TTPDVIFVFGFR
RS7_RAT	A5	40S ribosomal protein S7	35	22127	1	4,1	34,81	HVVFIAQR
RL27A_RAT	A6	60S ribosomal protein L27a	45	16732	1	6,8	45,36	LWTLVSEQTR
GRP78_RAT	B2	78 kDa glucose-regulated protein	87	72346	2	4,3	35,38	SDIDEIVLVGGSTR
GRP78_RAT	B2	78 kDa glucose-regulated protein	87	72346	2	4,3	81,13	ITPSYVAFTPEGER
ACTC_RAT	A4	Actin, alpha cardiac muscle 1	383	42361	10	23,3	87,64	AGFAGDDAPR
ACTB_RAT	A4	Actin, cytoplasmic 1	486	42019	11	26,9	87,64	AGFAGDDAPR
ACTH_RAT	A4	Actin, gamma-enteric smooth muscle	368	42276	10	23,4	87,64	AGFAGDDAPR
ACTN1_RAT	A1	Alpha-actinin-1	39	103530	1	0,9	38,52	TIPWLENR
ANXA1_RAT	B4	Annexin A1	70	38829	1	3,2	69,63	TPAQFDADELRL
ANXA2_RAT	A4	Annexin A2	91	38963	3	9,7	72,7	TNQELQEINR
ANXA5_RAT	A4	Annexin A5	38	35801	1	3,8	38,3	GTVTDFSGFDGR
ATPB_RAT	A3	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	40	56353	1	2,3	40,28	IMNVIGEPIDER
CNN1_RAT	A4	Calponin-1	38	33514	1	3	38,42	GMTVYGLPR
COF1_RAT	B6	Cofilin-1	51	18532	1	6,6	50,62	YALYDATYETK
DBPA_RAT	B4	DNA-binding protein A	36	38851	1	2,2	36,45	NGYGFINR
EF1A1_RAT	A3	Elongation factor 1-alpha 1	57	50456	2	5	30,56	IGGIGTVPVGR
EF1G_RAT	B3	Elongation factor 1-gamma	60	50060	1	3,4	59,98	VLSAPPHFHFGQTNR
ENPL_RAT	A2	Endoplasmic	43	93055	1	1,4	42,64	SILFVPTSAPR
EZRI_RAT	A2	Ezrin	56	69504	1	1,7	56,21	APDFVFYAPR
LEG1_RAT	B6	Galectin-1	69	14857	1	7,4	69	DDGTWGTEQR

Prot. Acesso	Fração	Proteína	Proteína				Peptideo	
			Score	MW (kDa)	Matches	Cover (%)	Score	Sequência
G3P_RAT	A4	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	147	36113	2	8,4	67,48	LIVINGKPITIFQER
GBLP_RAT	A4	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1	37	35533	1	3,5	37,45	LWDLTTGTTTR
HSPB1_RAT	A5	Heat shock protein beta-1	90	22949	2	8,7	50,41	DWYPAHSR
HSP72_RAT	B2	Heat shock-related 70 kDa protein 2	84	69641	2	3,6	62,47	FEELNADLFR
ROA1_RAT	A4	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	41	34383	1	5,6	40,87	NQGGYGGSSSSSYGSGR
ROA3_RAT	A4	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	55	39880	1	5,8	54,51	SSGSPYGGGYGSGGSGGYGSR
ROA2_RAT	B4	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	36	37477	1	2,3	35,97	DYFEEYGK
H31_RAT	A6	Histone H3.1	35	15518	1	6,6	35,18	YRP GTVALR
MDHM_RAT	A4	Malate dehydrogenase, mitochondrial	80	36140	1	4,1	79,98	VDFPQDQLATLTGR
MYL6_RAT	A6	Myosin light polypeptide 6	46	17146	1	5,3	45,55	EAFQLFDR
MYH9_RAT	A1	Myosin-9	40	227705	1	0,4	39,76	VVFQEFR
NLRX1_RAT	A1	NLR family member X1	38	108616	1	1,1	37,57	DLGGSGEGGAR
NDKB_RAT	A6	Nucleoside diphosphate kinase B	55	17397	2	14,5	37,31	DRPFFPGLVK
AMD_RAT	A1	Peptidyl-glycine alpha-amidating monooxygenase	39	109530	1	1	38,67	KAGIEVQEIK
PROF1_RAT	A6	Profilin-1	58	15128	1	10	58,41	SSFFVNGLTLGGQK
PDIA6_RAT	A3	Protein disulfide-isomerase A6	43	48572	2	6,4	30,27	GESPVVDGGR
RAB15_RAT	B5	Ras-related protein Rab-15	57	24283	1	5,2	57,06	IQIWDTAGQER
RAB1A_RAT	B5	Ras-related protein Rab-1A	57	22677	1	5,4	57,06	LQIWDTAGQER
GDIR1_RAT	A5	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	35	23464	1	3,4	35,46	YIQHTYR
SERPH_RAT	A3	Serpin H1	36	46631	1	4,1	35,57	LSSLIILMPHHVEPLER
TAGL_RAT	A5	Transgelin	107	22660	3	13,4	84,95	AAEDYGVTK
SSRD_RAT	B6	Translocon-associated protein subunit delta	58	18979	1	6,4	58,05	FFDEESYSLLR
TBB5_RAT	A3	Tubulin beta-5 chain	63	50127	3	10,8	44,2	LAVNMVPFPR
CA201_RAT	B4	UPF0490 protein C1orf201 homolog	38	37533	1	2,6	38,27	AGFLSKTPR
VIME_RAT	A3	Vimentin	202	53789	6	12,4	32,19	LQEEMLQR

Prot. Acesso	Fração	Proteína	Proteína			Peptídeo		
			Score	MW (kDa)	Matches	Cover (%)	Score	Sequência
RS16_RAT	C6	40S ribosomal protein S16	65	16559	1	8,2	64,85	GGGHVAQIYAIR
RS19_RAT	C6	40S ribosomal protein S19	53	16085	1	6,2	53,37	DVNQQEFVR
RS7_RAT	C5	40S ribosomal protein S7	39	22127	1	4,1	38,8	HVVFIAQR
RL31_RAT	C6	60S ribosomal protein L31	38	14463	1	7,2	38,05	SAINEVVTR
GRP78_RAT	D2	78 kDa glucose-regulated protein	50	72517	2	2,9	37,35	ALSSQHQAR
GRP78_RAT	D2	78 kDa glucose-regulated protein	50	72517	2	2,9	39,8	FEELNMDLFR
ACTB_RAT	C4	Actin, cytoplasmic 1	204	42079	3	8,8	92,8	AGFAGDDAPR
ACTN1_RAT	D1	Alpha-actinin-1	167	103530	5	6,1	37,63	TIPWLENR
ACTN4_RAT	D1	Alpha-actinin-4	170	105370	5	5,9	40,35	TIPWLEDR
ANXA1_RAT	C4	Annexin A1	36	39171	1	3,2	35,97	TPAQFDADELR
ANXA2_RAT	C4	Annexin A2	84	38963	1	2,9	83,68	TNQELQEINR
CALM_RAT	D6	Calmodulin	46	16837	1	10,7	46,3	VFDKDGNGYISAAELR
CALX_RAT	D2	Calnexin	75	67653	1	2,5	75,03	KIPNPDFFEDLEPFR
CLH_RAT	D1	Clathrin heavy chain 1	39	193308	1	0,5	39,2	LLL PWLEAR
CO1A1_RAT	D1	Collagen alpha-1(I) chain	99	138979	1	1,2	99,48	GETGPAGPAGPIGPAGAR
CO1A2_RAT	D1	Collagen alpha-2(I) chain	87	130076	1	1,1	86,64	GEAGAACGPGAGPR
CNTN3_RAT	D1	Contactin-3	45	113529	1	1,9	45,32	VAGNQTSAVLR
DESM_RAT	D3	Desmin	39	53513	1	3	38,52	FASEASGYQDNIAR
EF1A1_RAT	C3	Elongation factor 1-alpha 1	54	50456	1	2,6	53,73	YYVTIIDAPGHR
EF1D_RAT	C4	Elongation factor 1-delta	66	31444	2	9,3	54,85	IASLEVENQNLR
ENPL_RAT	D2	Endoplasmin	35	93055	1	1,4	35,23	SILFVPTSAPR
G3P_RAT	C4	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	57	36113	1	4,2	57,19	LVINGKPITIFQER
GOGA5_RAT	C2	Golgin subfamily A member 5	45	82333	1	1,4	44,92	VDQGAATALR
GBLP_RAT	D4	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1	56	35533	1	3,2	56,26	DETNYGIPQR
HSP7C_RAT	C2	Heat shock cognate 71 kDa protein	37	71098	1	1,7	36,53	VEIIANDQGNR
HSPB1_RAT	C5	Heat shock protein beta-1	68	22949	2	8,7	30,94	DWYPAHSR
HSP72_RAT	D2	Heat shock-related 70 kDa protein 2	123	69926	3	6,2	50,32	FEELNADLFR

Prot. Acesso	Fração	Proteína	Proteína				Peptideo	
			Score	MW (kDa)	Matches	Cover (%)	Score	Sequência
ROA1_RAT	C4	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	77	34383	2	5,3	45,99	DYFEQYGK
ROA3_RAT	C4	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	46	39880	1	2,1	45,99	DYFEKYGK
ROA2_RAT	C4	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	113	37534	4	11,9	38,45	GGNFGFGDSR
LMNA_RAT	C2	Lamin-A	59	74608	2	3,3	49,93	LQEKEDLQELNDR
LIPA3_RAT	C1	Liprin-alpha-3	39	133998	1	0,8	38,88	QKLQQTLQK
LDHA_RAT	C4	L-lactate dehydrogenase A chain	38	36735	1	3	37,67	VTLTPDEEAR
MDHM_RAT	D4	Malate dehydrogenase, mitochondrial	56	36140	1	4,1	56,22	VDFPQDQLATLTGR
MYL6_RAT	C6	Myosin light polypeptide 6	44	17146	2	15,2	34,12	NKDQGTYEDYVEGLR
NEST_RAT	C1	Nestin	36	209651	1	0,5	35,58	LSQAVRGAR
NDKA_RAT	C6	Nucleoside diphosphate kinase A	146	17307	3	23,7	56,25	DRPFFSGLVK
NDKB_RAT	C6	Nucleoside diphosphate kinase B	125	17397	3	23,7	36,31	DRPFFPGLVK
AMD_RAT	C1	Peptidyl-glycine alpha-amidating monooxygenase	39	109530	1	1	39,28	KAGIEVQEIK
PPIA_RAT	C6	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	42	18102	1	5,5	41,76	FEDENFILK
PROF1_RAT	C6	Profilin-1	74	15128	2	20	44,51	DSLLQDGEGFTMDLR
PDIA6_RAT	D3	Protein disulfide-isomerase A6	142	48572	2	5,5	68,47	NKPEDYQGGR
RB11A_RAT	D5	Ras-related protein Rab-11A	53	24507	1	5,1	53,2	AQIWDTAGQER
RAB15_RAT	C5	Ras-related protein Rab-15	59	24625	1	5,2	58,55	IQIWDTAGQER
RAB1A_RAT	C5	Ras-related protein Rab-1A	59	22906	1	5,4	58,55	LQIWDTAGQER
RAB2A_RAT	C5	Ras-related protein Rab-2A	50	23706	1	6,1	50,05	LQIWDTAGQESFR
RTN4_RAT	D1	Reticulon-4	36	126843	1	1,1	35,67	GPLAAPPAAPER
SERPH_RAT	C3	Serpin H1	41	46631	1	2,9	41,47	DNQSGSLLFIGR
TAGL_RAT	C5	Transgelin	73	22660	2	9	43,41	AAEDYGVTK
SSRD_RAT	C6	Translocon-associated protein subunit delta	88	19208	1	6,4	88,45	FFDEEYSLLR
TBA1A_RAT	C3	Tubulin alpha-1A chain	48	50820	1	2,7	48,21	QLFHPEQLITGK
TBB2A_RAT	D3	Tubulin beta-2A chain	40	50306	1	5,8	39,62	SGPFGQIFRPDNFVGQSGAGNNWAK
TBB5_RAT	C3	Tubulin beta-5 chain	142	50127	4	9	37,2	IREEYPDR
CA201_RAT	D4	UPF0490 protein C1orf201 homolog	37	37876	1	2,6	37,17	AGFLSKTPR
VIME_RAT	C3	Vimentin	212	53789	7	15,7	55,63	DNLAEIDMR

## ANEXO D – Identificação de proteínas das células-tronco mesenquimais de medula óssea de rato através do método de iTRAQ.

Prot. Acesso	Fração	Proteína	Proteína			Peptídeo		
			Score	MW (kDa)	Matches	Cover (%)	Score	Sequência
H2B1_RAT	8	Histone H2B type 1	195	13982	7	40,8	31,05	EIQTAVR
H2B1_RAT	8	Histone H2B type 1	195	13982	7	40,8	41,7	LLLPGELAK
H2B1_RAT	8	Histone H2B type 1	195	13982	7	40,8	45,22	ESYSVYVYK
H2B1_RAT	8	Histone H2B type 1	195	13982	7	40,8	92,86	AMGIMNSFVNDFER
H2B1_RAT	8	Histone H2B type 1	195	13982	7	40,8	98,23	AMGIMNSFVNDFER
H2B1_RAT	8	Histone H2B type 1	195	13982	7	40,8	52,1	AMGIMNSFVNDFER
PPIA_RAT	8	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	131	17863	6	36,6	9,7	ALSTGEK
PPIA_RAT	8	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	131	17863	6	36,6	21,06	TEWLDGK
PPIA_RAT	8	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	131	17863	6	36,6	6,7	VKEGMSIVEAMER
PPIA_RAT	8	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	131	17863	6	36,6	52,58	VNPTVFFDITADGEPLGR
PPIA_RAT	8	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	131	17863	6	36,6	73,02	VNPTVFFDITADGEPLGR
PPIA_RAT	8	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	131	17863	6	36,6	57,78	SIYGEKFEDENFILK
H4_RAT	8	Histone H4	112	11360	7	35,9	22,26	TLYGFGG
H4_RAT	8	Histone H4	112	11360	7	35,9	19,67	VFLENVIR
H4_RAT	8	Histone H4	112	11360	7	35,9	56,15	VFLENVIR
H4_RAT	8	Histone H4	112	11360	7	35,9	19,35	VFLENVIR
H4_RAT	8	Histone H4	112	11360	7	35,9	12,99	VFLENVIR
H4_RAT	8	Histone H4	112	11360	7	35,9	68,41	ISGLIYEETR
H4_RAT	8	Histone H4	112	11360	7	35,9	57,83	DNIQGITKPAIR
VIME_RAT	8	Vimentin	106	53700	3	9	56,42	EYQDLLNVK
VIME_RAT	8	Vimentin	106	53700	3	9	66,14	ISLPLPNFSSLNLR
VIME_RAT	8	Vimentin	106	53700	3	9	42,93	EMEENFALEAANYQDTIGR

COTL1_RAT	8	Coactosin-like protein	89	15922	1	11,3	88,84	FALITWIGEDVSGLQR
LEG1_RAT	8	Galectin-1	83	14847	2	20,7	29,46	LPDGHEFKFPNR
LEG1_RAT	8	Galectin-1	83	14847	2	20,7	82,64	LNMEAINYMAADGDFK
ACTB_RAT	8	Actin, cytoplasmic 1	80	41710	6	19,5	16,33	AGFAGDDAPR
ACTB_RAT	8	Actin, cytoplasmic 1	80	41710	6	19,5	22,16	GYSFTTTAER
ACTB_RAT	8	Actin, cytoplasmic 1	80	41710	6	19,5	23,34	AVFPSIVGRPR
ACTB_RAT	8	Actin, cytoplasmic 1	80	41710	6	19,5	34,27	DLTDYLMK
ACTB_RAT	8	Actin, cytoplasmic 1	80	41710	6	19,5	45,19	SYELPDGQVITIGNER
ACTB_RAT	8	Actin, cytoplasmic 1	80	41710	6	19,5	59,72	VAPEEHPVLLTEAPLNPK
RLA1_RAT	8	60S acidic ribosomal protein P1	79	11491	1	14	79,31	AAGVNVEPFWPGLFAK
S10AB_RAT	8	Protein S100-A11	78	11057	1	16,3	78,31	TEFLSFMNTELAAFTK
NDKB_RAT	8	Nucleoside diphosphate kinase B	74	17272	7	40,8	27,68	GLVGEIIK
NDKB_RAT	8	Nucleoside diphosphate kinase B	74	17272	7	40,8	15,4	GLVGEIIR
NDKB_RAT	8	Nucleoside diphosphate kinase B	74	17272	7	40,8	34,43	DRPFFPGLVK
NDKB_RAT	8	Nucleoside diphosphate kinase B	74	17272	7	40,8	28,06	DRPFFPGLVK
NDKB_RAT	8	Nucleoside diphosphate kinase B	74	17272	7	40,8	38,96	TFIAIKPDGVQR
NDKB_RAT	8	Nucleoside diphosphate kinase B	74	17272	7	40,8	44,85	VMLGETNPADSKPGTIR
MYL6_RAT	8	Myosin light polypeptide 6	72	16964	3	24,5	42,21	EAFQLFDR
MYL6_RAT	8	Myosin light polypeptide 6	72	16964	3	24,5	2,72	MCDFTEDQTAEFK
MYL6_RAT	8	Myosin light polypeptide 6	72	16964	3	24,5	58,45	VLDFEHFLPMILQTVAK
PROF1_RAT	8	Profilin-1	63	14948	1	10	62,63	DSLLQDGEFTMDLR
NDKA_RAT	8	Nucleoside diphosphate kinase A	60	17182	6	40,8	27,68	GLVGEIIK
NDKA_RAT	8	Nucleoside diphosphate kinase A	60	17182	6	40,8	15,4	GLVGEIIR
NDKA_RAT	8	Nucleoside diphosphate kinase A	60	17182	6	40,8	11,47	DRPFFSGLVK
NDKA_RAT	8	Nucleoside diphosphate kinase A	60	17182	6	40,8	38,96	TFIAIKPDGVQR
NDKA_RAT	8	Nucleoside diphosphate kinase A	60	17182	6	40,8	44,85	VMLGETNPADSKPGTIR

NDKA_RAT	8	Nucleoside diphosphate kinase A	60	17182	6	40,8	56,42	EYQDLLNVK
H2A1C_RAT	8	Histone H2A type 1-C	42	14097	3	21,5	35,82	AGLQFPVGR
H2A1C_RAT	8	Histone H2A type 1-C	42	14097	3	21,5	28,28	AGLQFPVGR
H2A1C_RAT	8	Histone H2A type 1-C	42	14097	3	21,5	33,47	VTIAQGGVLVPNQAVLLPK
H2B1A_RAT	8	Histone H2B type 1-A	42	14216	3	24,4	31,05	EIQTAVR
H2B1A_RAT	8	Histone H2B type 1-A	42	14216	3	24,4	41,7	LLLPGELAK
H2B1A_RAT	8	Histone H2B type 1-A	42	14216	3	24,4	6,65	AMSIMNSFVTDIFER
COF1_RAT	8	Cofilin-1	36	18521	1	6,6	35,61	YALYDATYETK
CALM_RAT	8	Calmodulin	34	16827	1	10,7	34,46	VFDKDNGNYISAAELR
CALR_RAT	8	Calreticulin	33	47966	1	2,9	32,51	EQFLDGDAWTNR
H33_RAT	8	Histone H3.3	31	15318	3	16,2	15,54	YRPGBTVALR
TAGL_RAT	7	Transgelin	180	22588	6	29,4	39,58	LGFQVWLK
TAGL_RAT	7	Transgelin	180	22588	6	29,4	37,58	GDPNWFMK
TAGL_RAT	7	Transgelin	180	22588	6	29,4	29,45	KYDEELEER
TAGL_RAT	7	Transgelin	180	22588	6	29,4	57,53	QMEQVAQFLK
TAGL_RAT	7	Transgelin	180	22588	6	29,4	75,93	EFTDSQLQEGK
TAGL_RAT	7	Transgelin	180	22588	6	29,4	86,95	TDMFQTVDLFEGK
ACTC_RAT	7	Actin, alpha cardiac muscle 1	119	41992	7	20,7	15,82	LDLAGR
ACTC_RAT	7	Actin, alpha cardiac muscle 1	119	41992	7	20,7	10,28	AGFAGDDAPR
ACTC_RAT	7	Actin, alpha cardiac muscle 1	119	41992	7	20,7	16,73	AVFPSIVGRPR
ACTC_RAT	7	Actin, alpha cardiac muscle 1	119	41992	7	20,7	33,79	DLTDYLMK
ACTC_RAT	7	Actin, alpha cardiac muscle 1	119	41992	7	20,7	93,99	SYELPDGQVITIGNER
ACTC_RAT	7	Actin, alpha cardiac muscle 1	119	41992	7	20,7	47	YPIEHGIITNWDDMEK
ACTB_RAT	7	Actin, alpha cardiac muscle 1	115	41710	8	24	15,82	LDLAGR
ACTB_RAT	7	Actin, alpha cardiac muscle 1	115	41710	8	24	10,28	AGFAGDDAPR
ACTB_RAT	7	Actin, alpha cardiac muscle 1	115	41710	8	24	17,16	GYSFDTTAER

ACTB_RAT	7	Actin, alpha cardiac muscle 1	115	41710	8	24	16,73	AVFPSIVGRPR
ACTB_RAT	7	Actin, alpha cardiac muscle 1	115	41710	8	24	33,79	DLDYLMK
ACTB_RAT	7	Actin, alpha cardiac muscle 1	115	41710	8	24	93,99	SYELPDGQVITIGNER
ACTB_RAT	7	Actin, alpha cardiac muscle 1	115	41710	8	24	46,2	VAPEEHPVLLTEAPLNPK
ATPA_RAT	7	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	101	59717	2	7,2	0,32	RPPGREAYPGDVFYLHSR
ATPA_RAT	7	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	101	59717	2	7,2	100,96	EVAFAQFGSDLDAATQQLLSR
TAGL2_RAT	7	Transgelin-2	68	22379	4	21,1	5,63	GPSYGLSR
TAGL2_RAT	7	Transgelin-2	68	22379	4	21,1	15,06	TLMNLGGGLAVAR
TAGL2_RAT	7	Transgelin-2	68	22379	4	21,1	43,31	ENFQNWLK
TAGL2_RAT	7	Transgelin-2	68	22379	4	21,1	58,11	QMEQISQFLQAAER
VIME_RAT	7	Vimentin	62	53700	3	6,7	10,61	FANYIDK
VIME_RAT	7	Vimentin	62	53700	3	6,7	22,28	LGDLYEEEMR
VIME_RAT	7	Vimentin	62	53700	3	6,7	62,49	ISLPLPNFSSLNLR
FRIL1_RAT	7	Ferritin light chain 1	62	20736	2	23	62,46	VAGPQPAQTGVAQASLGELYFER
FRIL1_RAT	7	Ferritin light chain 1	62	20736	2	23	5,93	DDVALEGVGHFFRELAEEK
PPIB_RAT	7	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	59	23788	1	6,5	58,97	VYFDFQIGDEPVGR
MRLCA_RAT	7	Myosin regulatory light chain RLC-A	57	19883	2	11,6	33,91	EAFNMIDQNR
MRLCA_RAT	7	Myosin regulatory light chain RLC-A	57	19883	2	11,6	54,06	GNFNYIEFTR
SODM_RAT	7	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	47	24659	1	6,3	47,32	AIWNVINWENVSQR
RAB1A_RAT	7	Ras-related protein Rab-1A	46	22663	3	9,3	36,58	QWLQEIDR
RAB1A_RAT	7	Ras-related protein Rab-1A	46	22663	3	9,3	32,51	LQIWDTAGQER
RAB1A_RAT	7	Ras-related protein Rab-1A	46	22663	3	9,3	42,25	LQIWDTAGQER
RAB14_RAT	7	Ras-related protein Rab-14	42	23912	3	12,6	32,51	LQIWDTAGQER
RAB14_RAT	7	Ras-related protein Rab-14	42	23912	3	12,6	42,25	LQIWDTAGQER
RAB15_RAT	7	Ras-related protein Rab-15	42	24268	2	5,2	32,51	IQIWDTAGQER
RAB15_RAT	7	Ras-related protein Rab-15	42	24268	2	5,2	42,25	IQIWDTAGQER

RAB4A_RAT	7	Ras-related protein Rab-4A	42	23891	3	15	32,51	LQIWDTAGQER
RAB4A_RAT	7	Ras-related protein Rab-4A	42	23891	3	15	42,25	LQIWDTAGQER
RAB4A_RAT	7	Ras-related protein Rab-4A	42	23891	3	15	3,26	MSETYDFLFKFLVIGNAGTGK
TBA1A_RAT	7	Tubulin alpha-1A chain	37	50104	1	3,3	36,75	AVFVDLEPTVIDEV
PRDX1_RAT	7	Peroxiredoxin-1	37	22095	1	5,5	36,72	QITINDLPVGR
PRDX4_RAT	7	Peroxiredoxin-4	35	30988	1	4	35	QITLNDLPVGR
APT_RAT	7	Adenine phosphoribosyltransferase	24	19533	1	7,2	24,41	SFPDFPIPVGVLFR
ACTB_RAT	6	Actin, cytoplasmic 1	211	41710	14	26,9	8,42	IIAPPER
ACTB_RAT	6	Actin, cytoplasmic 1	211	41710	14	26,9	25,51	AGFAGDDAPR
ACTB_RAT	6	Actin, cytoplasmic 1	211	41710	14	26,9	36,62	GYSFTTTAER
ACTB_RAT	6	Actin, cytoplasmic 1	211	41710	14	26,9	41,81	GYSFTTTAER
ACTB_RAT	6	Actin, cytoplasmic 1	211	41710	14	26,9	39,9	AVFPSIVGRPR
ACTB_RAT	6	Actin, cytoplasmic 1	211	41710	14	26,9	14,85	AVFPSIVGRPR
ACTB_RAT	6	Actin, cytoplasmic 1	211	41710	14	26,9	42,93	DLDYLMK
ACTB_RAT	6	Actin, cytoplasmic 1	211	41710	14	26,9	75,34	SYELPDGQVITIGNER
ACTB_RAT	6	Actin, cytoplasmic 1	211	41710	14	26,9	22,84	SYELPDGQVITIGNER
ACTB_RAT	6	Actin, cytoplasmic 1	211	41710	14	26,9	28,62	SYELPDGQVITIGNER
ACTB_RAT	6	Actin, cytoplasmic 1	211	41710	14	26,9	17,13	DLYANTVSGGTTMYPGIADR
ACTB_RAT	6	Actin, cytoplasmic 1	211	41710	14	26,9	97,78	VAPEEHPVLLTEAPLNPK
VIME_RAT	6	Vimentin	169	53700	8	19,3	32,85	FANYIDK
VIME_RAT	6	Vimentin	169	53700	8	19,3	17,78	LGDLYEEEMR
VIME_RAT	6	Vimentin	169	53700	8	19,3	21,13	EEAESTLQSFR
VIME_RAT	6	Vimentin	169	53700	8	19,3	52,21	EYQDLLNVK
VIME_RAT	6	Vimentin	169	53700	8	19,3	67,36	ILLAELEQLK
VIME_RAT	6	Vimentin	169	53700	8	19,3	77,26	ISLPLPNFSSLNLR
VIME_RAT	6	Vimentin	169	53700	8	19,3	30,28	NLQEAEWYK

VIME_RAT	6	Vimentin	169	53700	8	19,3	60,95	EMEENFALEAANYQDTIGR
ACTC_RAT	6	Actin, alpha cardiac muscle 1	134	41992	12	20,7	8,42	IIAPPER
ACTC_RAT	6	Actin, alpha cardiac muscle 1	134	41992	12	20,7	25,51	AGFAGDDAPR
ACTC_RAT	6	Actin, alpha cardiac muscle 1	134	41992	12	20,7	26,78	GYSFVTTAER
ACTC_RAT	6	Actin, alpha cardiac muscle 1	134	41992	12	20,7	39,9	AVFPSIVGRPR
ACTC_RAT	6	Actin, alpha cardiac muscle 1	134	41992	12	20,7	14,85	AVFPSIVGRPR
ACTC_RAT	6	Actin, alpha cardiac muscle 1	134	41992	12	20,7	42,93	DLDYLMK
ACTC_RAT	6	Actin, alpha cardiac muscle 1	134	41992	12	20,7	75,34	SYELPDGQVITIGNER
ACTC_RAT	6	Actin, alpha cardiac muscle 1	134	41992	12	20,7	22,84	SYELPDGQVITIGNER
ACTC_RAT	6	Actin, alpha cardiac muscle 1	134	41992	12	20,7	28,62	SYELPDGQVITIGNER
ACTC_RAT	6	Actin, alpha cardiac muscle 1	134	41992	12	20,7	10,44	YPIEHGIITNWDDMEK
HSPB1_RAT	6	Heat shock protein beta-1	58	22879	4	20,9	12,76	RVPFSLLR
HSPB1_RAT	6	Heat shock protein beta-1	58	22879	4	20,9	12,02	SPSWEPFR
HSPB1_RAT	6	Heat shock protein beta-1	58	22879	4	20,9	57,91	LFDQAFGVPR
HSPB1_RAT	6	Heat shock protein beta-1	58	22879	4	20,9	12,63	AVTQSAEITIPVTFEAR
RL14_RAT	6	60S ribosomal protein L14	55	23324	1	5,6	54,96	LVAIVDVIDQNR
DESM_RAT	6	Desmin	52	53424	2	3,8	10,56	FANYFEKVR
DESM_RAT	6	Desmin	52	53424	2	3,8	52,21	EYQDLLNVK
TAGL_RAT	6	Transgelin	47	22588	2	9,5	28,34	LGFQVWLK
TAGL_RAT	6	Transgelin	47	22588	2	9,5	47,38	EFTDSQLQEGK
RB11A_RAT	6	Ras-related protein Rab-11A	42	24378	1	5,1	42,46	AQIWDTAGQER
KPYM_RAT	6	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	40	57781	1	3	39,99	FGVEQDVDMVFASFIR
1433Z_RAT	6	14-3-3 protein zeta/delta	33	27754	1	3,3	33,49	VVSSIEQK
1433Z_RAT	6	14-3-3 protein zeta/delta	33	27754	1	3,3	6,98	REDAEHNVLFR
1433Z_RAT	6	14-3-3 protein zeta/delta	33	27754	1	3,3	30,28	NLQEAEWYK
SSRA_RAT	6	Translocon-associated protein subunit	20	35607	1	4,7	19,8	GTEDFIVESLDASFR

alpha								
ACTB_RAT	5	Actin, cytoplasmic 1	458	41710	41	42,4	15,55	LDLAGR
ACTB_RAT	5	Actin, cytoplasmic 1	458	41710	41	42,4	8,38	IIAPPER
ACTB_RAT	5	Actin, cytoplasmic 1	458	41710	41	42,4	23,07	GILTLK
ACTB_RAT	5	Actin, cytoplasmic 1	458	41710	41	42,4	48,74	AGFAGDDAPR
ACTB_RAT	5	Actin, cytoplasmic 1	458	41710	41	42,4	36,82	GYSFTTTAER
ACTB_RAT	5	Actin, cytoplasmic 1	458	41710	41	42,4	22,2	GYSFTTTAER
ACTB_RAT	5	Actin, cytoplasmic 1	458	41710	41	42,4	20,14	GYSFTTTAER
ACTB_RAT	5	Actin, cytoplasmic 1	458	41710	41	42,4	53,27	GYSFTTTAER
ACTB_RAT	5	Actin, cytoplasmic 1	458	41710	41	42,4	63,24	GYSFTTTAER
ACTB_RAT	5	Actin, cytoplasmic 1	458	41710	41	42,4	13,07	GYSFTTTAER
ACTB_RAT	5	Actin, cytoplasmic 1	458	41710	41	42,4	3,72	AVFPSIVGRPR
ACTB_RAT	5	Actin, cytoplasmic 1	458	41710	41	42,4	26,36	AVFPSIVGRPR
ACTB_RAT	5	Actin, cytoplasmic 1	458	41710	41	42,4	11,28	AVFPSIVGRPR
ACTB_RAT	5	Actin, cytoplasmic 1	458	41710	41	42,4	43,73	AVFPSIVGRPR
ACTB_RAT	5	Actin, cytoplasmic 1	458	41710	41	42,4	50,16	DLTDYLMK
ACTB_RAT	5	Actin, cytoplasmic 1	458	41710	41	42,4	66,44	HQGVMVGMGQK
ACTB_RAT	5	Actin, cytoplasmic 1	458	41710	41	42,4	25,39	SYELPDGQVITIGNER
ACTB_RAT	5	Actin, cytoplasmic 1	458	41710	41	42,4	9,53	IWHHTFYNELR
ACTB_RAT	5	Actin, cytoplasmic 1	458	41710	41	42,4	15,59	SYELPDGQVITIGNER
ACTB_RAT	5	Actin, cytoplasmic 1	458	41710	41	42,4	18,35	SYELPDGQVITIGNER
ACTB_RAT	5	Actin, cytoplasmic 1	458	41710	41	42,4	84,93	SYELPDGQVITIGNER
ACTB_RAT	5	Actin, cytoplasmic 1	458	41710	41	42,4	16,2	SYELPDGQVITIGNER
ACTB_RAT	5	Actin, cytoplasmic 1	458	41710	41	42,4	33,98	SYELPDGQVITIGNER
ACTB_RAT	5	Actin, cytoplasmic 1	458	41710	41	42,4	35,22	SYELPDGQVITIGNER
ACTB_RAT	5	Actin, cytoplasmic 1	458	41710	41	42,4	24,61	SYELPDGQVITIGNER

ACTB_RAT	5	Actin, cytoplasmic 1	458	41710	41	42,4	19,63	SYELPDGQVITIGNER
ACTB_RAT	5	Actin, cytoplasmic 1	458	41710	41	42,4	10,36	QEYDESGPSIVHR
ACTB_RAT	5	Actin, cytoplasmic 1	458	41710	41	42,4	76,2	DLYANTVLSGGTTMYPGIADR
ACTB_RAT	5	Actin, cytoplasmic 1	458	41710	41	42,4	14,31	DLYANTVLSGGTTMYPGIADR
ACTB_RAT	5	Actin, cytoplasmic 1	458	41710	41	42,4	66,81	DLYANTVLSGGTTMYPGIADR
ACTB_RAT	5	Actin, cytoplasmic 1	458	41710	41	42,4	34,73	DLYANTVLSGGTTMYPGIADR
ACTB_RAT	5	Actin, cytoplasmic 1	458	41710	41	42,4	41,95	DLYANTVLSGGTTMYPGIADR
ACTB_RAT	5	Actin, cytoplasmic 1	458	41710	41	42,4	39,2	DLYANTVLSGGTTMYPGIADR
ACTB_RAT	5	Actin, cytoplasmic 1	458	41710	41	42,4	36,99	DLYANTVLSGGTTMYPGIADR
ACTB_RAT	5	Actin, cytoplasmic 1	458	41710	41	42,4	64,96	DLYANTVLSGGTTMYPGIADR
ACTB_RAT	5	Actin, cytoplasmic 1	458	41710	41	42,4	34,65	DLYANTVLSGGTTMYPGIADR
ACTB_RAT	5	Actin, cytoplasmic 1	458	41710	41	42,4	70,15	VAPEEHPVLLTEAPLNPK
ACTC_RAT	5	Actin, alpha cardiac muscle 1	238	41992	25	30	15,55	LDLAGR
ACTC_RAT	5	Actin, alpha cardiac muscle 1	238	41992	25	30	8,38	IIAPPER
ACTC_RAT	5	Actin, alpha cardiac muscle 1	238	41992	25	30	23,07	GILTLK
ACTC_RAT	5	Actin, alpha cardiac muscle 1	238	41992	25	30	48,74	AGFAGDDAPR
ACTC_RAT	5	Actin, alpha cardiac muscle 1	238	41992	25	30	3,72	AVFPSIVGRPR
ACTC_RAT	5	Actin, alpha cardiac muscle 1	238	41992	25	30	26,36	AVFPSIVGRPR
ACTC_RAT	5	Actin, alpha cardiac muscle 1	238	41992	25	30	11,28	AVFPSIVGRPR
ACTC_RAT	5	Actin, alpha cardiac muscle 1	238	41992	25	30	43,73	AVFPSIVGRPR
ACTC_RAT	5	Actin, alpha cardiac muscle 1	238	41992	25	30	50,16	DLTDYLMK
ACTC_RAT	5	Actin, alpha cardiac muscle 1	238	41992	25	30	66,44	HQGVMVGMGQK
ACTC_RAT	5	Actin, alpha cardiac muscle 1	238	41992	25	30	25,39	SYELPDGQVITIGNER
ACTC_RAT	5	Actin, alpha cardiac muscle 1	238	41992	25	30	9,53	IWHHTFYNELR
ACTC_RAT	5	Actin, alpha cardiac muscle 1	238	41992	25	30	15,59	SYELPDGQVITIGNER
ACTC_RAT	5	Actin, alpha cardiac muscle 1	238	41992	25	30	18,35	SYELPDGQVITIGNER

ACTC_RAT	5	Actin, alpha cardiac muscle 1	238	41992	25	30	84,93	SYELPDGQVITIGNER
ACTC_RAT	5	Actin, alpha cardiac muscle 1	238	41992	25	30	16,2	SYELPDGQVITIGNER
ACTC_RAT	5	Actin, alpha cardiac muscle 1	238	41992	25	30	33,98	SYELPDGQVITIGNER
ACTC_RAT	5	Actin, alpha cardiac muscle 1	238	41992	25	30	35,22	SYELPDGQVITIGNER
ACTC_RAT	5	Actin, alpha cardiac muscle 1	238	41992	25	30	24,61	SYELPDGQVITIGNER
ACTC_RAT	5	Actin, alpha cardiac muscle 1	238	41992	25	30	19,63	SYELPDGQVITIGNER
ACTC_RAT	5	Actin, alpha cardiac muscle 1	238	41992	25	30	34,58	YPIEHGIITNWDDMEK
NPM_RAT	5	Nucleophosmin	67	32540	2	12	56,75	MTDQEAIQDLWQWR
NPM_RAT	5	Nucleophosmin	67	32540	2	12	37,17	MSVQPTVSLGGFEITPPVRL
TPM1_RAT	5	Tropomyosin alpha-1 chain	55	32661	1	3,5	55,26	IQLVEEELDR
G3P_RAT	5	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	54	35805	1	4,2	54,04	LISWYDNEYGYSNR
VIME_RAT	5	Vimentin	49	53700	2	5,2	13,57	LGDLYEEEMR
VIME_RAT	5	Vimentin	49	53700	2	5,2	49,45	ISLPLPNFSSLNLR
ANXA1_RAT	5	Annexin A1	36	38805	1	4,6	35,72	GLGTDEDTLIEILTTR
ANXA2_RAT	5	Annexin A2	29	38654	1	2,7	29,19	QDIAFAYQR
ACTB_RAT	4	Actin, cytoplasmic 1	202	41710	19	24,3	15,85	ILTER
ACTB_RAT	4	Actin, cytoplasmic 1	202	41710	19	24,3	14,91	LDLAGR
ACTB_RAT	4	Actin, cytoplasmic 1	202	41710	19	24,3	20,02	LDLAGR
ACTB_RAT	4	Actin, cytoplasmic 1	202	41710	19	24,3	7,25	LDLAGR
ACTB_RAT	4	Actin, cytoplasmic 1	202	41710	19	24,3	12,73	IIAPPER
ACTB_RAT	4	Actin, cytoplasmic 1	202	41710	19	24,3	6,88	IIAPPER
ACTB_RAT	4	Actin, cytoplasmic 1	202	41710	19	24,3	17,46	IIAPPERK
ACTB_RAT	4	Actin, cytoplasmic 1	202	41710	19	24,3	24,59	GILTLK
ACTB_RAT	4	Actin, cytoplasmic 1	202	41710	19	24,3	54,26	AGFAGDDAPR
ACTB_RAT	4	Actin, cytoplasmic 1	202	41710	19	24,3	4,62	AGFAGDDAPR

ACTB_RAT	4	Actin, cytoplasmic 1	202	41710	19	24,3	16,22	DLTDYLMK
ACTB_RAT	4	Actin, cytoplasmic 1	202	41710	19	24,3	63,24	GYSFTTTAER
ACTB_RAT	4	Actin, cytoplasmic 1	202	41710	19	24,3	46,72	AVFPSIVGRPR
ACTB_RAT	4	Actin, cytoplasmic 1	202	41710	19	24,3	35,32	DLTDYLMK
ACTC_RAT	4	Actin, alpha cardiac muscle 1	191	41992	20	27,6	15,85	ILTER
ACTC_RAT	4	Actin, alpha cardiac muscle 1	191	41992	20	27,6	14,91	LDLAGR
ACTC_RAT	4	Actin, alpha cardiac muscle 1	191	41992	20	27,6	20,02	LDLAGR
ACTC_RAT	4	Actin, alpha cardiac muscle 1	191	41992	20	27,6	7,25	LDLAGR
ACTC_RAT	4	Actin, alpha cardiac muscle 1	191	41992	20	27,6	12,73	IIAPPER
ACTC_RAT	4	Actin, alpha cardiac muscle 1	191	41992	20	27,6	6,88	IIAPPER
ACTC_RAT	4	Actin, alpha cardiac muscle 1	191	41992	20	27,6	17,46	IIAPPERK
ACTC_RAT	4	Actin, alpha cardiac muscle 1	191	41992	20	27,6	24,59	GILTLK
ACTC_RAT	4	Actin, alpha cardiac muscle 1	191	41992	20	27,6	54,26	AGFAGDDAPR
ACTC_RAT	4	Actin, alpha cardiac muscle 1	191	41992	20	27,6	4,62	AGFAGDDAPR
ACTC_RAT	4	Actin, alpha cardiac muscle 1	191	41992	20	27,6	16,22	DLTDYLMK
ACTC_RAT	4	Actin, alpha cardiac muscle 1	191	41992	20	27,6	50,61	GYSFVTTAER
ACTC_RAT	4	Actin, alpha cardiac muscle 1	191	41992	20	27,6	46,72	AVFPSIVGRPR
ACTC_RAT	4	Actin, alpha cardiac muscle 1	191	41992	20	27,6	35,32	DLTDYLMK
ACTA_RAT	4	Actin, aortic smooth muscle	191	41982	19	27,6	15,85	ILTER
ACTA_RAT	4	Actin, aortic smooth muscle	191	41982	19	27,6	14,91	LDLAGR
ACTA_RAT	4	Actin, aortic smooth muscle	191	41982	19	27,6	20,02	LDLAGR
ACTA_RAT	4	Actin, aortic smooth muscle	191	41982	19	27,6	7,25	LDLAGR
ACTA_RAT	4	Actin, aortic smooth muscle	191	41982	19	27,6	12,73	IIAPPER
ACTA_RAT	4	Actin, aortic smooth muscle	191	41982	19	27,6	6,88	IIAPPER
ACTA_RAT	4	Actin, aortic smooth muscle	191	41982	19	27,6	17,46	IIAPPERK
ACTA_RAT	4	Actin, aortic smooth muscle	191	41982	19	27,6	24,59	GILTLK

ACTA_RAT	4	Actin, aortic smooth muscle	191	41982	19	27,6	54,26	AGFAGDDAPR
ACTA_RAT	4	Actin, aortic smooth muscle	191	41982	19	27,6	4,62	AGFAGDDAPR
ACTA_RAT	4	Actin, aortic smooth muscle	191	41982	19	27,6	16,22	DLTDYLMK
ACTA_RAT	4	Actin, aortic smooth muscle	191	41982	19	27,6	50,61	GYSFVTTAER
ACTA_RAT	4	Actin, aortic smooth muscle	191	41982	19	27,6	46,72	AVFPSIVGRPR
ACTA_RAT	4	Actin, aortic smooth muscle	191	41982	19	27,6	35,32	DLTDYLMK
VIME_RAT	3	Vimentin	127	53700	8	16,5	10,63	LDLER
VIME_RAT	3	Vimentin	127	53700	8	16,5	24,35	QDVDNASLAR
VIME_RAT	3	Vimentin	127	53700	8	16,5	47,05	LGDLYEEEMR
VIME_RAT	3	Vimentin	127	53700	8	16,5	42,92	ISLPLPNFSSLNLR
VIME_RAT	3	Vimentin	127	53700	8	16,5	45,57	VEVERDNLAEDIMR
VIME_RAT	3	Vimentin	127	53700	8	16,5	40,41	LQDEIQNMKEEMAR

ANEXO E – Identificação de proteínas das células-tronco mesenquimais de medula óssea humana no período de 7 dias: MEM 10%(113), MTS 10% (114).

Prot. Acesso	Fração	Proteína	Proteína				Peptídeo				Controle % Var.	Expressão	Mediana	
			Score	MW (kDa)	Matches	Cover (%)	Score	Sequência	7 dias 113	7 dias 114	7 dias 114/113			
ACTB_HUMAN	1	Actin, cytoplasmic 1	184	41710	32	37,9	12,38	AVFPSIVGRPR	0,14	0,15	1,07	10,34	0,93	11,76
ACTB_HUMAN	1	Actin, cytoplasmic 1	184	41710	32	37,9	10,42	DLTDYLMK	0,10	0,10	1,00	30,00	1,00	11,76
ACTB_HUMAN	1	Actin, cytoplasmic 1	184	41710	32	37,9	28,12	GYSFTTTAER	0,11	0,00	0,00	118,18	0,00	11,76
ACTB_HUMAN	1	Actin, cytoplasmic 1	184	41710	32	37,9	82,22	SYELPDGQVITIGNER	0,18	0,20	1,11	15,79	0,90	11,76
ACTBL_HUMAN	1	Beta-actin-like protein 2	140	41976	13	37,9	10,61	IIAPPER	0,08	0,08	1,00	12,50	1,00	11,76
ACTB_HUMAN	1	Actin, cytoplasmic 1	184	41710	32	37,9	65,31	GYSFTTTAER	0,11	0,16	1,45	3,70	0,69	11,76
ACTB_HUMAN	1	Actin, cytoplasmic 1	184	41710	32	37,9	43,6	AGFAGDDAPR	0,13	0,13	1,00	15,38	1,00	11,76
ACTB_HUMAN	1	Actin, cytoplasmic 1	184	41710	32	37,9	37,02	DSYVGDEAQSKR	0,13	0,15	1,15	35,71	0,87	11,76
ACTB_HUMAN	1	Actin, cytoplasmic 1	184	41710	32	37,9	13,5	QEYDESGPSIVHR	0,13	0,14	1,08	3,70	0,93	11,76
MYH9_HUMAN	1	Miosin-9	37	226392	4	3,4	7,42	VMQEQQGTHPK	0,21	0,24	1,14	15,56	0,88	11,76
ACTB_HUMAN	1	Actin, cytoplasmic 1	184	41710	32	37,9	12,06	HQGVMVGMGQK	0,22	0,23	1,05	2,22	0,96	11,76
ACTB_HUMAN	1	Actin, cytoplasmic 1	184	41710	32	37,9	13,61	HQGVMVGMGQK	0,24	0,28	1,17	7,69	0,86	11,76
RRBP1_HUMAN	1	Ribosome-binding protein 1	33	152381	3	3,1	32,9	KAEGAQNQGK	0,29	0,27	0,93	3,57	1,07	11,76
RRBP1_HUMAN	1	Ribosome-binding protein 1	33	152381	3	3,1	26,63	KAEGAQNQGK	0,34	0,28	0,82	19,35	1,21	11,76
VIME_HUMAN	1	Vimentin	91	53619	8	5,2	47,95	ILLAELEQLK	0,15	0,15	1,00	20,00	1,00	11,76
VIME_HUMAN	1	Vimentin	91	53619	8	5,2	82,18	ISLPLPNFSSLNLR	0,20	0,21	1,05	60,98	0,95	11,76
G3P_HUMAN	1	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	41	36030	2	4,2	41,34	LISWYDNEFGYSNR	0,12	0,13	1,08	12,00	0,92	11,76
ACTN1_HUMAN	1	Alpha-actinin-1	47	102993	3	2,5	30,56	VGWEQLLTTIAR	0,14	0,17	1,21	3,23	0,82	11,76
VIME_HUMAN	1	Vimentina	91	53619	8	5,2	24,75	ISLPLPNFSSLNLR	0,12	0,12	1,00	25,00	1,00	11,76
ENO_A_HUMAN	1	Alfa-enolase	53	47139	1	3,9	53,04	LAMQEFLMILPVGAANFR	0,11	0,12	1,09	21,74	0,92	11,76
ACTB_HUMAN	1	Actin, cytoplasmic 1	184	41710	32	37,9	14,35	SYELPDGQVITIGNER	0,14	0,16	1,14	6,67	0,88	11,76
ACTN1_HUMAN	1	Alpha-actinin-1	47	102993	3	2,5	47,01	LASDLLEWIR	0,22	0,20	0,91	9,52	1,10	11,76

ACTB_HUMAN	1	Actin, cytoplasmic 1	184	41710	32	37,9	37,77	GYSFTTTAER	0,24	0,30	1,25	3,70	0,80	11,76
ACTB_HUMAN	1	Actin, cytoplasmic 1	184	41710	32	37,9	4,64	AVFPSIVGRPR	0,21	0,24	1,14	11,11	0,88	11,76
VIME_HUMAN	1	Vimentina	91	53619	8	5,2	13,8	ISLPLPNFSSLNLR	0,17	0,18	1,06	2,86	0,94	11,76
ACTB_HUMAN	1	Actin, cytoplasmic 1	184	41710	32	37,9	43,05	SYELPDGQVITIGNER	0,15	0,16	1,07	29,03	0,94	11,76
ACTB_HUMAN	1	Actin, cytoplasmic 1	184	41710	32	37,9	9,55	AVFPSIVGRPR	0,16	0,18	1,13	11,76	0,89	11,76
TBA1B_HUMAN	1	Tubulina de cadeia alfa-1B	45	50120	4	7,8	12,81	LISQIVSSITASLR	0,18	0,17	0,94	14,29	1,06	11,76
KPYM_HUMAN	1	Isoenzima piruvato quinase M1/M2	71	57900	1	3	70,96	FGVEQDVDMVFASFIR	0,15	0,17	1,13	0,00	0,88	11,76
ACTB_HUMAN	1	Actin, cytoplasmic 1	184	41710	32	37,9	23,78	GYSFTTTAER	0,21	0,25	1,19	17,39	0,84	11,76
ACTB_HUMAN	1	Actin, cytoplasmic 1	184	41710	32	37,9	20,82	AVFPSIVGRPR	0,23	0,24	1,04	14,89	0,96	11,76
VIME_HUMAN	1	Vimentina	91	53619	8	5,2	37,77	ISLPLPNFSSLNLR	0,21	0,23	1,10	-4,55	0,91	11,76
ACTB_HUMAN	1	Actin, cytoplasmic 1	184	41710	32	37,9	45,44	SYELPDGQVITIGNER	0,18	0,20	1,11	5,26	0,90	11,76
ACTB_HUMAN	1	Actin, cytoplasmic 1	184	41710	32	37,9	19,76	GYSFTTTAER	0,17	0,18	1,06	14,29	0,94	11,76
ACTB_HUMAN	1	Actin, cytoplasmic 1	184	41710	32	37,9	10,69	AVFPSIVGRPR	0,19	0,22	1,16	7,32	0,86	11,76
TBA1B_HUMAN	1	Tubulina de cadeia alfa-1B	45	50120	4	7,8	35,72	LISQIVSSITASLR	0,17	0,21	1,24	26,32	0,81	11,76
VIME_HUMAN	1	Vimentina	91	53619	8	5,2	15,9	ISLPLPNFSSLNLR	0,16	0,19	1,19	14,29	0,84	11,76
ACTB_HUMAN	1	Actin, cytoplasmic 1	184	41710	32	37,9	28,98	GYSFTTTAER	0,23	0,24	1,04	19,15	0,96	11,76
ACTB_HUMAN	1	Actin, cytoplasmic 1	184	41710	32	37,9	15,82	AVFPSIVGRPR	0,19	0,27	1,42	26,09	0,70	11,76
ACTB_HUMAN	1	Actin, cytoplasmic 1	184	41710	32	37,9	11,48	EITALAPSTMK	0,13	0,14	1,08	11,11	0,93	11,76
VIME_HUMAN	1	Vimentina	91	53619	8	5,2	25,79	ISLPLPNFSSLNLR	0,16	0,18	1,13	5,88	0,89	11,76
ACTB_HUMAN	1	Actin, cytoplasmic 1	184	41710	32	37,9	35,18	SYELPDGQVITIGNER	0,13	0,17	1,31	6,67	0,76	11,76
ACTB_HUMAN	1	Actin, cytoplasmic 1	184	41710	32	37,9	25,86	GYSFTTTAER	0,20	0,22	1,10	0,00	0,91	11,76
ACTB_HUMAN	1	Actin, cytoplasmic 1	184	41710	32	37,9	12,2	AVFPSIVGRPR	0,24	0,23	0,96	2,13	1,04	11,76
ACTB_HUMAN	1	Actin, cytoplasmic 1	184	41710	32	37,9	46,87	SYELPDGQVITIGNER	0,18	0,19	1,06	8,11	0,95	11,76
TBB8_HUMAN	2	Tubulina beta-8 chain	38	49744	4	9,2	6,46	GRMPMR	0,15	0,24	1,60	12,82	0,63	9,68
ACTB_HUMAN	2	Actin, cytoplasmic 1	191	41710	22	29,9	3,28	IIAPPER	0,19	0,27	1,42	13,04	0,70	9,68
ACTB_HUMAN	2	Actin, cytoplasmic 1	191	41710	22	29,9	45,31	GYSFTTTAER	0,36	0,42	1,17	35,90	0,86	9,68
VIME_HUMAN	2	Vimentina	579	53619	35	40,6	15,02	FLEQQNK	0,56	0,49	0,88	12,38	1,14	9,68

ANXA2_HUMAN	2	AnexinaA2	60	38580	4	13	11,68	QDIAFAYQR	0,31	0,31	1,00	35,48	1,00	9,68
VIME_HUMAN	2	Vimentina	579	53619	35	40,6	16,15	TNEKVELQELNDR	0,59	0,44	0,75	55,34	1,34	9,68
NFH_HUMAN	2	Polipeptídeo de neurofilamento pesado	55	112411	5	1,8	4,21	IPSVSTHIK	0,22	0,24	1,09	8,70	0,92	9,68
ACTB_HUMAN	2	Actin, cytoplasmic 1	191	41710	22	29,9	32,36	AVFPSIVGRPR	0,83	0,94	1,13	3,95	0,88	9,68
VIME_HUMAN	2	Vimentina	579	53619	35	40,6	41,04	EEAENTLQSFR	0,30	0,30	1,00	10,00	1,00	9,68
TBB8_HUMAN	2	Tubulina beta-8 chain	38	49744	4	9,2	14,84	FPGQLNADLR	0,27	0,23	0,85	16,00	1,17	9,68
VIME_HUMAN	2	Vimentina	579	53619	35	40,6	19,66	FANYIDK	0,26	0,23	0,88	22,45	1,13	9,68
VIME_HUMAN	2	Vimentina	579	53619	35	40,6	37,25	ETNLDSLPLVDTHSK	0,22	0,22	1,00	22,73	1,00	9,68
ACTB_HUMAN	2	Actin, cytoplasmic 1	191	41710	22	29,9	101,7	VAPEEHPVLLTEAPLNPK	0,23	0,22	0,96	11,11	1,05	9,68
VIME_HUMAN	2	Vimentin	579	53619	35	40,6	55,31	EYQDLLNVK	0,51	0,40	0,78	14,29	1,28	9,68
VIME_HUMAN	2	Vimentin	579	53619	35	40,6	70,08	NLQEAEWYK	0,31	0,23	0,74	7,41	1,35	9,68
VIME_HUMAN	2	Vimentina	579	53619	35	40,6	40,8	VEVERDNLNAEDIMR	0,24	0,19	0,79	2,33	1,26	9,68
ACTC_HUMAN	2	Actin, alpha cardiac muscle 1	87	41992	18	21	5,99	YPIEHGII TNWDDMEK	0,15	0,16	1,07	9,68	0,94	9,68
ACTB_HUMAN	2	Actin, cytoplasmic 1	191	41710	22	29,9	39,21	DLTDYLMK	0,27	0,30	1,11	12,28	0,90	9,68
VIME_HUMAN	2	Vimentina	579	53619	35	40,6	101,03	EMEENFAVEA ANYQDTIGR	0,26	0,22	0,85	20,83	1,18	9,68
ACTC_HUMAN	2	Actin, alpha cardiac muscle 1	87	41992	18	21	30,26	YPIEHGII TNWDDMEK	0,22	0,24	1,09	4,35	0,92	9,68
ACTB_HUMAN	2	Actin, cytoplasmic 1	191	41710	22	29,9	25,99	GYSFTTAER	0,20	0,23	1,15	16,28	0,87	9,68
ACTB_HUMAN	2	Actin, cytoplasmic 1	191	41710	22	29,9	71,66	SYELPDGQVITIGNER	0,60	0,58	0,97	37,29	1,03	9,68
VIME_HUMAN	2	Vimentina	579	53619	35	40,6	108,27	EMEENFAVEA ANYQDTIGR	0,29	0,25	0,86	100,00	1,16	9,68
VIME_HUMAN	2	Vimentin	579	53619	35	40,6	13,28	MALDIEIATYR	0,15	0,16	1,07	9,68	0,94	9,68
VIME_HUMAN	2	Vimentina	579	53619	35	40,6	19,19	EYQDLLNVK	0,21	0,19	0,90	5,00	1,11	9,68
VIME_HUMAN	2	Vimentina	579	53619	35	40,6	56,28	ISLPLPNFSSLNLR	0,16	0,18	1,13	11,76	0,89	9,68
ACTB_HUMAN	2	Actin, cytoplasmic 1	191	41710	22	29,9	8,61	SYELPDGQVITIGNER	0,14	0,13	0,93	18,52	1,08	9,68
VIME_HUMAN	2	Vimentina	579	53619	35	40,6	97,88	KVESLQEEIAFLK	0,67	0,47	0,70	8,77	1,43	9,68
ACTB_HUMAN	2	Actin, cytoplasmic 1	191	41710	22	29,9	71,97	DLYANTVLSGGTTMYPGIADR	0,24	0,25	1,04	2,04	0,96	9,68
VIME_HUMAN	2	Vimentina	579	53619	35	40,6	17,34	MALDIEIATYR	0,23	0,21	0,91	22,73	1,10	9,68
VIME_HUMAN	2	Vimentina	579	53619	35	40,6	57,69	ISLPLPNFSSLNLR	0,18	0,19	1,06	2,70	0,95	9,68

ACTB_HUMAN	2	Actin, cytoplasmic 1	191	41710	22	29,9	25,65	SYELPDGQVITIGNER	0,18	0,19	1,06	8,11	0,95	9,68
ACTB_HUMAN	2	Actin, cytoplasmic 1	191	41710	22	29,9	4,44	IIAPPER	0,17	0,16	0,94	9,09	1,06	9,68
ACTC_HUMAN	2	Actin, alpha cardiac muscle 1	87	41992	18	13	4,44	IIAPPER	0,17	0,16	0,94	9,09	1,06	9,68
ACTB_HUMAN	2	Actin, cytoplasmic 1	191	41710	22	29,9	12,44	GYSFTTTAER	0,18	0,18	1,00	0,00	1,00	9,68
ACTB_HUMAN	2	Actin, cytoplasmic 1	191	41710	22	29,9	13,63	AVFPSIVGRPR	0,22	0,23	1,05	6,67	0,96	9,68
POTEE_HUMAN	2	POTE ankyrin domain family member E	75	121286	15	21	13,63	AVFPSIVGRPR	0,22	0,23	1,05	6,67	0,96	9,68
VIME_HUMAN	2	Vimentina	579	53619	35	40,6	10,09	MALDIEIATYR	0,17	0,19	1,12	5,56	0,89	9,68
TBA1B_HUMAN	2	Tubulina de cadeia alfa-1B	81	50120	6	13,1	26,86	EIIDLVLDR	0,16	0,20	1,25	11,11	0,80	9,68
ACTN1_HUMAN	2	Alpha-actinin-1	69	102993	3	3,7	48,72	GYEEWLLNEIR	0,18	0,18	1,00	5,56	1,00	9,68
ANXA2_HUMAN	2	AnexinaA2	60	38580	4	13	59,84	GVDEVTIVNLTNR	0,19	0,19	1,00	26,32	1,00	9,68
TBA1B_HUMAN	2	Tubulina de cadeia alfa-1B	81	50120	6	13,1	80,81	AVFVDLEPTVIDEV	0,16	0,16	1,00	6,25	1,00	9,68
VIME_HUMAN	2	Vimentina	579	53619	35	40,6	14,18	LQDEIQNMKEEMAR	0,16	0,12	0,75	0,00	1,33	9,68
VIME_HUMAN	2	Vimentina	579	53619	35	40,6	56,77	ILLAELEQLKGQQK	0,25	0,19	0,76	9,09	1,32	9,68
VIME_HUMAN	2	Vimentina	579	53619	35	40,6	24,68	EYQDLLNVK	0,25	0,21	0,84	4,35	1,19	9,68
NFH_HUMAN	2	Polipeptídeo de neurofilamento pesado	55	112411	5	1,8	24,68	EYQDLLNVK	0,25	0,21	0,84	4,35	1,19	9,68
VIME_HUMAN	2	Vimentina	579	53619	35	40,6	46,15	ISLPLPNFSSLNLR	0,16	0,15	0,94	16,13	1,07	9,68
ACTB_HUMAN	2	Actin, cytoplasmic 1	191	41710	22	29,9	23,16	SYELPDGQVITIGNER	0,20	0,19	0,95	17,95	1,05	9,68
ACTBL_HUMAN	2	Beta-actin-like protein 2	95	41976	11	13	23,16	SYELPDGQVITIGNER	0,20	0,19	0,95	17,95	1,05	9,68
VIME_HUMAN	2	Vimentina	579	53619	35	40,6	85,3	ISLPLPNFSSLNLR	1,45	1,13	0,78	9,30	1,28	9,68
VIME_HUMAN	2	Vimentina	579	53619	35	40,6	25,93	MALDIEIATYR	0,21	0,24	1,14	15,56	0,88	9,68
VIME_HUMAN	2	Vimentina	579	53619	35	40,6	60,67	ISLPLPNFSSLNLR	0,24	0,22	0,92	8,70	1,09	9,68
ACTB_HUMAN	2	Actin, cytoplasmic 1	191	41710	22	29,9	30,65	SYELPDGQVITIGNER	0,16	0,16	1,00	18,75	1,00	9,68
ACTN1_HUMAN	2	Alpha-actinin-1	69	102993	3	3,7	57,61	VGWEQLLTIAR	0,34	0,31	0,91	7,69	1,10	9,68
VIME_HUMAN	2	Vimentina	579	53619	35	40,6	59,79	ILLAELEQLK	0,69	0,50	0,72	7,56	1,38	9,68
POTEE_HUMAN	2	POTE ankyrin domain family member E	75	121286	15	6,3	19,6	ISSENSNPEQELK	0,69	0,50	0,72	7,56	1,38	9,68
VIME_HUMAN	2	Vimentina	579	53619	35	40,6	95,03	ISLPLPNFSSLNLR	0,47	0,33	0,70	5,00	1,42	9,68
VIME_HUMAN	2	Vimentina	579	53619	35	40,6	26,42	MALDIEIATYR	0,00	0,18	0,00	100,00	0,00	9,68

TBA1B_HUMAN	2	Tubulina de cadeia alfa-1B	81	50120	6	13,1	22,11	LISQIVSSITASLR	0,15	0,15	1,00	6,67	1,00	9,68
VIME_HUMAN	2	Vimentina	579	53619	35	40,6	42,95	ISLPLPNFSSLNLR	0,15	0,14	0,93	3,45	1,07	9,68
VIME_HUMAN	2	Vimentina	579	53619	35	40,6	54,83	ISLPLPNFSSLNLR	0,17	0,15	0,88	6,25	1,13	9,68
ENOA_HUMAN	2	Alfa-enolase	57	47139	1	3,9	56,55	LAMQEFLMILPVGAANFR	0,14	0,16	1,14	0,00	0,88	9,68
ACTN1_HUMAN	2	Alpha-actinin-1	69	102993	3	3,7	27,97	LASDLLEWIR	0,28	0,26	0,93	25,93	1,08	9,68
KPYM_HUMAN	3	Isoenzima piruvato quinase M1/M2	76	57900	1	3	75,5	FGVEQDVDMVFASFIR	0,19	0,17	0,89	22,22	1,12	7,29
VIME_HUMAN	3	Vimentina	167	53619	13	2,2	43,56	EYQDLLNVK	0,32	0,26	0,81	6,90	1,23	7,29
VIME_HUMAN	3	Vimentina	167	53619	13	12	40,56	NLQEAEWYK	1,44	0,93	0,65	51,05	1,55	7,29
ACTN1_HUMAN	3	Alpha-actinin-1	89	102993	3	3,7	50,9	LASDLLEWIR	0,29	0,23	0,79	7,69	1,26	7,29
ACTB_HUMAN	3	Actin, cytoplasmic 1	98	41710	18	21,3	75,41	SYELPDGQVITIGNER	0,59	0,62	1,05	14,05	0,95	7,29
ENOA_HUMAN	3	Alfa-enolase	62	47139	1	3,9	62,45	LAMQEFLMILPVGAANFR	0,13	0,16	1,23	10,34	0,81	7,29
TBA8_HUMAN	3	Tubulina de cadeia alfa-8	42	50062	2	8	41,59	FDGALNVDLTFQTNLVPYPR	0,18	0,18	1,00	5,56	1,00	7,29
VIME_HUMAN	3	Vimentina	167	53619	13	12	48,28	KVESLQEEIAFLK	0,30	0,21	0,70	1,96	1,43	7,29
ACTB_HUMAN	3	Actin, cytoplasmic 1	98	41710	18	21,3	56,08	DLYANTVLSGGTTMYPGIADR	0,18	0,19	1,06	8,11	0,95	7,29
ACTN1_HUMAN	3	Alpha-actinin-1	89	102993	3	3,7	64,57	VGWEQLTTIAR	0,39	0,27	0,69	9,09	1,44	7,29
VIME_HUMAN	3	Vimentina	167	53619	13	5	58,61	ILLAELEQLK	0,34	0,28	0,82	12,90	1,21	7,29
VIME_HUMAN	3	Vimentina	167	53619	13	12	79,97	ISLPLPNFSSLNLR	0,34	0,31	0,91	4,62	1,10	7,29
VIME_HUMAN	3	Vimentina	167	53619	13	12	70,62	ISLPLPNFSSLNLR	0,61	0,55	0,90	1,72	1,11	7,29
G3P_HUMAN	3	Gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase	53	36030	2	4,2	52,65	LISWYDNEFGYSNR	0,18	0,21	1,17	2,56	0,86	7,29
TBA1A_HUMAN	3	Tubulina de cadeia alfa-1A	65	50104	3	10	33,2	EIIDLVLDRL	0,22	0,23	1,05	2,22	0,96	7,29
ACTN1_HUMAN	3	Alpha-actinin-1	89	102993	3	3	51,05	GYEEWLNLNEIR	0,29	0,24	0,83	5,66	1,21	7,29
ANXA2_HUMAN	3	AnexinaA2	58	38580	3	6,8	57,84	GVDEVTIVNILTNR	0,19	0,19	1,00	15,79	1,00	7,29
TBA1A_HUMAN	3	Tubulina alpha-1A chain	65	50104	3	10	57,98	AVFVDLEPTVIDEVR	0,23	0,22	0,96	2,22	1,05	7,29
G3P_HUMAN	4	Gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase	60	36030	4	7,2	10,9	AGAHLQGGAK	0,18	0,17	0,94	8,57	1,06	3,57
ENOA_HUMAN	4	Alfa-enolase	62	47139	3	9,4	5,42	IEEELGSKAK	0,28	0,31	1,11	8,47	0,90	3,57
ACTN1_HUMAN	4	Alpha-actinin-1	53	102993	3	3,7	36,52	LASDLLEWIR	0,40	0,41	1,03	13,58	0,98	3,57
VIME_HUMAN	4	Vimentina	108	53619	7	7,9	10,58	ISLPLPNFSSLNLR	0,31	0,25	0,81	3,57	1,24	3,57
EF2_HUMAN	4	Elongation factor 2	45	95277	1	2,1	44,73	ALLELQLEPEELYQTFQR	0,19	0,20	1,05	2,56	0,95	3,57
ACTN1_HUMAN	4	Alpha-actinin-1	53	102993	3	3,7	52,73	VGWEQLTTIAR	0,37	0,30	0,81	1,49	1,23	3,57
G3P_HUMAN	4	Gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase	60	36030	4	7,2	33,88	LISWYDNEFGYSNR	0,15	0,15	1,00	0,00	1,00	3,57
ANXA2_HUMAN	4	Anexin A2	82	38580	4	12,4	81,64	GVDEVTIVNILTNR	0,17	0,18	1,06	8,57	0,94	3,57
TBA1A_HUMAN	4	Tubulina alpha-1A chain	58	50104	2	5,3	58,5	AVFVDLEPTVIDEVR	0,16	0,18	1,13	0,00	0,89	3,57
CALX_HUMAN	4	Calnexin	42	67526	2	4,1	41,58	KIPNPDFFEDLEPFR	0,28	0,30	1,07	3,45	0,93	3,57

FLNA_HUMAN	4	Filamin-A	35	280564	1	0,5	35,07	AEAGVPAEFSIWTR	0,16	0,20	1,25	5,56	0,80	3,57
ACTN1_HUMAN	5	Alpha-actinin-1	34	102993	3	3,7	33,68	VGWEQLLTTIAR	0,17	0,16	0,94	9,09	1,06	9,31
VIME_HUMAN	5	Vimentin	63	53619	3	3	63,11	ISLPLPNFSSLNLR	0,26	0,29	1,12	1,82	0,90	9,31
G3P_HUMAN	5	Gliceraleído-3-fosfato desidrogenase	53	36030	2	4,2	11,65	LISWYDNEFGYSNR	0,19	0,24	1,26	11,63	0,79	9,31
VIME_HUMAN	5	Vimentina	63	53619	3	3	22,68	ISLPLPNFSSLNLR	0,19	0,18	0,95	2,70	1,06	9,31
TBA1B_HUMAN	5	Tubulina de cadeia alfa-1B	56	50120	2	6,4	56,42	AVFVDLEPTVIDEV	0,17	0,18	1,06	2,86	0,94	9,31
ACTB_HUMAN	5	Actin, cytoplasmic 1	63	41710	4	14,9	44,53	DLYANTVLGGTTMYPGIADR	0,21	0,21	1,00	9,52	1,00	9,31
ACTB_HUMAN	5	Actin, cytoplasmic 1	63	41710	4	14,9	24,55	DLTDYLMK	0,20	0,24	1,20	18,18	0,83	9,31
VIME_HUMAN	6	Vimentina	707	53619	48	50,9	30,87	FADLSEAANR	0,84	0,51	0,61	17,04	1,65	11,11
VIME_HUMAN	6	Vimentina	707	53619	48	50,9	68,6	EEAENTLQSF	1,06	0,75	0,71	18,23	1,41	11,11
LMNA_HUMAN	6	Lamina A/C	40	74095	4	5,6	40,36	VAVEEVDEEGKFVR	0,53	0,42	0,79	3,16	1,26	11,11
VIME_HUMAN	6	Vimentina	707	53619	48	50,9	24,54	LQEEMLQR	0,68	0,54	0,79	19,67	1,26	11,11
ACTB_HUMAN	6	Actin, cytoplasmic 1	130	41710	10	22,4	27,14	AVFPSIVGRPR	0,67	0,90	1,34	19,75	0,74	11,11
VIME_HUMAN	6	Vimentina	707	53619	48	50,9	29,05	FANYIDK	1,38	1,04	0,75	24,79	1,33	11,11
VIME_HUMAN	6	Vimentina	707	53619	48	50,9	62,63	NLQEAEEWYK	1,46	0,95	0,65	26,14	1,54	11,11
PDIA1_HUMAN	6	Proteína disulfide-isomerase	106	57081	7	15,6	62,61	VDATEESDLAQGYGVR	0,51	0,47	0,92	10,20	1,09	11,11
VIME_HUMAN	6	Vimentina	707	53619	48	50,9	83,4	ETNLDSPLVDTHSK	0,70	0,38	0,54	12,96	1,84	11,11
ACTB_HUMAN	6	Actin, cytoplasmic 1	130	41710	10	22,4	49,6	VAPEEHPVLLTEAPLNPK	0,23	0,29	1,26	3,85	0,79	11,11
VIME_HUMAN	6	Vimentina	707	53619	48	50,9	39,54	SLYASSPGGVYATR	1,21	0,84	0,69	13,17	1,44	11,11
CALR_HUMAN	6	Calreticulina	79	48112	2	4,3	78,86	EQFLDGDGWTSR	1,00	0,81	0,81	1,66	1,23	11,11
VIME_HUMAN	6	Vimentina	707	53619	48	50,9	40,26	EYQDLLNVK	1,83	1,14	0,62	22,56	1,61	11,11
VIME_HUMAN	6	Vimentina	707	53619	48	50,9	46,77	NLQEAEEWYK	0,85	0,64	0,75	19,46	1,33	11,11
VIME_HUMAN	6	Vimentina	707	53619	48	50,9	48,27	VEVERDNLAEDIMR	0,83	0,63	0,76	10,96	1,32	11,11
PDIA1_HUMAN	6	Proteína disulfeto isomerase	106	57081	7	15,6	31,7	YQLDKDGVVLFK	0,60	0,57	0,95	11,11	1,05	11,11
ACTB_HUMAN	6	Actin, cytoplasmic 1	130	41710	10	22,4	53,68	GYSFTTTAER	0,44	0,68	1,55	8,93	0,65	11,11
PDIA1_HUMAN	6	Proteína disulfeto isomerase	106	57081	7	15,6	33,01	ALAPEYAK	0,41	0,49	1,20	6,67	0,84	11,11
PDIA1_HUMAN	6	Proteína disulfeto isomerase	106	57081	7	15,6	48,56	YKPESEELTAER	0,57	0,61	1,07	3,39	0,93	11,11
VIME_HUMAN	6	Vimentina	707	53619	48	50,9	36,24	LGDLYEEEMR	0,41	0,25	0,61	9,09	1,64	11,11
ACTB_HUMAN	6	Actin, cytoplasmic 1	130	41710	10	22,4	31,84	DLTDYLMK	0,31	0,36	1,16	10,45	0,86	11,11
PDIA3_HUMAN	6	Proteína disulfeto isomerase A3	96	56747	5	9,5	30,73	GFPTIYFSPANK	0,29	0,28	0,97	8,77	1,04	11,11
VIME_HUMAN	6	Vimentina	707	53619	48	50,9	24,26	MALDIEIATYR	0,33	0,25	0,76	17,24	1,32	11,11
ACTB_HUMAN	6	Actin, cytoplasmic 1	130	41710	10	22,4	89,24	SYELPDGQVITIGNER	0,49	0,69	1,41	5,08	0,71	11,11
VIME_HUMAN	6	Vimentina	707	53619	48	50,9	85,45	EMEENFAVEAANYQDTIGR	0,78	0,60	0,77	7,25	1,30	11,11

TBB2A_HUMAN	6	Tubulina de cadeia beta-2A	38	49875	1	3,4	37,79	AILVDLEPGTMDSVR	0,33	0,33	1,00	3,03	1,00	11,11
PDIA3_HUMAN	6	Proteína disulfeto isomerase A3	96	56747	5	9,5	41,71	DLLIAYYDVDYEK	0,42	0,40	0,95	12,20	1,05	11,11
KPYM_HUMAN	6	Isoenzima piruvato quinase M1/M2	94	57900	2	6,2	26,36	EAEEAIYHLQLFEELRR	0,33	0,29	0,88	9,68	1,14	11,11
TBA1A_HUMAN	6	Tubulina de cadeia alfa-1A	109	50104	3	8	54,15	EIIDLVLDR	0,32	0,31	0,97	17,46	1,03	11,11
ANXA2_HUMAN	6	AnexinaA2	74	38580	1	4,1	74,39	GVDEVTIVNILTNR	0,38	0,46	1,21	7,14	0,83	11,11
TBA1A_HUMAN	6	Tubulina de cadeia alfa-1A	109	50104	3	8	92,47	AVFVDLEPTVIDEV	0,46	0,45	0,98	3,30	1,02	11,11
PDIA3_HUMAN	6	Proteína disulfeto isomerase A3	96	56747	5	9,5	86,81	ELSDFSIYLQR	1,10	0,77	0,70	15,51	1,43	11,11
PDIA1_HUMAN	6	Proteína disulfeto isomerase	106	57081	7	15,6	49,52	ILFIFIDSDHTDNQR	0,28	0,26	0,93	7,41	1,08	11,11
ENO_A_HUMAN	6	Alfa-enolase	50	47139	3	9,4	30,56	VVIGMDVAASEFFR	0,26	0,32	1,23	10,34	0,81	11,11
VIME_HUMAN	6	Vimentina	707	53619	48	50,9	62,19	ISLPLPNFSSLNLR	0,53	0,44	0,83	21,65	1,20	11,11
ENO_A_HUMAN	6	Alfa-enolase	50	47139	3	9,4	47,74	LAMQEFLMILPVGAANFR	0,27	0,28	1,04	12,73	0,96	11,11
PDIA1_HUMAN	6	Proteína disulfeto isomerase	106	57081	7	15,6	43,82	ILEFFGLK	1,64	1,84	1,12	15,52	0,89	11,11
RPN2_HUMAN	6	Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase subunit 2	47	69241	1	1,9	47,09	SIVEEIEDLVAR	0,48	0,52	1,08	20,00	0,92	11,11
VIME_HUMAN	6	Vimentina	707	53619	48	50,9	65,73	ISLPLPNFSSLNLR	0,45	0,34	0,76	24,05	1,32	11,11
CKAP4_HUMAN	6	Cytoskeleton-associated protein 4	73	65983	2	2,7	35,53	VQSLQATFGTFESILR	0,30	0,32	1,07	3,23	0,94	11,11
KPYM_HUMAN	6	Isoenzima piruvato quinase M1/M2	94	57900	2	6,2	96,45	FGVEQDVDMVFASFIR	0,37	0,31	0,84	17,65	1,19	11,11
VIME_HUMAN	7	Vimentina	645	53619	46	52,1	31,99	KLLEGEESR	1,07	0,74	0,69	8,29	1,45	7,04
ACTB_HUMAN	7	Actin, cytoplasmic 1	114	41710	6	22,4	34,01	GYSFTTTAER	0,29	0,28	0,97	12,28	1,04	7,04
VIME_HUMAN	7	Vimentina	645	53619	46	52,1	37,25	FLEQQNK	0,83	0,59	0,71	7,04	1,41	7,04
VIME_HUMAN	7	Vimentina	645	53619	46	52,1	47,02	SLYASSPGGVYATR	0,38	0,29	0,76	10,45	1,31	7,04
VIME_HUMAN	7	Vimentina	645	53619	46	52,1	28,99	TNEKVELQELNDR	0,35	0,31	0,89	12,12	1,13	7,04
CALU_HUMAN	7	Calumenina	36	37084	4	4,8	32,86	EQFVEFR	0,45	0,48	1,07	3,23	0,94	7,04
ACTB_HUMAN	7	Actin, cytoplasmic 1	114	41710	6	22,4	62	VAPEEHPVLLTEAPLNPK	0,23	0,27	1,17	0,00	0,85	7,04
CALU_HUMAN	7	Calumenina	36	37084	4	4,8	31,84	WIYEDVER	0,35	0,36	1,03	1,41	0,97	7,04
VIME_HUMAN	7	Vimentina	645	53619	46	52,1	54,8	EYQDLLNVK	1,30	0,88	0,68	18,35	1,48	7,04
ACTB_HUMAN	7	Actin, cytoplasmic 1	114	41710	6	22,4	34,42	DLTDYLMK	0,20	0,22	1,10	9,52	0,91	7,04
PDIA6_HUMAN	7	Proteína disulfeto	85	48091	3	9,5	53,69	GSFSEQGGINEFLR	0,58	0,46	0,79	15,38	1,26	7,04

isomerase A6															
TBA1B_HUMAN	7	Tubulina de cadeia alfa-1B	124	50120	6	16,6	27	IHFPLATYAPVISAEK	0,28	0,27	0,96	5,45	1,04	7,04	
ACTB_HUMAN	7	Actin, cytoplasmic 1	114	41710	6	22,4	57,91	SYELPDGQVITIGNER	0,43	0,47	1,09	11,11	0,91	7,04	
TBB2A_HUMAN	7	Tubulina de cadeia beta-2A	56	49875	4	11	56,11	AILVDLEPGTMDSVR	0,33	0,29	0,88	3,23	1,14	7,04	
SERPH_HUMAN	7	Serpin H1	53	46411	2	6,7	53,18	LYGPSSVSFADDFVR	0,28	0,29	1,04	1,75	0,97	7,04	
ACTB_HUMAN	7	Actin, cytoplasmic 1	114	41710	6	22,4	68,13	DLYANTVLSGGTTMYPGIADR	0,24	0,27	1,13	5,88	0,89	7,04	
ATPB_HUMAN	7	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	148	56525	5	14	36,65	VVDLLAPYAK	0,41	0,38	0,93	13,92	1,08	7,04	
ATPB_HUMAN	7	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	148	56525	5	14	39,12	FTQAGSEVSALLGR	0,40	0,31	0,78	12,68	1,29	7,04	
TBA1B_HUMAN	7	Tubulina de cadeia alfa-1B	124	50120	6	16,6	52,14	EIIDLVLDR	0,57	0,50	0,88	21,50	1,14	7,04	
ATPB_HUMAN	7	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	148	56525	5	14	54,98	LVLEVAQHLGESTVR	0,40	0,41	1,03	1,23	0,98	7,04	
TBA1B_HUMAN	7	Tubulina de cadeia alfa-1B	124	50120	6	16,6	95,1	AVFVDLEPTVIDEV	0,92	0,76	0,83	28,57	1,21	7,04	
ATPB_HUMAN	7	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	148	56525	5	14	83,36	AIAELGIYPAVDPLDSTS	0,36	0,38	1,06	0,00	0,95	7,04	
PDIA6_HUMAN	7	Protein disulfide-isomerase A6	85	48091	3	9,5	25,81	TGEAIVDAALSLR	0,35	0,36	1,03	9,86	0,97	7,04	
TBA1B_HUMAN	7	Tubulina de cadeia alfa-1B	124	50120	6	16,6	31,48	LISQIVSSITASLR	0,20	0,17	0,85	13,51	1,18	7,04	
KPYM_HUMAN	7	Isoenzima piruvato quinase M1/M2	92	57900	1	3	92,47	FGVEQDVDMVFASFIR	0,37	0,34	0,92	1,41	1,09	7,04	
ATPB_HUMAN	7	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	148	56525	5	14	52,23	DQEQQDVLLFIDNIFR	0,23	0,25	1,09	4,17	0,92	7,04	
ATPA_HUMAN	7	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	65	59714	1	4	64,85	EVAFAQFGSDLDAATQQLLSR	0,24	0,26	1,08	4,00	0,92	7,04	
PDIA6_HUMAN	7	Proteína disulfeto isomerase A6	85	48091	3	9,5	64,26	LAAVDATVNQVLASR	0,50	0,46	0,92	4,17	1,09	7,04	
ENO_A_HUMAN	7	Alfa-enolase	63	47139	1	3,9	63,28	LAMQEFLMILPVGAANFR	0,27	0,31	1,15	13,79	0,87	7,04	
TBA1B_HUMAN	7	Tubulina de cadeia alfa-1B	124	50120	6	16,6	40,55	FDGALNVDLTEFQTNLVPYPR	0,21	0,20	0,95	2,44	1,05	7,04	
SERPH_HUMAN	8	Serpin H1	129	46411	6	11,5	40,57	ATTASQAK	0,66	0,50	0,76	6,90	1,32	6,26	
VIME_HUMAN	8	Vimentina	672	53619	38	40,8	46,49	KLLEGEEESR	1,17	0,85	0,73	0,00	1,38	6,26	
ACTB_HUMAN	8	Actin, cytoplasmic 1	369	41710	39	39,2	45,68	GYSFTTTAER	0,22	0,21	0,95	6,98	1,05	6,26	
VIME_HUMAN	8	Vimentina	672	53619	38	40,8	70,11	ISLPLPNFSSLNLR	0,19	0,18	0,95	2,70	1,06	6,26	
ACTB_HUMAN	8	Actin, cytoplasmic 1	369	41710	39	39,2	61,58	SYELPDGQVITIGNER	0,16	0,18	1,13	11,76	0,89	6,26	

VIME_HUMAN	8	Vimentina	672	53619	38	40,8	42,61	ISLPLPNFSSLNLR	0,30	0,23	0,77	9,43	1,30	6,26
ACTB_HUMAN	8	Actin, cytoplasmic 1	369	41710	39	39,2	74,96	SYELPDGQVITIGNER	0,23	0,24	1,04	14,89	0,96	6,26
ACTB_HUMAN	8	Actin, cytoplasmic 1	369	41710	39	39,2	17,22	GYSFTTTAER	0,22	0,26	1,18	0,00	0,85	6,26
ENO_A_HUMAN	8	Alfa-enolase	158	47139	10	16,8	27,42	VVIGMDVAASEFFR	0,29	0,29	1,00	6,90	1,00	6,26
VIME_HUMAN	8	Vimentina	672	53619	38	40,8	43,19	ISLPLPNFSSLNLR	0,31	0,25	0,81	0,00	1,24	6,26
ENO_A_HUMAN	8	Alfa-enolase	158	47139	10	16,8	31,33	VVIGMDVAASEFFR	0,28	0,24	0,86	0,00	1,17	6,26
SERPH_HUMAN	8	Serpin H1	129	46411	6	11,5	76,66	DTQSGSLLFIGR	0,46	0,43	0,93	5,62	1,07	6,26
ENO_A_HUMAN	8	Alfa-enolase	158	47139	10	16,8	30,35	VVIGMDVAASEFFR	0,28	0,28	1,00	21,43	1,00	6,26
ACTB_HUMAN	8	Actin, cytoplasmic 1	369	41710	39	39,2	43,99	DLTDYLMK	0,69	0,72	1,04	9,22	0,96	6,26
ENO_A_HUMAN	8	Alfa-enolase	158	47139	10	16,8	58,58	YISPDQLADLYK	0,67	0,72	1,07	7,91	0,93	6,26
ENO_A_HUMAN	8	Alfa-enolase	158	47139	10	16,8	59,11	VVIGMDVAASEFFR	0,29	0,36	1,24	23,08	0,81	6,26
ENO_A_HUMAN	8	Alfa-enolase	158	47139	10	16,8	87,92	LAMQEFMILPVGAANFR	0,51	0,56	1,10	2,80	0,91	6,26
TBB2A_HUMAN	8	Tubulina de cadeia beta-2A	39	49875	3	8,8	39,25	AILVDLEPGTMDSVR	0,35	0,35	1,00	0,00	1,00	6,26
SERPH_HUMAN	8	Serpin H1	129	46411	6	11,5	59,7	LYGPSSVSFADDFVR	0,81	0,73	0,90	7,79	1,11	6,26
ENO_A_HUMAN	8	Alfa-enolase	158	47139	10	16,8	43,22	AAVPSGASTGIYEALELR	0,44	0,44	1,00	4,55	1,00	6,26
ACTB_HUMAN	8	Actin, cytoplasmic 1	369	41710	39	39,2	44,59	AVFPSIVGRPR	0,22	0,25	1,14	2,13	0,88	6,26
SERPH_HUMAN	8	Serpin H1	129	46411	6	11,5	42,07	LFYADHPFIFLVR	0,44	0,40	0,91	7,14	1,10	6,26
TBA1B_HUMAN	8	Tubulina de cadeia alfa-1B	101	50120	5	12,2	40,46	EIIDLVLDR	0,41	0,48	1,17	23,60	0,85	6,26
ANXA2_HUMAN	8	AnexinaA2	61	38580	2	6,8	61,2	GVDEVTIVNILTNR	0,30	0,32	1,07	3,23	0,94	6,26
TBA1B_HUMAN	8	Tubulina de cadeia alfa-1B	101	50120	5	12,2	95,11	AVFVDLEPTVIDEV	0,69	0,71	1,03	30,00	0,97	6,26
VIME_HUMAN	9	Vimentina	133	53619	5	13,5	31,15	FLEQQNK	0,24	0,18	0,75	4,76	1,33	11,11
ACTB_HUMAN	9	Actin, cytoplasmic 1	470	41710	68	42,7	46,46	GYSFTTTAER	0,48	0,39	0,81	5,75	1,23	11,11
ACTB_HUMAN	9	Actin, cytoplasmic 1	470	41710	68	42,7	60,6	SYELPDGQVITIGNER	0,24	0,24	1,00	12,50	1,00	11,11
ACTB_HUMAN	9	Actin, cytoplasmic 1	470	41710	68	42,7	42,24	VAPEEHPVLLTEAPLNPK	0,22	0,21	0,95	16,28	1,05	11,11
ACTB_HUMAN	9	Actin, cytoplasmic 1	470	41710	68	42,7	58,56	SYELPDGQVITIGNER	0,31	0,30	0,97	27,87	1,03	11,11
ACTB_HUMAN	9	Actin, cytoplasmic 1	470	41710	68	42,7	62,17	SYELPDGQVITIGNER	0,33	0,30	0,91	23,81	1,10	11,11
G3P_HUMAN	9	Gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase	105	36030	6	11,3	27,65	AGAHLQGGAK	0,35	0,39	1,11	10,81	0,90	11,11

TPM1_HUMAN	9	Tropomiosina de cadeia alpha-1	53	32689	3	8,1	31,41	AEQAEADKK	0,79	0,61	0,77	4,29	1,30	11,11
ENO_A_HUMAN	9	Alfa-enolase	53	47139	2	7,1	33,35	VVIGMDVAASEFFR	0,22	0,21	0,95	2,33	1,05	11,11
ACTB_HUMAN	9	Actin, cytoplasmic 1	470	41710	68	42,7	65,51	SYELPDGQVITIGNER	0,23	0,24	1,04	19,15	0,96	11,11
ENO_A_HUMAN	9	Alfa-enolase	53	47139	2	7,1	46,59	LAMQEFMILPVGAANFR	0,22	0,27	1,23	22,45	0,81	11,11
VIME_HUMAN	9	Vimentina	133	53619	5	13,5	57,34	ILLAELEQLK	0,46	0,49	1,07	3,16	0,94	11,11
SEPT2_HUMAN	9	Septin-2	35	41461	2	7,8	35,1	TIISYIDEQFER	0,29	0,30	1,03	11,86	0,97	11,11
VIME_HUMAN	9	Vimentina	133	53619	5	13,5	68,53	ISLPLPNFSSLNLR	0,61	0,47	0,77	11,11	1,30	11,11
G3P_HUMAN	9	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	105	36030	6	11,3	100,94	LISWYDNEFGYSNR	0,58	0,59	1,02	26,50	0,98	11,11
ACTB_HUMAN	9	Actin, cytoplasmic 1	470	41710	68	42,7	36,62	GYSFTTTAER	0,53	0,54	1,02	14,02	0,98	11,11
TPM1_HUMAN	9	Tropomiosina de cadeia alpha-1	53	32689	3	8,1	47,09	IQLVEEELDR	0,57	0,45	0,79	7,84	1,27	11,11
G3P_HUMAN	9	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	105	36030	6	11,3	43,23	LVINGNPITIFQER	0,31	0,31	1,00	12,90	1,00	11,11
TPM1_HUMAN	9	Tropomiosina de cadeia alpha-1	53	32689	3	8,1	43,76	IQLVEEELDRAQER	0,48	0,38	0,79	2,33	1,26	11,11
ACTB_HUMAN	9	Actin, cytoplasmic 1	470	41710	68	42,7	28,01	SYELPDGQVITIGNER	0,38	0,39	1,03	24,68	0,97	11,11
VIME_HUMAN	9	Vimentina	133	53619	5	13,5	34,97	KVESLQEEIAFLK	0,36	0,36	1,00	2,78	1,00	11,11
SERPH_HUMAN	9	Serpin H1	55	46411	1	3,6	54,61	LYGPSSVSFADDFVR	0,25	0,26	1,04	1,96	0,96	11,11
VIME_HUMAN	9	Vimentina	133	53619	5	13,5	72,54	EMEENFAVEAANYQDTIGR	0,28	0,26	0,93	3,70	1,08	11,11
ANXA1_HUMAN	10	AnexinaA1	109	38690	2	10,1	109,34	GLGTDEDTLIEILASR	0,89	0,72	0,81	9,32	1,24	6,67
ANXA2_HUMAN	10	AnexinaA2	160	38580	15	34,8	41,26	GVDEVTIVNILTNR	0,26	0,24	0,92	4,00	1,08	6,67
ANXA2_HUMAN	10	AnexinaA2	160	38580	15	34,8	28,56	GVDEVTIVNILTNR	0,24	0,27	1,13	13,73	0,89	6,67
ANXA2_HUMAN	10	AnexinaA2	160	38580	15	34,8	55,07	SALSGHLETVILGLLK	0,41	0,38	0,93	13,92	1,08	6,67
ANXA2_HUMAN	10	AnexinaA2	160	38580	15	34,8	28,49	SYSPYDMLESIR	0,44	0,50	1,14	2,13	0,88	6,67
ANXA2_HUMAN	10	AnexinaA2	160	38580	15	34,8	58,47	SLYYYYIQQDTK	0,56	0,57	1,02	22,12	0,98	6,67
ANXA2_HUMAN	10	AnexinaA2	160	38580	15	34,8	44,43	AEDGSVIDYELIDQDAR	0,34	0,29	0,85	7,94	1,17	6,67
ANXA2_HUMAN	10	AnexinaA2	160	38580	15	34,8	30,64	LMVALAK	0,71	0,61	0,86	13,64	1,16	6,67
ANXA2_HUMAN	10	AnexinaA2	160	38580	15	34,8	25,72	QDIAFAYQR	0,46	0,48	1,04	0,00	0,96	6,67
ANXA5_HUMAN	10	AnexinaA5	39	35914	2	8,4	38,57	GLGTDEESILTLLSR	0,42	0,45	1,07	12,64	0,93	6,67

G3P_HUMAN	10	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	480	36030	27	32,8	74,47	LISWYDNEFGYSNR	0,83	0,66	0,80	6,04	1,26	6,67
G3P_HUMAN	10	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	480	36030	27	32,8	45,96	LVINGNPITIFQER	0,97	0,83	0,86	6,67	1,17	6,67
G3P_HUMAN	10	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	480	36030	27	32,8	62,41	AGAHLQGGAK	2,55	1,91	0,75	10,76	1,34	6,67
G3P_HUMAN	10	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	480	36030	27	32,8	60,35	GALQNIIPASTGAAK	0,52	0,44	0,85	0,00	1,18	6,67
TPM1_HUMAN	10	Tropomiosina de cadeia alpha-1	101	32689	9	16,9	56,47	IQLVEEELDR	0,67	0,51	0,76	5,08	1,31	6,67
TPM1_HUMAN	10	Tropomiosina de cadeia alpha-1	101	32689	9	16,9	40,58	IQLVEEELDRAQER	0,65	0,59	0,91	8,06	1,10	6,67
TPM1_HUMAN	10	Tropomiosina de cadeia alpha-1	101	32689	9	16,9	39,34	AQKDEEK	0,68	0,47	0,69	2,61	1,45	6,67
TPM1_HUMAN	10	Tropomiosina de cadeia alpha-1	101	32689	9	16,9	41,16	AEQAEADKK	0,94	0,65	0,69	4,40	1,45	6,67
TPM1_HUMAN	10	Tropomiosina de cadeia alpha-1	101	32689	9	16,9	49,59	KLVIIESDLER	0,82	0,58	0,71	0,00	1,41	6,67
ANXA5_HUMAN	11	AnexinaA5	206	35914	15	29,4	112,56	GLGTDEESILTLLTSR	0,99	0,94	0,95	1,55	1,05	10,71
ACTN1_HUMAN	11	Alpha-actinin-1	41	102993	1	1,3	41,06	VGWEQLLTTIAR	0,24	0,28	1,17	11,54	0,86	10,71
VIME_HUMAN	11	Vimentina	163	53619	6	12	50,63	ILLAELEQLK	0,26	0,33	1,27	11,86	0,79	10,71
VIME_HUMAN	11	Vimentina	163	53619	6	12	53,19	ISLPLPNFSSLNLR	0,27	0,27	1,00	7,41	1,00	10,71
CATD_HUMAN	11	Cathepsin D	57	44524	1	3,2	57,13	LVDQNIFSFYLSR	0,23	0,29	1,26	7,69	0,79	10,71
ANXA1_HUMAN	11	AnexinaA1	35	38690	2	9	34,66	GLGTDEDTLIEILASR	0,25	0,29	1,16	0,00	0,86	10,71
G3P_HUMAN	11	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	60	36030	2	4,2	42,64	LISWYDNEFGYSNR	0,21	0,19	0,90	10,00	1,11	10,71
ANXA5_HUMAN	11	AnexinaA5	206	35914	15	29,4	31,29	GLGTDEESILTLLTSR	0,20	0,19	0,95	2,56	1,05	10,71
PDIA3_HUMAN	11	Protein disulfide-isomerase A3	69	56747	1	2,2	68,99	ELSDFISYQLR	0,29	0,27	0,93	10,71	1,07	10,71
VIME_HUMAN	11	Vimentina	163	53619	6	12	76,48	ISLPLPNFSSLNLR	0,40	0,42	1,05	9,76	0,95	10,71
G3P_HUMAN	11	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	60	36030	2	4,2	54,72	LISWYDNEFGYSNR	0,24	0,25	1,04	6,12	0,96	10,71
ANXA5_HUMAN	11	AnexinaA5	206	35914	15	29,4	28,57	FITIFGTR	0,35	0,44	1,26	6,33	0,80	10,71
TPM4_HUMAN	11	Tropomiosina de cadeia alpha-4	110	28504	6	12,9	32,09	LVILEGELER	0,25	0,27	1,08	3,85	0,93	10,71
TPM4_HUMAN	11	Tropomiosina de cadeia alpha-4	110	28504	6	12,9	52,15	IQLVEEELDR	0,62	0,75	1,21	15,33	0,83	10,71
ANXA2_HUMAN	11	AnexinaA2	121	38580	11	24,2	92,46	GVDEVTIVNLTNR	0,50	0,66	1,32	27,59	0,76	10,71

TBA1A_HUMAN	11	Tubulina alpha-1A chain	37	50104	1	3,3	36,82	AVFVDLEPTVIDEV	0,19	0,22	1,16	7,32	0,86	10,71
TPM4_HUMAN	11	Tropomiosina de cadeia alpha-4	110	28504	6	12,9	67,29	IQLVEEELDRAQER	0,34	0,38	1,12	25,00	0,89	10,71
ANXA5_HUMAN	11	AnexinaA5	206	35914	15	29,4	34,58	WGTDEEKFITIFGTR	0,27	0,33	1,22	6,67	0,82	10,71
ANXA5_HUMAN	11	AnexinaA5	206	35914	15	29,4	40,92	FITIFGTR	0,58	0,56	0,97	12,28	1,04	10,71
TPM4_HUMAN	11	Tropomiosina de cadeia alpha-4	110	28504	6	12,9	40,8	IQLVEEELDRAQER	0,40	0,43	1,08	15,66	0,93	10,71
ANXA5_HUMAN	11	AnexinaA5	206	35914	15	29,4	28,18	GLGTDEEESILLLTSR	0,21	0,18	0,86	7,69	1,17	10,71
ANXA2_HUMAN	11	AnexinaA2	121	38580	11	24,2	32,28	WISIMTER	0,35	0,47	1,34	24,39	0,74	10,71
ANXA2_HUMAN	11	AnexinaA2	121	38580	11	24,2	37,57	SYSPYDMLESIR	0,32	0,47	1,47	24,05	0,68	10,71
SERPH_HUMAN	11	Serpin H1	43	46411	2	6,7	43,29	LYGPSSVSFADDFVR	0,27	0,29	1,07	14,29	0,93	10,71
VIME_HUMAN	11	Vimentina	163	53619	6	12	69,87	KVESLQEEIAFLK	0,34	0,34	1,00	17,65	1,00	10,71
ANXA5_HUMAN	11	AnexinaA5	206	35914	15	29,4	44	VLTEIIASR	0,50	0,54	1,08	1,92	0,93	10,71
ANXA5_HUMAN	11	AnexinaA5	206	35914	15	2,5	72,85	SEIDLNFNIR	0,75	0,77	1,03	1,32	0,97	10,71
ANXA5_HUMAN	11	AnexinaA5	206	35914	15	29,4	31,18	LIVALMKPSR	0,41	0,42	1,02	6,02	0,98	10,71
TPM4_HUMAN	11	Tropomiosina de cadeia alpha-4	110	28504	6	12,9	66,05	KLVILEGELER	0,40	0,44	1,10	35,71	0,91	10,71
ACTB_HUMAN	11	Actin, cytoplasmic 1	84	41710	5	12	73,27	SYELPDGQVITIGNER	0,40	0,53	1,33	18,28	0,75	10,71
ACTB_HUMAN	11	Actin, cytoplasmic 1	84	41710	5	12	39,04	DLTDYLMK	0,18	0,27	1,50	37,78	0,67	10,71
TPM3_HUMAN	11	Tropomiosina de cadeia alpha-3	83	32799	5	11,3	29,33	KLVIEEGDLER	0,40	0,45	1,13	10,59	0,89	10,71
ANXA2_HUMAN	11	AnexinaA2	121	38580	11	24,2	64,81	SLYYYIQQDTK	0,28	0,32	1,14	30,00	0,88	10,71
VIME_HUMAN	11	Vimentina	163	53619	6	12	50,7	NLQEAEEWYK	0,34	0,35	1,03	24,64	0,97	10,71
ANXA5_HUMAN	11	AnexinaA5	206	35914	15		49,99	GTVTDFPGFDER	0,30	0,35	1,17	10,77	0,86	10,71
G3P_HUMAN	12	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	60	36224	2	7,2	44,21	AGAHLQGGAK	0,00	0,12	0,00	100,00	0,00	47,16
G3P_HUMAN	12	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	60	36224	2	7,2	48,81	LISWYDNEFGYSNR	0,05	0,03	0,60	50,00	1,67	47,16
HSPB1_HUMAN	12	proteína Heat shock beta-1	130	22839	5	21	44,12	LFDQAFGLPR	0,37	0,60	1,62	44,33	0,62	47,16
HSPB1_HUMAN	12	proteína Heat shock beta-1	130	22839	5	21	46,66	LFDQAFGLPR	0,20	0,32	1,60	19,23	0,63	47,16
CRYAB_HUMAN	13	Alpha-crystallin B chain	93	20159	3	20	53,4	RPFFPFHSPSR	0,24	0,39	1,63	4,76	0,62	9,97
TAGL_HUMAN	13	Transgelina	78	22668	3	18,9	27,12	GDPNWFMK	0,38	0,35	0,92	28,77	1,09	9,97

CRYAB_HUMAN	13	Alpha-crystallin B chain	93	20159	3	20	72,42	VLGDVIEVHGK	0,18	0,37	2,06	9,09	0,49	9,97
RAB15_HUMAN	13	Ras-related protein Rab-15	44	24676	1	44,41	44,41	IQIWDTAGQER	0,20	0,22	1,10	19,05	0,91	9,97
CRYAB_HUMAN	14	Alpha-crystallin B chain	49	20159	4	24,6	28,44	KQVSGPER	0,12	0,21	1,75	39,39	0,57	9,09
CRYAB_HUMAN	14	Alpha-crystallin B chain	49	20159	4	24,6	41,45	EEKPAVTAAPK	0,19	0,40	2,11	45,76	0,48	9,09
CRYAB_HUMAN	14	Alpha-crystallin B chain	49	20159	4	24,6	47,49	RPFFPFHSPSR	0,24	0,42	1,75	9,09	0,57	9,09
RAB10_HUMAN	14	Ras-related protein Rab-10	53	22769	2	11	53	AFLTLAEDILR	0,12	0,16	1,33	7,14	0,75	9,09
PPIB_HUMAN	14	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	73	23799	7	28,2	19,32	KVESTK	0,17	0,18	1,06	8,57	0,94	9,09
PPIB_HUMAN	14	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	73	23799	7	28,2	61,65	TVDNFVALATGEK	0,30	0,23	0,77	9,43	1,30	9,09
PPIB_HUMAN	14	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	73	23799	7	28,2	47,63	VIFGLFGK	0,97	0,67	0,69	4,88	1,45	9,09
COF1_HUMAN	15	Cofilina-1	111	18730	3	19,9	29,89	KSSTPEEVK	1,09	1,04	0,95	27,70	1,05	14,06
STMN1_HUMAN	15	Stathmin	56	17302	2	14,8	28,75	DLSLEEIQK	0,26	0,28	1,08	7,41	0,93	14,06
COF1_HUMAN	15	Cofilina-1	111	18730	3	19,9	73,82	YALYDATYETK	0,62	0,66	1,06	14,06	0,94	14,06
STMN1_HUMAN	15	Stathmin	56	17302	2	14,8	56,42	ASGQAFELILSPR	0,46	0,41	0,89	5,75	1,12	14,06
COF1_HUMAN	15	Cofilin-1	111	18730	3	19,9	74,23	YALYDATYETK	1,25	1,25	1,00	28,00	1,00	14,06
ML12A_HUMAN	15	Miosina regulatória de cadeia leve 12A	59	19851	2	20,5	58,95	GNFNYIEFTR	0,64	0,58	0,91	14,75	1,10	14,06
PTRF_HUMAN	15	Polymerase I and transcript release factor	35	43476	1	10,6	35,28	VPPFTFHVK	0,21	0,21	1,00	9,52	1,00	14,06
RLA1_HUMAN	16	60S acidic ribosomal protein P1	110	11628	2	18,4	110,42	AAGVNVEFWPGLFAK	0,23	0,50	2,17	9,59	0,46	46,39
PPIA_HUMAN	16	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	121	18240	8	42,4	54,42	VSFELFADK	0,38	0,59	1,55	50,52	0,64	46,39
CS010_HUMAN	16	UPF0556 protein C19orf10	58	18909	3	18,5	49,17	SYLYFTQFK	0,43	0,54	1,26	46,39	0,80	46,39
PPIA_HUMAN	16	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	121	18240	8	42,4	65,18	VSFELFADKVPK	1,02	1,47	1,44	57,43	0,69	46,39
PPIA_HUMAN	16	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	121	18240	8	42,4	70,94	SIYGEKFEDENFILK	0,71	1,15	1,62	58,06	0,62	46,39
PPIA_HUMAN	16	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	121	18240	8	42,4	22,36	ALSTGEK	0,41	0,90	2,20	55,73	0,46	46,39
COF1_HUMAN	16	Cofilina-1	38	18730	2	12	26,28	KSSTPEEVK	0,15	0,33	2,20	33,33	0,45	46,39
CS010_HUMAN	16	UPF0556 protein C19orf10	58	18909	3	18,5	41,73	TAVAHRPGAFK	0,24	0,33	1,38	47,37	0,73	46,39

NDKB_HUMAN	16	Nucleosídeo difosfato quinase B	30	17412	2	8,9	27,9	DRPFFPGLVK	0,29	0,56	1,93	41,18	0,52	46,39
COF1_HUMAN	16	Cofilina-1	38	18730	2	12	38,05	YALYDATYETK	0,17	0,31	1,82	16,67	0,55	46,39
CALM_HUMAN	16	Calmodulina	91	16837	2	68,3	68,3	VFDKDGNGYISAAELR	0,22	0,34	1,55	42,86	0,65	46,39
NDKB_HUMAN	16	Nucleosídeo difosfato quinase B	30	17412	2	12,2	29,61	TFIAIKPDGVQR	0,34	0,54	1,59	47,73	0,63	46,39
H2A1C_HUMAN	17	Histona H2A type 1-C	138	14105	4	26,9	131,78	VTIAQGGVLPNIQAVLLPK	0,36	0,52	1,44	6,82	0,69	10,60
LEG1_HUMAN	17	Galectina-1	55	15058	4	25,2	39,47	LNLEAINYMAADGDFK	0,32	0,51	1,59	27,71	0,63	10,60
PROF1_HUMAN	17	Profilina-1	70	15225	3	32,9	46,53	DSLLQDGEFSMDLR	0,20	0,28	1,40	4,17	0,71	10,60
PPIA_HUMAN	17	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	73	18240	4	33,9	56,35	VSFELFADKVPK	0,39	0,39	1,00	2,56	1,00	10,60
H4_HUMAN	17	Histona H4	126	11367	6	38,8	52,48	VFLENVIR	1,04	1,51	1,45	20,78	0,69	10,60
H4_HUMAN	17	Histona H4	126	11367	6	38,8	76,17	ISGLIYEETR	0,53	0,80	1,51	20,30	0,66	10,60
SMD3_HUMAN	17	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D3	41	14030	1	20,9	40,58	VAQLEQVYIR	0,21	0,26	1,24	6,38	0,81	10,60
PPIA_HUMAN	17	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	73	18240	4	33,9	50,22	SIYGEKFEDENFILK	0,78	0,67	0,86	6,21	1,16	10,60
MYL6_HUMAN	17	Miosina de polipeptídeo leve 6	116	17101	3	25,8	25,41	EAFQLFDR	1,19	1,62	1,36	16,01	0,73	10,60
PROF1_HUMAN	17	Profilina-1	70	15225	3	32,9	57,59	SSFYVNLTLGGQK	1,40	1,62	1,16	10,60	0,86	10,60
CALM_HUMAN	17	Calmodulina	117	16837	2	22,1	69,48	VFDKDGNGYISAAELR	2,25	2,19	0,97	0,00	1,03	10,60
LEG1_HUMAN	17	Galectina-1	55	15058	4	25,2	33,61	LPDGYEFK	1,42	2,78	1,96	42,38	0,51	10,60
MYL6_HUMAN	17	Miosina de polipeptídeo leve 6	116	17101	3	25,8	86,58	NKDQGTYEDYVEGLR	0,74	0,92	1,24	3,61	0,80	10,60
MYL6_HUMAN	17	Miosina de polipeptídeo leve 6	116	17101	3	25,8	60,68	NKDQGTYEDYVEGLR	0,82	0,76	0,93	3,80	1,08	10,60
H2A1C_HUMAN	17	Histona H2A type 1-C	138	14105	4	26,9	43,92	AGLQFPVGR	2,07	2,63	1,27	11,49	0,79	10,60
H2A1C_HUMAN	17	Histona H2A type 1-C	138	14105	4	26,9	28,79	KGNYAER	1,78	2,32	1,30	15,61	0,77	10,60
LEG1_HUMAN	17	Galectina-1	55	15058	4	25,2	35,37	VRGEVAPDAK	1,18	1,95	1,65	41,85	0,61	10,60

ANEXO F – Identificação de proteínas das células-tronco mesenquimais de medula óssea humana no período de 14 dias: MEM 10%(116), MTS 10% (117).

Prot. Acesso	Fração	Proteína	Proteína			Peptídeo			14 dias 116	14 dias 117	14 dias 117/116	Controle % Var.	Expressão	Mediana
			Score	MW (kDa)	Matches	Cover (%)	Score	Sequência						
ACTB_HUMAN	1	Actin, cytoplasmic 1	184	41710	32	37,9	12,38	AVFPSIVGRPR	0,24	0,22	0,92	100,00	1,09	12,20
ACTB_HUMAN	1	Actin, cytoplasmic 1	184	41710	32	37,9	10,42	DLTDYLMK	0,12	0,18	1,50	33,33	0,67	12,20
ACTB_HUMAN	1	Actin, cytoplasmic 1	184	41710	32	37,9	28,12	GYSFTTTAER	0,14	0,22	1,57	22,22	0,64	12,20
ACTB_HUMAN	1	Actin, cytoplasmic 1	184	41710	32	37,9	82,22	SYELPDGQVITIGNER	0,20	0,45	2,25	1,54	0,44	12,20
ACTBL_HUMAN	1	Beta-actin-like protein 2	140	41976	13	37,9	10,61	IIAPPER	0,10	0,09	0,90	100,00	1,11	12,20
ACTB_HUMAN	1	Actin, cytoplasmic 1	184	41710	32	37,9	65,31	GYSFTTTAER	0,15	0,33	2,20	12,50	0,45	12,20
ACTB_HUMAN	1	Actin, cytoplasmic 1	184	41710	32	37,9	43,6	AGFAGDDAPR	0,13	0,24	1,85	2,70	0,54	12,20
ACTB_HUMAN	1	Actin, cytoplasmic 1	184	41710	32	37,9	37,02	DSYVGDEAQSKR	0,14	0,32	2,29	4,35	0,44	12,20
ACTB_HUMAN	1	Actin, cytoplasmic 1	184	41710	32	37,9	13,5	QEYDESGPSIVHR	0,12	0,35	2,92	10,64	0,34	12,20
MYH9_HUMAN	1	Miosina-9	37	226392	4	3,4	7,42	VMQEQQGTHPK	0,22	0,49	2,23	9,86	0,45	12,20
ACTB_HUMAN	1	Actin, cytoplasmic 1	184	41710	32	37,9	12,06	HQGVMVGMGQK	0,18	0,56	3,11	8,11	0,32	12,20
ACTB_HUMAN	1	Actin, cytoplasmic 1	184	41710	32	37,9	13,61	HQGVMVGMGQK	0,29	0,73	2,52	13,73	0,40	12,20
RRBP1_HUMAN	1	Ribosome-binding protein 1	33	152381	3	3,1	32,9	KAEGAQNQGK	0,26	0,32	1,23	24,14	0,81	12,20
RRBP1_HUMAN	1	Ribosome-binding protein 1	33	152381	3	3,1	26,63	KAEGAQNQGK	0,27	0,27	1,00	37,04	1,00	12,20
VIME_HUMAN	1	Vimentina	91	53619	8	5,2	47,95	ILLAELEQLK	0,19	0,45	2,37	3,13	0,42	12,20
VIME_HUMAN	1	Vimentina	91	53619	8	5,2	82,18	ISLPLPNFSSLNLR	0,28	0,87	3,11	4,35	0,32	12,20
G3P_HUMAN	1	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	41	36030	2	4,2	41,34	LISWYDNEFGYSNR	0,13	0,31	2,38	4,55	0,42	12,20
ACTN1_HUMAN	1	Alpha-actinin-1	47	102993	3	2,5	30,56	VGWEQLLTTIAR	0,16	0,28	1,75	18,18	0,57	12,20
VIME_HUMAN	1	Vimentina	91	53619	8	5,2	24,75	ISLPLPNFSSLNLR	0,13	0,26	2,00	2,56	0,50	12,20
ENOA_HUMAN	1	Alfa-enolase	53	47139	1	3,9	53,04	LAMQEFLMILPVGAANFR	0,12	0,19	1,58	16,13	0,63	12,20
ACTB_HUMAN	1	Actin, cytoplasmic 1	184	41710	32	37,9	14,35	SYELPDGQVITIGNER	0,13	0,22	1,69	2,86	0,59	12,20
ACTN1_HUMAN	1	Alpha-actinin-1	47	102993	3	2,5	47,01	LASDLLEWIR	0,20	0,63	3,15	1,20	0,32	12,20

ACTB_HUMAN	1	Actin, cytoplasmic 1	184	41710	32	37,9	37,77	GYSFTTTAER	0,22	0,77	3,50	15,15	0,29	12,20
ACTB_HUMAN	1	Actin, cytoplasmic 1	184	41710	32	37,9	4,64	AVFPSIVGRPR	0,16	0,53	3,31	10,14	0,30	12,20
VIME_HUMAN	1	Vimentina	91	53619	8	5,2	13,8	ISLPLPNFSSLNLR	0,17	0,35	2,06	11,54	0,49	12,20
ACTB_HUMAN	1	Actin, cytoplasmic 1	184	41710	32	37,9	43,05	SYELPDGQVITIGNER	0,16	0,37	2,31	9,43	0,43	12,20
ACTB_HUMAN	1	Actin, cytoplasmic 1	184	41710	32	37,9	9,55	AVFPSIVGRPR	0,15	0,33	2,20	8,33	0,45	12,20
TBA1B_HUMAN	1	Tubulina de cadeia alfa-1B	45	50120	4	7,8	12,81	LISQIVSSITASLR	0,18	0,26	1,44	9,09	0,69	12,20
KPYM_HUMAN	1	Isoenzima piruvato quinase M1/M2	71	57900	1	3	70,96	FGVEQDVDMVFASFIR	0,17	0,23	1,35	5,00	0,74	12,20
ACTB_HUMAN	1	Actin, cytoplasmic 1	184	41710	32	37,9	23,78	GYSFTTTAER	0,25	0,67	2,68	17,39	0,37	12,20
ACTB_HUMAN	1	Actin, cytoplasmic 1	184	41710	32	37,9	20,82	AVFPSIVGRPR	0,20	0,57	2,85	14,29	0,35	12,20
VIME_HUMAN	1	Vimentina	91	53619	8	5,2	37,77	ISLPLPNFSSLNLR	0,20	0,38	1,90	13,79	0,53	12,20
ACTB_HUMAN	1	Actin, cytoplasmic 1	184	41710	32	37,9	45,44	SYELPDGQVITIGNER	0,17	0,41	2,41	17,24	0,41	12,20
ACTB_HUMAN	1	Actin, cytoplasmic 1	184	41710	32	37,9	19,76	GYSFTTTAER	0,16	0,49	3,06	1,54	0,33	12,20
ACTB_HUMAN	1	Actin, cytoplasmic 1	184	41710	32	37,9	10,69	AVFPSIVGRPR	0,19	0,47	2,47	3,03	0,40	12,20
TBA1B_HUMAN	1	Tubulina de cadeia alfa-1B	45	50120	4	7,8	35,72	LISQIVSSITASLR	0,17	0,39	2,29	3,57	0,44	12,20
VIME_HUMAN	1	Vimentina	91	53619	8	5,2	15,9	ISLPLPNFSSLNLR	0,15	0,31	2,07	21,74	0,48	12,20
ACTB_HUMAN	1	Actin, cytoplasmic 1	184	41710	32	37,9	28,98	GYSFTTTAER	0,20	0,61	3,05	13,58	0,33	12,20
ACTB_HUMAN	1	Actin, cytoplasmic 1	184	41710	32	37,9	15,82	AVFPSIVGRPR	0,20	0,56	2,80	13,16	0,36	12,20
ACTB_HUMAN	1	Actin, cytoplasmic 1	184	41710	32	37,9	11,48	EITALAPSTMK	0,12	0,28	2,33	20,00	0,43	12,20
VIME_HUMAN	1	Vimentina	91	53619	8	5,2	25,79	ISLPLPNFSSLNLR	0,17	0,28	1,65	15,56	0,61	12,20
ACTB_HUMAN	1	Actin, cytoplasmic 1	184	41710	32	37,9	35,18	SYELPDGQVITIGNER	0,14	0,27	1,93	12,20	0,52	12,20
ACTB_HUMAN	1	Actin, cytoplasmic 1	184	41710	32	37,9	25,86	GYSFTTTAER	0,19	0,56	2,95	14,67	0,34	12,20
ACTB_HUMAN	1	Actin, cytoplasmic 1	184	41710	32	37,9	12,2	AVFPSIVGRPR	0,20	0,50	2,50	22,86	0,40	12,20
ACTB_HUMAN	1	Actin, cytoplasmic 1	184	41710	32	37,9	46,87	SYELPDGQVITIGNER	0,18	0,37	2,06	5,45	0,49	12,20
TBB8_HUMAN	2	Tubulina beta-8 chain	38	49744	4	9,2	6,46	GRMPMR	0,14	0,14	1,00	14,29	1,00	19,05
ACTB_HUMAN	2	Actin, cytoplasmic 1	191	41710	22	29,9	3,28	IIAPPER	0,24	0,35	1,46	1,69	0,69	19,05
ACTB_HUMAN	2	Actin, cytoplasmic 1	191	41710	22	29,9	45,31	GYSFTTTAER	0,31	0,60	1,94	23,08	0,52	19,05
VIME_HUMAN	2	Vimentina	579	53619	35	40,6	15,02	FLEQQNK	0,42	0,65	1,55	15,89	0,65	19,05

ANXA2_HUMAN	2	AnexinaA2	60	38580	4	13	11,68	QDIAFAYQR	0,21	0,37	1,76	20,69	0,57	19,05
VIME_HUMAN	2	Vimentina	579	53619	35	40,6	16,15	TNEKVELQELNDR	0,26	0,48	1,85	40,54	0,54	19,05
NFH_HUMAN	2	Polipeptídeo de neurofilamento pesado	55	112411	5	1,8	4,21	IPSVSTHIK	0,19	0,20	1,05	33,33	0,95	19,05
ACTB_HUMAN	2	Actin, cytoplasmic 1	191	41710	22	29,9	32,36	AVFPSIVGRPR	0,60	1,21	2,02	28,18	0,50	19,05
VIME_HUMAN	2	Vimentina	579	53619	35	40,6	41,04	EEAENTLQSFR	0,23	0,39	1,70	22,58	0,59	19,05
TBB8_HUMAN	2	Tubulina beta-8 chain	38	49744	4	9,2	14,84	FPGQLNADLR	0,18	0,28	1,56	34,78	0,64	19,05
VIME_HUMAN	2	Vimentina	579	53619	35	40,6	19,66	FANYIDK	0,16	0,39	2,44	16,36	0,41	19,05
VIME_HUMAN	2	Vimentina	579	53619	35	40,6	37,25	ETNLDSLPLVDTHSK	0,15	0,24	1,60	17,95	0,63	19,05
ACTB_HUMAN	2	Actin, cytoplasmic 1	191	41710	22	29,9	101,7	VAPEEHPVLLTEAPLNPK	0,19	0,26	1,37	42,22	0,73	19,05
VIME_HUMAN	2	Vimentin	579	53619	35	40,6	55,31	EYQDLLNVK	0,38	0,49	1,29	33,33	0,78	19,05
VIME_HUMAN	2	Vimentin	579	53619	35	40,6	70,08	NLQEAEEWYK	0,25	0,35	1,40	20,00	0,71	19,05
VIME_HUMAN	2	Vimentina	579	53619	35	40,6	40,8	VEVERDNLNAEDIMR	0,17	0,22	1,29	28,21	0,77	19,05
ACTC_HUMAN	2	Actin, alpha cardiac muscle 1	87	41992	18	21	5,99	YPIEHGIITNWDDMEK	0,13	0,15	1,15	14,29	0,87	19,05
ACTB_HUMAN	2	Actin, cytoplasmic 1	191	41710	22	29,9	39,21	DLTDYLMK	0,26	0,30	1,15	35,71	0,87	19,05
VIME_HUMAN	2	Vimentina	579	53619	35	40,6	101,03	EMEENFAVEAANYQDTIGR	0,18	0,25	1,39	16,28	0,72	19,05
ACTC_HUMAN	2	Actin, alpha cardiac muscle 1	87	41992	18	21	30,26	YPIEHGIITNWDDMEK	0,22	0,27	1,23	6,12	0,81	19,05
ACTB_HUMAN	2	Actin, cytoplasmic 1	191	41710	22	29,9	25,99	GYSFTTTAER	0,20	0,50	2,50	14,29	0,40	19,05
ACTB_HUMAN	2	Actin, cytoplasmic 1	191	41710	22	29,9	71,66	SYELPDGQVITIGNER	0,34	0,96	2,82	32,31	0,35	19,05
VIME_HUMAN	2	Vimentina	579	53619	35	40,6	108,27	EMEENFAVEAANYQDTIGR	0,21	0,31	1,48	23,08	0,68	19,05
VIME_HUMAN	2	Vimentin	579	53619	35	40,6	13,28	MALDIEIATYR	0,14	0,20	1,43	11,76	0,70	19,05
VIME_HUMAN	2	Vimentina	579	53619	35	40,6	19,19	EYQDLLNVK	0,18	0,22	1,22	20,00	0,82	19,05
VIME_HUMAN	2	Vimentina	579	53619	35	40,6	56,28	ISLPLPNFSSLNLR	0,16	0,21	1,31	18,92	0,76	19,05
ACTB_HUMAN	2	Actin, cytoplasmic 1	191	41710	22	29,9	8,61	SYELPDGQVITIGNER	0,12	0,14	1,17	23,08	0,86	19,05
VIME_HUMAN	2	Vimentina	579	53619	35	40,6	97,88	KVESLQEEIAFLK	0,42	0,61	1,45	53,40	0,69	19,05
ACTB_HUMAN	2	Actin, cytoplasmic 1	191	41710	22	29,9	71,97	DLYANTVLSGGTTMYPGIADR	0,19	0,30	1,58	14,29	0,63	19,05
VIME_HUMAN	2	Vimentina	579	53619	35	40,6	17,34	MALDIEIATYR	0,16	0,31	1,94	10,64	0,52	19,05
VIME_HUMAN	2	Vimentina	579	53619	35	40,6	57,69	ISLPLPNFSSLNLR	0,15	0,19	1,27	35,29	0,79	19,05

ACTB_HUMAN	2	Actin, cytoplasmic 1	191	41710	22	29,9	25,65	SYELPDGQVITIGNER	0,17	0,20	1,18	8,11	0,85	19,05
ACTB_HUMAN	2	Actin, cytoplasmic 1	191	41710	22	29,9	4,44	IIAPPER	0,15	0,19	1,27	0,00	0,79	19,05
ACTC_HUMAN	2	Actin, alpha cardiac muscle 1	87	41992	18	13	4,44	IIAPPER	0,15	0,19	1,27	0,00	0,79	19,05
ACTB_HUMAN	2	Actin, cytoplasmic 1	191	41710	22	29,9	12,44	GYSFTTTAER	0,20	0,25	1,25	2,22	0,80	19,05
ACTB_HUMAN	2	Actin, cytoplasmic 1	191	41710	22	29,9	13,63	AVFPSIVGRPR	0,18	0,30	1,67	20,83	0,60	19,05
POTEE_HUMAN	2	POTE ankyrin domain family member E	75	121286	15	21	13,63	AVFPSIVGRPR	0,18	0,30	1,67	20,83	0,60	19,05
VIME_HUMAN	2	Vimentina	579	53619	35	40,6	10,09	MALDIEIATYR	0,15	0,19	1,27	35,29	0,79	19,05
TBA1B_HUMAN	2	Tubulina de cadeia alfa-1B	81	50120	6	13,1	26,86	EIDLVLDR	0,17	0,20	1,18	8,11	0,85	19,05
ACTN1_HUMAN	2	Alpha-actinin-1	69	102993	3	3,7	48,72	GYEEWLLNEIR	0,15	0,17	1,13	12,50	0,88	19,05
ANXA2_HUMAN	2	AnexinaA2	60	38580	4	13	59,84	GVDEVTIVNILTNR	0,15	0,24	1,60	2,56	0,63	19,05
TBA1B_HUMAN	2	Tubulina de cadeia alfa-1B	81	50120	6	13,1	80,81	AVFVDLEPTVIDEV	0,13	0,16	1,23	10,34	0,81	19,05
VIME_HUMAN	2	Vimentina	579	53619	35	40,6	14,18	LQDEIQNMKEEMAR	0,14	0,16	1,14	26,67	0,88	19,05
VIME_HUMAN	2	Vimentina	579	53619	35	40,6	56,77	ILLAELEQLKGQGK	0,20	0,18	0,90	15,79	1,11	19,05
VIME_HUMAN	2	Vimentina	579	53619	35	40,6	24,68	EYQDLLNVK	0,21	0,27	1,29	20,83	0,78	19,05
NFH_HUMAN	2	Polipeptídeo de neurofilamento pesado	55	112411	5	1,8	24,68	EYQDLLNVK	0,21	0,27	1,29	20,83	0,78	19,05
VIME_HUMAN	2	Vimentina	579	53619	35	40,6	46,15	ISLPLPNFSSLNLR	0,14	0,18	1,29	6,25	0,78	19,05
ACTB_HUMAN	2	Actin, cytoplasmic 1	191	41710	22	29,9	23,16	SYELPDGQVITIGNER	0,00	0,19	0,00	100,00	0,00	19,05
ACTBL_HUMAN	2	Beta-actin-like protein 2	95	41976	11	13	23,16	SYELPDGQVITIGNER	0,00	0,19	0,00	100,00	0,00	19,05
VIME_HUMAN	2	Vimentina	579	53619	35	40,6	85,3	ISLPLPNFSSLNLR	0,90	1,52	1,69	23,14	0,59	19,05
VIME_HUMAN	2	Vimentina	579	53619	35	40,6	25,93	MALDIEIATYR	0,19	0,25	1,32	4,55	0,76	19,05
VIME_HUMAN	2	Vimentina	579	53619	35	40,6	60,67	ISLPLPNFSSLNLR	0,18	0,24	1,33	19,05	0,75	19,05
ACTB_HUMAN	2	Actin, cytoplasmic 1	191	41710	22	29,9	30,65	SYELPDGQVITIGNER	0,14	0,18	1,29	6,25	0,78	19,05
ACTN1_HUMAN	2	Alpha-actinin-1	69	102993	3	3,7	57,61	VGWEQLLTTIAR	0,24	0,33	1,38	26,32	0,73	19,05
VIME_HUMAN	2	Vimentina	579	53619	35	40,6	59,79	ILLAELEQLK	0,42	0,71	1,69	32,74	0,59	19,05
POTEE_HUMAN	2	POTE ankyrin domain family member E	75	121286	15	6,3	19,6	ISSENSNPQEQLK	0,42	0,71	1,69	32,74	0,59	19,05
VIME_HUMAN	2	Vimentina	579	53619	35	40,6	95,03	ISLPLPNFSSLNLR	0,28	0,45	1,61	39,73	0,62	19,05
VIME_HUMAN	2	Vimentina	579	53619	35	40,6	26,42	MALDIEIATYR	0,18	0,17	0,94	20,00	1,06	19,05

TBA1B_HUMAN	2	Tubulina de cadeia alfa-1B	81	50120	6	13,1	22,11	LISQIVSSITASLR	0,13	0,20	1,54	9,09	0,65	19,05
VIME_HUMAN	2	Vimentina	579	53619	35	40,6	42,95	ISLPLPNFSSLNLR	0,14	0,16	1,14	6,67	0,88	19,05
VIME_HUMAN	2	Vimentina	579	53619	35	40,6	54,83	ISLPLPNFSSLNLR	0,15	0,16	1,07	3,23	0,94	19,05
ENOA_HUMAN	2	Alfa-enolase	57	47139	1	3,9	56,55	LAMQEFLMILPVGAANFR	0,13	0,21	1,62	5,88	0,62	19,05
ACTN1_HUMAN	2	Alpha-actinin-1	69	102993	3	3,7	27,97	LASDLLEWIR	0,17	0,30	1,76	27,66	0,57	19,05
KPYM_HUMAN	3	Isoenzima piruvato quinase M1/M2	76	57900	1	3	75,5	FGVEQDVDMVFASFIR	0,15	0,21	1,40	11,11	0,71	10,00
VIME_HUMAN	3	Vimentina	167	53619	13	2,2	43,56	EYQDLLNVK	0,25	0,51	2,04	15,79	0,49	10,00
VIME_HUMAN	3	Vimentina	167	53619	13	12	40,56	NLQEAEWYK	1,18	1,35	1,14	1,19	0,87	10,00
ACTN1_HUMAN	3	Alpha-actinin-1	89	102993	3	3,7	50,9	LASDLLEWIR	0,17	0,24	1,41	17,07	0,71	10,00
ACTB_HUMAN	3	Actin, cytoplasmic 1	98	41710	18	21,3	75,41	SYELPDGQVITIGNER	0,49	1,19	2,43	1,19	0,41	10,00
ENOA_HUMAN	3	Alfa-enolase	62	47139	1	3,9	62,45	LAMQEFLMILPVGAANFR	0,15	0,21	1,40	16,67	0,71	10,00
TBA8_HUMAN	3	Tubulina de cadeia alfa-8	42	50062	2	8	41,59	FDGALNVDLTEFQTNLVPYPR	0,17	0,22	1,29	2,56	0,77	10,00
VIME_HUMAN	3	Vimentina	167	53619	13	12	48,28	KVESLQEEIAFLK	0,23	0,47	2,04	8,57	0,49	10,00
ACTB_HUMAN	3	Actin, cytoplasmic 1	98	41710	18	21,3	56,08	DLYANTVLSGGTTMYPGIADR	0,18	0,27	1,50	11,11	0,67	10,00
ACTN1_HUMAN	3	Alpha-actinin-1	89	102993	3	3,7	64,57	VGWEQLLTTIAR	0,26	0,37	1,42	33,33	0,70	10,00
VIME_HUMAN	3	Vimentina	167	53619	13	5	58,61	ILLAELEQLK	0,25	0,52	2,08	22,08	0,48	10,00
VIME_HUMAN	3	Vimentina	167	53619	13	12	79,97	ISLPLPNFSSLNLR	0,32	0,65	2,03	3,09	0,49	10,00
VIME_HUMAN	3	Vimentina	167	53619	13	12	70,62	ISLPLPNFSSLNLR	0,53	1,31	2,47	18,48	0,40	10,00
G3P_HUMAN	3	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	53	36030	2	4,2	52,65	LISWYDNEFGYSNR	0,18	0,34	1,89	7,69	0,53	10,00
TBA1A_HUMAN	3	Tubulina de cadeia alfa-1A	65	50104	3	10	33,2	EIIDLVLD	0,19	0,29	1,53	4,17	0,66	10,00
ACTN1_HUMAN	3	Alpha-actinin-1	89	102993	3	3	51,05	GYEEWLLNEIR	0,19	0,25	1,32	40,91	0,76	10,00
ANXA2_HUMAN	3	AnexinaA2	58	38580	3	6,8	57,84	GVDEVTIVNILTNR	0,15	0,24	1,60	7,69	0,63	10,00
TBA1A_HUMAN	3	Tubulina alpha-1A chain	65	50104	3	10	57,98	AVFVDLEPTVIDEV	0,15	0,25	1,67	10,00	0,60	10,00
G3P_HUMAN	4	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	60	36030	4	7,2	10,9	AGAHLQGGAK	0,17	0,23	1,35	10,00	0,74	16,00
ENOA_HUMAN	4	Alfa-enolase	62	47139	3	9,4	5,42	IEEELGSKAK	0,22	0,43	1,95	32,31	0,51	16,00
ACTN1_HUMAN	4	Alpha-actinin-1	53	102993	3	3,7	36,52	LASDLLEWIR	0,28	0,62	2,21	20,00	0,45	16,00
VIME_HUMAN	4	Vimentina	108	53619	7	7,9	10,58	ISLPLPNFSSLNLR	0,22	0,22	1,00	27,27	1,00	16,00
EF2_HUMAN	4	Elongation factor 2	45	95277	1	2,1	44,73	ALLELQLEPEELYQTFQR	0,18	0,18	1,00	11,11	1,00	16,00
ACTN1_HUMAN	4	Alpha-actinin-1	53	102993	3	3,7	52,73	VGWEQLLTTIAR	0,25	0,30	1,20	12,73	0,83	16,00
G3P_HUMAN	4	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	60	36030	4	7,2	33,88	LISWYDNEFGYSNR	0,12	0,24	2,00	22,22	0,50	16,00
ANXA2_HUMAN	4	AnexinaA2	82	38580	4	12,4	81,64	GVDEVTIVNILTNR	0,17	0,26	1,53	11,63	0,65	16,00
TBA1A_HUMAN	4	Tubulina alpha-1A chain	58	50104	2	5,3	58,5	AVFVDLEPTVIDEV	0,00	0,24	0,00	83,33	0,00	16,00
CALX_HUMAN	4	Calnexina	42	67526	2	4,1	41,58	KIPNPDFFFEDLEPFR	0,24	0,26	1,08	16,00	0,92	16,00

FLNA_HUMAN	4	FiLaminaa-A	35	280564	1	0,5	35,07	AEAGVPAEFSIWTR	0,15	0,23	1,53	15,79	0,65	16,00
ACTN1_HUMAN	5	Alpha-actinin-1	34	102993	3	3,7	33,68	VGWEQLLTTIAR	0,12	0,13	1,08	12,00	0,92	8,38
VIME_HUMAN	5	Vimentina	63	53619	3	3	63,11	ISLPLPNFSSLNLR	0,25	0,33	1,32	27,59	0,76	8,38
G3P_HUMAN	5	Gliceralféido-3-fosfato desidrogenase	53	36030	2	4,2	11,65	LISWYDNEFGYSNR	0,19	0,25	1,32	18,18	0,76	8,38
VIME_HUMAN	5	Vimentina	63	53619	3	3	22,68	ISLPLPNFSSLNLR	0,18	0,21	1,17	2,56	0,86	8,38
TBA1B_HUMAN	5	Tubulina de cadeia alfa-1B	56	50120	2	6,4	56,42	AVFVDLEPTVIDEV	0,14	0,17	1,21	3,23	0,82	8,38
ACTB_HUMAN	5	Actin, cytoplasmic 1	63	41710	4	14,9	44,53	DLYANTVLSGGTTMYPGIADR	0,19	0,23	1,21	4,76	0,83	8,38
ACTB_HUMAN	5	Actin, cytoplasmic 1	63	41710	4	14,9	24,55	DLTDYLMK	0,19	0,27	1,42	4,35	0,70	8,38
VIME_HUMAN	6	Vimentina	707	53619	48	50,9	30,87	FADLSEAANR	0,35	0,35	1,00	8,57	1,00	8,60
VIME_HUMAN	6	Vimentina	707	53619	48	50,9	68,6	EEAENTLQSFR	0,34	0,38	1,12	13,89	0,89	8,60
LMNA_HUMAN	6	Lamina-A/C	40	74095	4	5,6	40,36	VAVEEVDEEGKFVR	0,36	0,50	1,39	16,28	0,72	8,60
VIME_HUMAN	6	Vimentina	707	53619	48	50,9	24,54	LQEEMLQR	0,35	0,38	1,09	4,11	0,92	8,60
ACTB_HUMAN	6	Actin, cytoplasmic 1	130	41710	10	22,4	27,14	AVFPSIVGRPR	0,76	1,45	1,91	8,60	0,52	8,60
VIME_HUMAN	6	Vimentina	707	53619	48	50,9	29,05	FANYIDK	0,48	0,47	0,98	20,00	1,02	8,60
VIME_HUMAN	6	Vimentina	707	53619	48	50,9	62,63	NLQEAAEYWYK	0,63	0,61	0,97	1,61	1,03	8,60
PDIA1_HUMAN	6	Protein disulfide-isomerase	106	57081	7	15,6	62,61	VDATEESDLAQQYGV	0,29	0,29	1,00	13,79	1,00	8,60
VIME_HUMAN	6	Vimentina	707	53619	48	50,9	83,4	ETNLDSLPLVDTHSK	0,26	0,31	1,19	1,75	0,84	8,60
ACTB_HUMAN	6	Actin, cytoplasmic 1	130	41710	10	22,4	49,6	VAPEEHPVLLTEAPLNPK	0,26	0,46	1,77	5,56	0,57	8,60
VIME_HUMAN	6	Vimentina	707	53619	48	50,9	39,54	SLYASSPGGVYATR	0,62	0,47	0,76	4,59	1,32	8,60
CALR_HUMAN	6	Calreticulina	79	48112	2	4,3	78,86	EQFLDGDGWTSR	0,48	0,47	0,98	17,89	1,02	8,60
VIME_HUMAN	6	Vimentina	707	53619	48	50,9	40,26	EYQDLLNVK	0,65	0,57	0,88	21,31	1,14	8,60
VIME_HUMAN	6	Vimentina	707	53619	48	50,9	46,77	NLQEAAEYWYK	0,45	0,39	0,87	9,52	1,15	8,60
VIME_HUMAN	6	Vimentina	707	53619	48	50,9	48,27	VEVERDNLNAEDIMR	0,37	0,34	0,92	18,31	1,09	8,60
PDIA1_HUMAN	6	Proteína disulfeto isomerase	106	57081	7	15,6	31,7	YQLDKDGVVLFK	0,31	0,42	1,35	15,07	0,74	8,60
ACTB_HUMAN	6	Actin, cytoplasmic 1	130	41710	10	22,4	53,68	GYSFTTTAER	0,56	1,08	1,93	2,44	0,52	8,60
PDIA1_HUMAN	6	Proteína disulfeto isomerase	106	57081	7	15,6	33,01	ALAPEYAK	0,30	0,33	1,10	4,76	0,91	8,60
PDIA1_HUMAN	6	Proteína disulfeto isomerase	106	57081	7	15,6	48,56	YKPEEELTAER	0,32	0,43	1,34	1,33	0,74	8,60
VIME_HUMAN	6	Vimentina	707	53619	48	50,9	36,24	LGDLYEEEMR	0,22	0,20	0,91	4,76	1,10	8,60
ACTB_HUMAN	6	Actin, cytoplasmic 1	130	41710	10	22,4	31,84	DLTDYLMK	0,23	0,44	1,91	4,48	0,52	8,60
PDIA3_HUMAN	6	Proteína disulfeto isomerase A3	96	56747	5	9,5	30,73	GFPTIYFSPANK	0,17	0,23	1,35	5,00	0,74	8,60
VIME_HUMAN	6	Vimentina	707	53619	48	50,9	24,26	MALDIEIATYR	0,22	0,22	1,00	4,55	1,00	8,60
ACTB_HUMAN	6	Actin, cytoplasmic 1	130	41710	10	22,4	89,24	SYELPDGQVITIGNER	0,47	1,01	2,15	6,76	0,47	8,60
VIME_HUMAN	6	Vimentina	707	53619	48	50,9	85,45	EMEENFAVEAANYQDTIGR	0,34	0,36	1,06	11,43	0,94	8,60

TBB2A_HUMAN	6	Tubulina de cadeia beta-2A	38	49875	1	3,4	37,79	AILVDLEPGTMDSVR	0,23	0,26	1,13	22,45	0,88	8,60
PDIA3_HUMAN	6	Proteína disulfeto isomerase A3	96	56747	5	9,5	41,71	DLLIAYYDVDYEK	0,27	0,29	1,07	7,14	0,93	8,60
KPYM_HUMAN	6	Isoenzima piruvato quinase M1/M2	94	57900	2	6,2	26,36	EAEAAIYHLQLFEELRR	0,23	0,26	1,13	18,37	0,88	8,60
TBA1A_HUMAN	6	Tubulina de cadeia alfa-1A	109	50104	3	8	54,15	EIIDLVLDR	0,16	0,21	1,31	29,73	0,76	8,60
ANXA2_HUMAN	6	AnexinaA2	74	38580	1	4,1	74,39	GVDEVTIVNILTNR	0,33	0,49	1,48	17,07	0,67	8,60
TBA1A_HUMAN	6	Tubulina de cadeia alfa-1A	109	50104	3	8	92,47	AVFVDELEPTVIDEV	0,25	0,35	1,40	13,33	0,71	8,60
PDIA3_HUMAN	6	Proteína disulfeto isomerase A3	96	56747	5	9,5	86,81	ELSDFISYFLQR	0,52	0,38	0,73	2,22	1,37	8,60
PDIA1_HUMAN	6	Proteína disulfeto isomerase	106	57081	7	15,6	49,52	ILFIFIDSDHTDNQR	0,22	0,24	1,09	4,35	0,92	8,60
ENOAHUMAN	6	Alfa-enolase	50	47139	3	9,4	30,56	VVIGMDVAASEFFR	0,21	0,27	1,29	8,33	0,78	8,60
VIME_HUMAN	6	Vimentina	707	53619	48	50,9	62,19	ISLPLPNFSSLNLR	0,25	0,27	1,08	23,08	0,93	8,60
ENOAHUMAN	6	Alfa-enolase	50	47139	3	9,4	47,74	LAMQEFMLPVGAANFR	0,21	0,31	1,48	7,69	0,68	8,60
PDIA1_HUMAN	6	Proteína disulfeto isomerase Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase subunit 2	106	57081	7	15,6	43,82	ILEFFGLK	0,79	1,02	1,29	14,92	0,77	8,60
RPN2_HUMAN	6		47	69241	1	1,9	47,09	SIVEEIIDLVAR	0,30	0,43	1,43	23,29	0,70	8,60
VIME_HUMAN	6	Vimentina	707	53619	48	50,9	65,73	ISLPLPNFSSLNLR	0,23	0,22	0,96	15,56	1,05	8,60
CKAP4_HUMAN	6	Cytoskeleton-associated protein 4	73	65983	2	2,7	35,53	VQSQLQATFGTFESILR	0,22	0,22	1,00	0,00	1,00	8,60
KPYM_HUMAN	6	Isoenzima piruvato quinase M1/M2	94	57900	2	6,2	96,45	FGVEQDVDMVFASFIR	0,22	0,21	0,95	11,63	1,05	8,60
VIME_HUMAN	7	Vimentina	645	53619	46	52,1	31,99	KLLEGEESR	0,68	0,90	1,32	69,62	0,76	38,30
ACTB_HUMAN	7	Actin, cytoplasmic 1	114	41710	6	22,4	34,01	GYSFTTTAER	0,28	0,87	3,11	72,17	0,32	38,30
VIME_HUMAN	7	Vimentina	645	53619	46	52,1	37,25	FLEQQNK	0,52	0,76	1,46	81,25	0,68	38,30
VIME_HUMAN	7	Vimentina	645	53619	46	52,1	47,02	SLYASSPGGVYATR	0,25	0,33	1,32	41,38	0,76	38,30
VIME_HUMAN	7	Vimentina	645	53619	46	52,1	28,99	TNEKVELQELNDR	0,26	0,35	1,35	44,26	0,74	38,30
CALU_HUMAN	7	Calumenina	36	37084	4	4,8	32,86	EQFVEFR	0,42	0,77	1,83	52,94	0,55	38,30
ACTB_HUMAN	7	Actin, cytoplasmic 1	114	41710	6	22,4	62	VAPEEHVLLTEAPLNPK	0,24	0,55	2,29	39,24	0,44	38,30
CALU_HUMAN	7	Calumenina	36	37084	4	4,8	31,84	WIYEDVER	0,34	0,60	1,76	38,30	0,57	38,30
VIME_HUMAN	7	Vimentina	645	53619	46	52,1	54,8	EYQDLLNVK	0,86	1,16	1,35	73,27	0,74	38,30
ACTB_HUMAN	7	Actin, cytoplasmic 1	114	41710	6	22,4	34,42	DLTDYLMK	0,24	0,46	1,92	48,57	0,52	38,30
PDIA6_HUMAN	7	Proteína disulfeto isomerase A6	85	48091	3	9,5	53,69	GSFSEQGQINEFLR	0,31	0,39	1,26	37,14	0,79	38,30

TBA1B_HUMAN	7	Tubulina de cadeia alfa-1B	124	50120	6	16,6	27	IHFPLATYAPVISAEK	0,19	0,30	1,58	38,78	0,63	38,30
ACTB_HUMAN	7	Actin, cytoplasmic 1	114	41710	6	22,4	57,91	SYELPDGQVITIGNER	0,50	1,26	2,52	47,73	0,40	38,30
TBB2A_HUMAN	7	Tubulina de cadeia beta-2A	56	49875	4	11	56,11	AILVDLEPGTMDSVR	0,26	0,32	1,23	27,59	0,81	38,30
SERPH_HUMAN	7	Serpin H1	53	46411	2	6,7	53,18	LYGPSSVSFADDFVR	0,27	0,31	1,15	24,14	0,87	38,30
ACTB_HUMAN	7	Actin, cytoplasmic 1	114	41710	6	22,4	68,13	DLYANTVLSGGTTMYPGIADR	0,28	0,40	1,43	29,41	0,70	38,30
ATPB_HUMAN	7	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	148	56525	5	14	36,65	VVDLLAPYAK	0,28	0,38	1,36	21,21	0,74	38,30
ATPB_HUMAN	7	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	148	56525	5	14	39,12	FTQAGSEVSALLGR	0,21	0,27	1,29	33,33	0,78	38,30
TBA1B_HUMAN	7	Tubulina de cadeia alfa-1B	124	50120	6	16,6	52,14	EIIDLVLDR	0,36	0,46	1,28	65,85	0,78	38,30
ATPB_HUMAN	7	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	148	56525	5	14	54,98	LVLEVAQHLGESTVR	0,29	0,32	1,10	27,87	0,91	38,30
TBA1B_HUMAN	7	Tubulina de cadeia alfa-1B	124	50120	6	16,6	95,1	AVFVDLEPTVIDEVR	0,47	0,75	1,60	39,34	0,63	38,30
ATPB_HUMAN	7	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	148	56525	5	14	83,36	AIAELGIYPAVDPLDSTS	0,26	0,29	1,12	34,55	0,90	38,30
PDIA6_HUMAN	7	Protein disulfide-isomerase A6	85	48091	3	9,5	25,81	TGEAIVDAALSALR	0,25	0,36	1,44	37,70	0,69	38,30
TBA1B_HUMAN	7	Tubulina de cadeia alfa-1B	124	50120	6	16,6	31,48	LISQIVSSITASLR	0,18	0,21	1,17	23,08	0,86	38,30
KPYM_HUMAN	7	Isoenzima piruvato quinase M1/M2	92	57900	1	3	92,47	FGVEQDVDMVFASFIR	0,23	0,31	1,35	29,63	0,74	38,30
ATPB_HUMAN	7	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	148	56525	5	14	52,23	DQEGQDVLLFIDNIFR	0,18	0,20	1,11	26,32	0,90	38,30
ATPA_HUMAN	7	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	65	59714	1	4	64,85	EVAFAQFGSDLDAATQQLLSR	0,21	0,23	1,10	22,73	0,91	38,30
PDIA6_HUMAN	7	Proteína disulfeto isomerase A6	85	48091	3	9,5	64,26	LAAVDATVNQVLASR	0,30	0,40	1,33	54,29	0,75	38,30
ENO1_HUMAN	7	Alfa-enolase	63	47139	1	3,9	63,28	LAMQEFLILPVGAANFR	0,22	0,31	1,41	50,94	0,71	38,30
TBA1B_HUMAN	7	Tubulinaaa de cadeia alfa-1B	124	50120	6	16,6	40,55	FDGALNVDLTFQTNLVPYPR	0,17	0,20	1,18	35,14	0,85	38,30
SERPH_HUMAN	8	Serpin H1	129	46411	6	11,5	40,57	ATTASQAK	0,33	0,45	1,36	12,82	0,73	25,00
VIME_HUMAN	8	Vimentina	672	53619	38	40,8	46,49	KLLEGEEESR	1,06	1,24	1,17	23,48	0,85	25,00
ACTB_HUMAN	8	Actin, cytoplasmic 1	369	41710	39	39,2	45,68	GYSFTTTAER	0,17	0,25	1,47	42,86	0,68	25,00
VIME_HUMAN	8	Vimentina	672	53619	38	40,8	70,11	ISLPLPNFSSLNLR	0,19	0,21	1,11	25,00	0,90	25,00
ACTB_HUMAN	8	Actin, cytoplasmic 1	369	41710	39	39,2	61,58	SYELPDGQVITIGNER	0,13	0,19	1,46	18,75	0,68	25,00
VIME_HUMAN	8	Vimentina	672	53619	38	40,8	42,61	ISLPLPNFSSLNLR	0,23	0,31	1,35	29,63	0,74	25,00

ACTB_HUMAN	8	Actin, cytoplasmic 1	369	41710	39	39,2	74,96	SYELPDGQVITIGNER	0,20	0,24	1,20	31,82	0,83	25,00
ACTB_HUMAN	8	Actin, cytoplasmic 1	369	41710	39	39,2	17,22	GYSFTTTAER	0,23	0,26	1,13	18,37	0,88	25,00
ENOA_HUMAN	8	Alfa-enolase	158	47139	10	16,8	27,42	VVIGMDVAASEFFR	0,26	0,29	1,12	23,64	0,90	25,00
VIME_HUMAN	8	Vimentina	672	53619	38	40,8	43,19	ISLPLPNFSSLNLR	0,27	0,33	1,22	20,00	0,82	25,00
ENOA_HUMAN	8	Alfa-enolase	158	47139	10	16,8	31,33	VVIGMDVAASEFFR	0,23	0,28	1,22	13,73	0,82	25,00
SERPH_HUMAN	8	Serpin H1	129	46411	6	11,5	76,66	DTQSGSLLFIGR	0,24	0,37	1,54	18,03	0,65	25,00
ENOA_HUMAN	8	Alfa-enolase	158	47139	10	16,8	30,35	VVIGMDVAASEFFR	0,22	0,29	1,32	9,80	0,76	25,00
ACTB_HUMAN	8	Actin, cytoplasmic 1	369	41710	39	39,2	43,99	DLTDYLMK	0,48	1,01	2,10	51,68	0,48	25,00
ENOA_HUMAN	8	Alfa-enolase	158	47139	10	16,8	58,58	YISPDQLADLYK	0,35	0,44	1,26	18,99	0,80	25,00
ENOA_HUMAN	8	Alfa-enolase	158	47139	10	16,8	59,11	VVIGMDVAASEFFR	0,24	0,32	1,33	25,00	0,75	25,00
ENOA_HUMAN	8	Alfa-enolase	158	47139	10	16,8	87,92	LAMQEFMILPVGAAANFR	0,26	0,34	1,31	23,33	0,76	25,00
TBB2A_HUMAN	8	Tubulina de cadeia beta-2A	39	49875	3	8,8	39,25	AILVDLEPGTMDSVR	0,22	0,27	1,23	42,86	0,81	25,00
SERPH_HUMAN	8	Serpin H1	129	46411	6	11,5	59,7	LYGPSSVSFADDFVR	0,36	0,43	1,19	31,65	0,84	25,00
ENOA_HUMAN	8	Alfa-enolase	158	47139	10	16,8	43,22	AAVPSGASTGIYEALELR	0,26	0,25	0,96	33,33	1,04	25,00
ACTB_HUMAN	8	Actin, cytoplasmic 1	369	41710	39	39,2	44,59	AVFPSIVGRPR	0,18	0,23	1,28	26,83	0,78	25,00
SERPH_HUMAN	8	Serpin H1	129	46411	6	11,5	42,07	LFYADHPFIFLVR	0,00	0,25	0,00	164,00	0,00	25,00
TBA1B_HUMAN	8	Tubulina de cadeia alfa-1B	101	50120	5	12,2	40,46	EIIDLVLDR	0,28	0,41	1,46	33,33	0,68	25,00
ANXA2_HUMAN	8	AnexinaA2	61	38580	2	6,8	61,2	GVDEVTIVNIILTNR	0,30	0,40	1,33	40,00	0,75	25,00
TBA1B_HUMAN	8	Tubulina de cadeia alfa-1B	101	50120	5	12,2	95,11	AVFVDLEPTVIDEV	0,50	0,54	1,08	19,23	0,93	25,00
VIME_HUMAN	9	Vimentina	133	53619	5	13,5	31,15	FLEQQNK	0,19	0,21	1,11	25,00	0,90	12,33
ACTB_HUMAN	9	Actin, cytoplasmic 1	470	41710	68	42,7	46,46	GYSFTTTAER	0,30	0,33	1,10	23,81	0,91	12,33
ACTB_HUMAN	9	Actin, cytoplasmic 1	470	41710	68	42,7	60,6	SYELPDGQVITIGNER	0,18	0,18	1,00	16,67	1,00	12,33
ACTB_HUMAN	9	Actin, cytoplasmic 1	470	41710	68	42,7	42,24	VAPEEHPVLLTEAPLNPK	0,14	0,15	1,07	3,45	0,93	12,33
ACTB_HUMAN	9	Actin, cytoplasmic 1	470	41710	68	42,7	58,56	SYELPDGQVITIGNER	0,19	0,25	1,32	0,00	0,76	12,33
ACTB_HUMAN	9	Actin, cytoplasmic 1	470	41710	68	42,7	62,17	SYELPDGQVITIGNER	0,20	0,24	1,20	9,09	0,83	12,33
G3P_HUMAN	9	Gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase	105	36030	6	11,3	27,65	AGAHLQGGAK	0,32	0,50	1,56	29,27	0,64	12,33
TPM1_HUMAN	9	Tropomiosina de cadeia alpha-1	53	32689	3	8,1	31,41	AEQAEADKK	0,36	0,70	1,94	20,75	0,51	12,33

ENOA_HUMAN	9	Alfa-enolase	53	47139	2	7,1	33,35	VVIGMDVAASEFFR	0,16	0,17	1,06	33,33	0,94	12,33
ACTB_HUMAN	9	Actin, cytoplasmic 1	470	41710	68	42,7	65,51	SYELPDGQVITIGNER	0,19	0,18	0,95	8,11	1,06	12,33
ENOA_HUMAN	9	Alfa-enolase	53	47139	2	7,1	46,59	LAMQEFLMILPVGAANFR	0,20	0,26	1,30	8,70	0,77	12,33
VIME_HUMAN	9	Vimentina	133	53619	5	13,5	57,34	ILLAELEQLK	0,37	0,36	0,97	12,33	1,03	12,33
SEPT2_HUMAN	9	Septin-2	35	41461	2	7,8	35,1	TIISYIDEQFER	0,20	0,21	1,05	7,32	0,95	12,33
VIME_HUMAN	9	Vimentina	133	53619	5	13,5	68,53	ISLPLPNFSSLNLR	0,56	0,43	0,77	13,13	1,30	12,33
G3P_HUMAN	9	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	105	36030	6	11,3	100,94	LISWYDNEFGYSNR	0,45	0,74	1,64	52,94	0,61	12,33
ACTB_HUMAN	9	Actin, cytoplasmic 1	470	41710	68	42,7	36,62	GYSFTTTAER	0,38	0,42	1,11	20,00	0,90	12,33
TPM1_HUMAN	9	Tropomiosina de cadeia alpha-1	53	32689	3	8,1	47,09	IQLVEEELDR	0,31	0,51	1,65	7,32	0,61	12,33
G3P_HUMAN	9	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	105	36030	6	11,3	43,23	LVINGNPITIFQER	0,22	0,37	1,68	38,98	0,59	12,33
TPM1_HUMAN	9	Tropomiosina de cadeia alpha-1	53	32689	3	8,1	43,76	IQLVEEELDRAQER	0,32	0,43	1,34	1,33	0,74	12,33
ACTB_HUMAN	9	Actin, cytoplasmic 1	470	41710	68	42,7	28,01	SYELPDGQVITIGNER	0,28	0,29	1,04	8,77	0,97	12,33
VIME_HUMAN	9	Vimentina	133	53619	5	13,5	34,97	KVESLQEEIAFLK	0,33	0,33	1,00	9,09	1,00	12,33
SERPH_HUMAN	9	Serpin H1	55	46411	1	3,6	54,61	LYGPSSVSFADDFVR	0,21	0,24	1,14	6,67	0,88	12,33
VIME_HUMAN	9	Vimentina	133	53619	5	13,5	72,54	EMEENFAVEAANYQDTIGR	0,22	0,26	1,18	12,50	0,85	12,33
ANXA1_HUMAN	10	AnexinaA1	109	38690	2	10,1	109,34	GLGTDEDTLIEILASR	0,58	0,40	0,69	32,65	1,45	17,86
ANXA2_HUMAN	10	AnexinaA2	160	38580	15	34,8	41,26	GVDEVTIVNILTNR	0,17	0,22	1,29	12,82	0,77	17,86
ANXA2_HUMAN	10	AnexinaA2	160	38580	15	34,8	28,56	GVDEVTIVNILTNR	0,18	0,21	1,17	12,82	0,86	17,86
ANXA2_HUMAN	10	AnexinaA2	160	38580	15	34,8	55,07	SALSGHLETVILGLLK	0,22	0,26	1,18	8,33	0,85	17,86
ANXA2_HUMAN	10	AnexinaA2	160	38580	15	34,8	28,49	SYSPTYDMLESIR	0,26	0,30	1,15	17,86	0,87	17,86
ANXA2_HUMAN	10	AnexinaA2	160	38580	15	34,8	58,47	SLYYYIQQDTK	0,29	0,30	1,03	32,20	0,97	17,86
ANXA2_HUMAN	10	AnexinaA2	160	38580	15	34,8	44,43	AEDGSVIDYELIDQDAR	0,22	0,25	1,14	6,38	0,88	17,86
ANXA2_HUMAN	10	AnexinaA2	160	38580	15	34,8	30,64	LMVALAK	0,32	0,43	1,34	17,33	0,74	17,86
ANXA2_HUMAN	10	AnexinaA2	160	38580	15	34,8	25,72	QDIAFAYQR	0,31	0,38	1,23	7,25	0,82	17,86
ANXA5_HUMAN	10	AnexinaA5	39	35914	2	8,4	38,57	GLGTDEESILLLSR	0,32	0,24	0,75	28,57	1,33	17,86
G3P_HUMAN	10	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	480	36030	27	32,8	74,47	LISWYDNEFGYSNR	0,52	0,48	0,92	14,00	1,08	17,86

G3P_HUMAN	10	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	480	36030	27	32,8	45,96	LIVINGNPITIFQER	0,53	0,44	0,83	13,40	1,20	17,86
G3P_HUMAN	10	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	480	36030	27	32,8	62,41	AGAHLQGGAK	1,22	1,34	1,10	28,91	0,91	17,86
G3P_HUMAN	10	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	480	36030	27	32,8	60,35	GALQNIIPASTGAAK	0,33	0,33	1,00	9,09	1,00	17,86
TPM1_HUMAN	10	Tropomiosina de cadeia alpha-1	101	32689	9	16,9	56,47	IQLVEEELDR	0,46	0,75	1,63	23,97	0,61	17,86
TPM1_HUMAN	10	Tropomiosina de cadeia alpha-1	101	32689	9	16,9	40,58	IQLVEEELDRAQER	0,42	0,62	1,48	28,85	0,68	17,86
TPM1_HUMAN	10	Tropomiosina de cadeia alpha-1	101	32689	9	16,9	39,34	AQKDEEK	0,38	0,70	1,84	20,37	0,54	17,86
TPM1_HUMAN	10	Tropomiosina de cadeia alpha-1	101	32689	9	16,9	41,16	AEQAEADKK	0,55	1,11	2,02	28,92	0,50	17,86
TPM1_HUMAN	10	Tropomiosina de cadeia alpha-1	101	32689	9	16,9	49,59	KLVIIESDLER	0,48	0,91	1,90	30,94	0,53	17,86
ANXA5_HUMAN	11	AnexinaA5	206	35914	15	29,4	112,56	GLGTDEESILTLLSR	1,03	0,93	0,90	1,02	1,11	13,60
ACTN1_HUMAN	11	Alpha-actinin-1	41	102993	1	1,3	41,06	VGWEQLLTTIAR	0,26	0,49	1,88	14,67	0,53	13,60
VIME_HUMAN	11	Vimentina	163	53619	6	12	50,63	ILLAELEQLK	0,28	0,56	2,00	7,14	0,50	13,60
VIME_HUMAN	11	Vimentina	163	53619	6	12	53,19	ISLPLPNFSSLNLR	0,21	0,29	1,38	28,00	0,72	13,60
CATD_HUMAN	11	Cathepsin D	57	44524	1	3,2	57,13	LVDQNIFSFYLSR	0,25	0,31	1,24	42,86	0,81	13,60
ANXA1_HUMAN	11	AnexinaA1	35	38690	2	9	34,66	GLGTDEDTLIEILASR	0,26	0,44	1,69	5,71	0,59	13,60
G3P_HUMAN	11	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	60	36030	2	4,2	42,64	LISWYDNEFGYSNR	0,26	0,30	1,15	25,00	0,87	13,60
ANXA5_HUMAN	11	AnexinaA5	206	35914	15	29,4	31,29	GLGTDEESILTLLSR	0,17	0,19	1,12	22,22	0,89	13,60
PDIA3_HUMAN	11	Protein disulfide-isomerase A3	69	56747	1	2,2	68,99	ELSDFISYQLR	0,40	0,49	1,23	12,36	0,82	13,60
VIME_HUMAN	11	Vimentina	163	53619	6	12	76,48	ISLPLPNFSSLNLR	0,48	0,57	1,19	8,57	0,84	13,60
G3P_HUMAN	11	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	60	36030	2	4,2	54,72	LISWYDNEFGYSNR	0,33	0,34	1,03	22,39	0,97	13,60
ANXA5_HUMAN	11	AnexinaA5	206	35914	15	29,4	28,57	FITIFGTR	0,49	0,43	0,88	2,17	1,14	13,60
TPM4_HUMAN	11	Tropomiosina de cadeia alpha-4	110	28504	6	12,9	32,09	LVILEGEALER	0,29	0,39	1,34	11,76	0,74	13,60
TPM4_HUMAN	11	Tropomiosina de cadeia alpha-4	110	28504	6	12,9	52,15	IQLVEEELDR	0,62	1,34	2,16	9,18	0,46	13,60
ANXA2_HUMAN	11	AnexinaA2	121	38580	11	24,2	92,46	GVDEVTIVNILTNR	0,66	0,68	1,03	17,91	0,97	13,60
TBA1A_HUMAN	11	Tubulina alpha-1A chain	37	50104	1	3,3	36,82	AVFVDLEPTVIDEV	0,25	0,35	1,40	0,00	0,71	13,60

TPM4_HUMAN	11	Tropomiosina de cadeia alpha-4	110	28504	6	12,9	67,29	IQLVEEELDRAQER	0,40	0,53	1,33	16,13	0,75	13,60
ANXA5_HUMAN	11	AnexinaA5	206	35914	15	29,4	34,58	WGTDEEKFITIFGTR	0,29	0,30	1,03	1,69	0,97	13,60
ANXA5_HUMAN	11	AnexinaA5	206	35914	15	29,4	40,92	FITIFGTR	1,09	0,67	0,61	11,36	1,63	13,60
TPM4_HUMAN	11	Tropomiosina de cadeia alpha-4	110	28504	6	12,9	40,8	IQLVEEELDRAQER	0,33	0,64	1,94	17,53	0,52	13,60
ANXA5_HUMAN	11	AnexinaA5	206	35914	15	29,4	28,18	GLGTDEESILTLLTSR	0,19	0,20	1,05	12,82	0,95	13,60
ANXA2_HUMAN	11	AnexinaA2	121	38580	11	24,2	32,28	WISIMTER	0,61	0,46	0,75	4,67	1,33	13,60
ANXA2_HUMAN	11	AnexinaA2	121	38580	11	24,2	37,57	SYSPYDMLESIR	0,48	0,47	0,98	5,26	1,02	13,60
SERPH_HUMAN	11	Serpin H1	43	46411	2	6,7	43,29	LYGPSSVSFADDFVR	0,35	0,33	0,94	0,00	1,06	13,60
VIME_HUMAN	11	Vimentina	163	53619	6	12	69,87	KVESLQEEIAFLK	0,30	0,66	2,20	35,42	0,45	13,60
ANXA5_HUMAN	11	AnexinaA5	206	35914	15	29,4	44	VLTEIIASR	0,78	0,47	0,60	13,60	1,66	13,60
ANXA5_HUMAN	11	AnexinaA5	206	35914	15	2,5	72,85	SEIDLFNIR	0,83	0,74	0,89	7,01	1,12	13,60
ANXA5_HUMAN	11	AnexinaA5	206	35914	15	29,4	31,18	LIVALMKPSR	0,47	0,49	1,04	14,58	0,96	13,60
TPM4_HUMAN	11	Tropomiosina de cadeia alpha-4	110	28504	6	12,9	66,05	KLVILEGELER	0,39	0,85	2,18	30,65	0,46	13,60
ACTB_HUMAN	11	Actin, cytoplasmic 1	84	41710	5	12	73,27	SYELPDGQVITIGNER	0,80	1,31	1,64	9,00	0,61	13,60
ACTB_HUMAN	11	Actin, cytoplasmic 1	84	41710	5	12	39,04	DLDYDLMK	0,27	0,66	2,44	13,98	0,41	13,60
TPM3_HUMAN	11	Tropomiosina de cadeia alpha-3	83	32799	5	11,3	29,33	KLVIEGDLER	0,36	0,61	1,69	27,84	0,59	13,60
ANXA2_HUMAN	11	AnexinaA2	121	38580	11	24,2	64,81	SLYYYIQQDTK	0,38	0,37	0,97	22,67	1,03	13,60
VIME_HUMAN	11	Vimentina	163	53619	6	12	50,7	NLQEAEEWYK	0,33	0,57	1,73	15,56	0,58	13,60
ANXA5_HUMAN	11	AnexinaA5	206	35914	15		49,99	GTVTDFPGFDER	0,33	0,35	1,06	17,65	0,94	13,60
G3P_HUMAN	12	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	60	36224	2	7,2	44,21	AGAHLQGGAK	0,28	0,39	1,39	4,48	0,72	100,00
G3P_HUMAN	12	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	60	36224	2	7,2	48,81	LISWYDNEFGYSNR	0,06	0,00	0,00	100,00	0,00	100,00
HSPB1_HUMAN	12	proteína Heat shock beta-1	130	22839	5	21	44,12	LFDQAFGLPR	0,18	0,38	2,11	100,00	0,47	100,00
HSPB1_HUMAN	12	proteína Heat shock beta-1	130	22839	5	21	46,66	LFDQAFGLPR	0,00	0,23	0,00	126,09	0,00	100,00
CRYAB_HUMAN	13	Alpha-crystallin B chain	93	20159	3	20	53,4	RPFFPFHSPSR	0,85	0,62	0,73	68,71	1,37	29,23
TAGL_HUMAN	13	Transgelina	78	22668	3	18,9	27,12	GDPNWFMK	0,26	0,53	2,04	39,24	0,49	29,23
CRYAB_HUMAN	13	Alpha-crystallin B chain	93	20159	3	20	72,42	VLGDVIEVHGK	0,23	0,80	3,48	14,56	0,29	29,23

RAB15_HUMAN	13	Ras-related protein Rab-15	44	24676	1	44,41	44,41	IQIWDTAGQER	0,22	0,41	1,86	26,98	0,54	29,23
CRYAB_HUMAN	14	Alpha-crystallin B chain	49	20159	4	24,6	28,44	KQVSGPER	0,13	0,41	3,15	11,11	0,32	31,58
CRYAB_HUMAN	14	Alpha-crystallin B chain	49	20159	4	24,6	41,45	EEKPAVTAAPK	0,19	0,75	3,95	36,17	0,25	31,58
CRYAB_HUMAN	14	Alpha-crystallin B chain	49	20159	4	24,6	47,49	RPFFPFHSPSR	0,22	0,51	2,32	67,12	0,43	31,58
RAB10_HUMAN	14	Ras-related protein Rab-10	53	22769	2	11	53	AFLTLAEDILR	0,11	0,16	1,45	18,52	0,69	31,58
PPIB_HUMAN	14	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	73	23799	7	28,2	19,32	KVESTK	0,12	0,26	2,17	31,58	0,46	31,58
PPIB_HUMAN	14	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	73	23799	7	28,2	61,65	TVDNFVALATGEK	0,16	0,20	1,25	27,78	0,80	31,58
PPIB_HUMAN	14	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	73	23799	7	28,2	47,63	VIFGLFGK	0,32	0,51	1,59	44,58	0,63	31,58
COF1_HUMAN	15	Cofilina-1	111	18730	3	19,9	29,89	KSSTPEEVK	0,17	0,58	3,41	4,00	0,29	13,21
STMN1_HUMAN	15	Stathmin	56	17302	2	14,8	28,75	DLSLEEIQK	0,12	0,37	3,08	2,04	0,32	13,21
COF1_HUMAN	15	Cofilina-1	111	18730	3	19,9	73,82	YALYDATYETK	0,15	0,44	2,93	1,69	0,34	13,21
STMN1_HUMAN	15	Stathmin	56	17302	2	14,8	56,42	ASGQAFELILSPR	0,19	0,48	2,53	25,37	0,40	13,21
COF1_HUMAN	15	Cofilin-1	111	18730	3	19,9	74,23	YALYDATYETK	0,24	0,73	3,04	23,71	0,33	13,21
ML12A_HUMAN	15	Miosina regulatória de cadeia leve 12A	59	19851	2	20,5	58,95	GNFNYIEFTR	0,24	0,56	2,33	15,00	0,43	13,21
PTRF_HUMAN	15	Polymerase I and transcript release factor	35	43476	1	10,6	35,28	VPPFTFHVK	0,11	0,42	3,82	13,21	0,26	13,21
RLA1_HUMAN	16	60S acidic ribosomal protein P1	110	11628	2	18,4	110,42	AAGVNVEFPWPGLFAK	0,63	1,04	1,65	12,57	0,61	22,73
PPIA_HUMAN	16	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	121	18240	8	42,4	54,42	VSFELFADK	0,25	0,44	1,76	56,52	0,57	22,73
CS010_HUMAN	16	UPF0556 protein C19orf10	58	18909	3	18,5	49,17	SYLYFTQFK	0,47	0,59	1,26	18,87	0,80	22,73
PPIA_HUMAN	16	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	121	18240	8	42,4	65,18	VSFELFADKVPK	0,51	0,87	1,71	50,72	0,59	22,73
PPIA_HUMAN	16	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	121	18240	8	42,4	70,94	SIYGEKFEDENFILK	0,42	0,81	1,93	46,34	0,52	22,73
PPIA_HUMAN	16	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	121	18240	8	42,4	22,36	ALSTGEK	0,31	0,54	1,74	48,24	0,57	22,73
COF1_HUMAN	16	Cofilina-1	38	18730	2	12	26,28	KSSTPEEVK	0,49	0,75	1,53	33,87	0,65	22,73
CS010_HUMAN	16	UPF0556 protein C19orf10	58	18909	3	18,5	41,73	TAVAHRPGAFK	0,26	0,36	1,38	3,23	0,72	22,73
NDKB_HUMAN	16	Nucleosídeo difosfato quinase B	30	17412	2	8,9	27,9	DRPFFPGLVK	0,28	0,53	1,89	20,99	0,53	22,73

COF1_HUMAN	16	Cofilina-1	38	18730	2	12	38,05	YALYDATYETK	0,42	0,51	1,21	11,83	0,82	22,73
CALM_HUMAN	16	Calmodulina	91	16837	2	68,3	68,3	VFDKDGNGYISAAELR	0,25	0,38	1,52	36,51	0,66	22,73
NDKB_HUMAN	16	Nucleosídeo difosfato quinase B	30	17412	2	12,2	29,61	TFIAIKPDGVQR	0,34	0,60	1,76	14,89	0,57	22,73
H2A1C_HUMAN	17	Histona H2A type 1-C	138	14105	4	26,9	131,78	VTIAQGGVLPNIQAVLLPK	0,30	0,44	1,47	5,41	0,68	9,92
LEG1_HUMAN	17	Galectina-1	55	15058	4	25,2	39,47	LNLEAINYMAADGDFK	0,24	0,33	1,38	8,77	0,73	9,92
PROF1_HUMAN	17	Profilina-1	70	15225	3	32,9	46,53	DSLLQDGEFSMDLR	0,18	0,24	1,33	0,00	0,75	9,92
PPIA_HUMAN	17	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	73	18240	4	33,9	56,35	VSFELFADKVPK	0,51	0,50	0,98	14,85	1,02	9,92
H4_HUMAN	17	Histona H4	126	11367	6	38,8	52,48	VFLENVIR	1,10	1,44	1,31	18,11	0,76	9,92
H4_HUMAN	17	Histona H4	126	11367	6	38,8	76,17	ISGLIYEETR	0,61	0,62	1,02	15,45	0,98	9,92
SMD3_HUMAN	17	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D3	41	14030	1	20,9	40,58	VAQLEQVYIR	0,23	0,23	1,00	4,35	1,00	9,92
PPIA_HUMAN	17	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	73	18240	4	33,9	50,22	SIYGEKFEDENFILK	0,98	1,02	1,04	12,00	0,96	9,92
MYL6_HUMAN	17	Miosina de polipeptídeo leve 6	116	17101	3	25,8	25,41	EAFQLFDR	0,88	1,07	1,22	20,00	0,82	9,92
PROF1_HUMAN	17	Profilina-1	70	15225	3	32,9	57,59	SSFYVNGLTLGGQK	0,77	0,98	1,27	6,29	0,79	9,92
CALM_HUMAN	17	Calmodulina	117	16837	2	22,1	69,48	VFDKDGNGYISAAELR	2,04	2,80	1,37	9,92	0,73	9,92
LEG1_HUMAN	17	Galectina-1	55	15058	4	25,2	33,61	LPDGYEFK	0,62	0,87	1,40	19,46	0,71	9,92
MYL6_HUMAN	17	Miosina de polipeptídeo leve 6	116	17101	3	25,8	86,58	NKDQGTYEDYVEGLR	0,71	0,77	1,08	10,81	0,92	9,92
MYL6_HUMAN	17	Miosina de polipeptídeo leve 6	116	17101	3	25,8	60,68	NKDQGTYEDYVEGLR	0,65	0,70	1,08	15,56	0,93	9,92
H2A1C_HUMAN	17	Histona H2A type 1-C	138	14105	4	26,9	43,92	AGLQFPVGR	1,35	2,68	1,99	9,68	0,50	9,92
H2A1C_HUMAN	17	Histona H2A type 1-C	138	14105	4	26,9	28,79	KGNYAER	1,04	1,92	1,85	2,70	0,54	9,92
LEG1_HUMAN	17	Galectina-1	55	15058	4	25,2	35,37	VRGEVAPDAK	0,48	0,75	1,56	8,94	0,64	9,92