Nancy Marcela Pérez Sosa

**Análise da expressão de genes regulados pela
proteína Dermicidina nas células do melanoma
maligno G-361 pelo método de DNA-*Microarray***

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

Programa: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. José Ernesto Belizário

São Paulo

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Pérez Sosa, Nancy Marcela

Análise da expressão de genes regulados pela proteína Dermicidina nas células do melanoma maligno G-361 pelo método de DNA-*Microarray* / Nancy Marcela Pérez Sosa. -- São Paulo, 2014.

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

Orientador: José Ernesto Belizário.

Descritores: 1.Melanoma 2.Dermicidina 3.Expressão gênica
4.Espectrometria de massas 5.Histonas 6. NF-KB

USP/FM/DBD-209/14

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação a todos os pacientes com câncer
por serem minha fortaleza e fonte de inspiração.

E às cinco pessoas mais importantes da minha vida:
meus pais, meus irmãos e minha sobrinha.

A importância e amor que sinto por vocês
supera os limites da escrita.

AGRADECIMENTOS

Quando deixei a Colômbia, fiquei fisicamente longe das pessoas que eu mais amo, mas levei sempre uma parte delas no meu coração. Ao chegar ao Brasil tive a oportunidade de conhecer pessoas maravilhosas, razão pela que agradeço a Deus, porque sempre coloca anjos no meu caminho para me fazerem a vida mais feliz.

Agradezco a mi papá por el apoyo y por creer en mí, a mi mami por su infinito amor y por ser la luz de mi vida, a mis hermanos por su compañía y por las palabras de aliento, a mi sobrina Luna porque su sonrisa me hace creer en un mundo mejor, a mi abuelita Antonia por sus oraciones y por tanto cariño.

Agradeço ao Prof. Belizário, por toda a orientação nesses anos, pela oportunidade de adquirir novos conhecimentos, pela paciência, e por todo o apoio na realização deste projeto.

A mi amiga y futura doctora Yasmin, por el apoyo, las ayudas científicas y por su gran calidad humana.

À Fabi, pela ajuda no laboratório, pelas conversas e pela amizade que construímos ao longo desses anos.

Aos colegas do laboratório, Dra. Aline Cadurin, Bia, Carla, Beatriz, Fellipe e Andrew, por todos esses anos de discussão científica, conversas e pela nossa amizade.

A Linis, Camilo, Roger, Cata, hermanitas Chica y demás amigos Colombianos en SP, por el apoyo constante y por sacarme una sonrisa en los momentos difíciles.

A mis amigos de toda la vida, July Andrea, Camilo S, Danny, Fabián, Angelita, Laura J y Julián, por acompañarme siempre de corazón y porque nuestra amistad ha soportado el pasar del tiempo y la distancia.

A todos os funcionários da FMUSP e da farmacologia, que me ajudaram por todos esses anos.

À FAPESP pela concessão da bolsa de mestrado durante meu período de estudo.

Às pessoas que me esqueci de mencionar, mas que torcem pelo sucesso na trajetória da minha vida pessoal e acadêmica. Minha gratidão por sempre.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular e Celular do departamento de Farmacologia da Universidade de São Paulo.

O apoio financeiro foi concedido sob a forma de bolsa de mestrado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) sob o número 2012/02497-7.

“Só há duas maneiras de viver a vida: a primeira é vivê-la como se os milagres não existissem. A segunda é vivê-la como se tudo fosse milagre”.

Albert Einstein

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas

Lista de tabelas

Lista de figuras

Resumo

Abstract

Introdução	1
Objetivos.....	10
Métodos	11
Resultados.....	19
Discussão	47
Conclusões	55
Referências Bibliográficas	56
Anexos	68

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	Adenosina trifosfato
Ca²⁺	Cálcio
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
c-ErbB2	Homologo 2 do oncogene viral de leucemia eritroblástica c
CRP	Proteína C reativa
DCD	Dermicidina (Dermcidin)
DSEP	Diffusible Survival Evasion Peptide
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ER	Receptor de estrógeno
ERBB2	V-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog
GO	Gene Ontology
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
HER-2	Receptor de fator de crescimento epidermal 2
HDACs	Histone deacetylases
INCA	Instituto Nacional do Cancer
IBC	Gene de câncer de mama invasivo (Invasive Breast Cancer)
IFN-γ	Interferon-γ
HPLC	High Pression Liquid chromatography
I-κB	Inibidor de NF-κB
IL-1	Interleucina-1
IL-6	Interleucina-6
kDa	Kilodaltons
LMF	Fator mobilizador de Lipídeos (Lipid-mobilizing factor)
NF-κB	Fator nuclear κB (Nuclear Factor κB)
nM	Nanomolar
PAM	Peptídeo antimicrobiano
pb	Pares de bases
PIF	Fator Indutor de Proteólise (Proteolysis-Inducing Factor)
PIF/DCD	Fator Indutor de Proteólise/Dermicidina
PKC	Proteína cinase C (Protein kinase C)
PLA₂	Fosfolipase A2
PLC	Fosfolipase C
pRB	Proteína retinoblastoma
RISC	Complexo indutor de silenciamento de RNA
RNA	Ácido ribonucleico
NAi	Ácido ribonucleico de interferência
RNA_m	Ácido ribonucleico mensageiro
siRNA	Pequeno Ácido ribonucleico de interferência
shRNAi	Ácido ribonucleico de interferência em forma de pequenos grampos
RT-qPCR	Reação da transcriptase reversa - cadeia da polimerase quantitativa
TNF	Fator de Necrose Tumoral (Tumour Necrosis Factor)
Y-P30	Peptídeo de Sobrevivência Celular (Survival Peptide Y)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Expressão do gene DCD por RT-PCR	Pag.19
Figura 2.	Avaliação da integridade das amostras de RNA por eletroforese em gel de agarose.	Pag.20
Figura 3.	Imagem do geneChip obtida pelo Scanner 3000.	Pag. 21
Figura 4.	Representações da normalização da sublinhagem G-361-pLKO.	Pag. 21
Figura 5.	Representações da normalização da sublinhagem G-361-IBC-I.	Pag. 22
Figura 6.	Mean-Average-plot da comparação dos genes diferencialmente expressos.	Pag. 23
Figura 7.	<i>Heatmap</i> gerado com dados dos genes diferencialmente expressos entre as sublinhagens G-361-pLKO e G-361-IBC-I.	Pag. 23
Figura 8.	Dendrograma de ontologias gênicas (GO)	Pag. 28
Figura 9.	Modulação da via de sinalização APRIL/BAFF pelo silenciamento do gene DCD nas células de melanoma G-361.	Pag. 30
Figura 10.	Rede de conectividade entre os genes diferencialmente expressos nas células G-361 após o silenciamento do DCD.	Pag. 31
Figura 11.	Efeito do silenciamento do gene DCD sobre a expressão de alguns genes da família das histonas.	Pag. 35
Figura 12.	Efeito do silenciamento do gene DCD sobre a expressão do gene HDAC1.	Pag. 36
Figura 13.	Efeito do silenciamento do gene DCD sobre a expressão de alguns genes presentes na via de sinalização TNFs/NF- κ B.	Pag. 36
Figura 14.	Comparação da expressão dos genes da família das histonas entre as sublinhagens G-361-pLKO e G-361-IBC-I e outras linhagens de	Pag. 37

melanoma.

Figura 15.	Comparação da expressão dos genes da via de sinalização TNFs/NF- κ B entre as sublinhagens (G-361-pLKO, G-361-IBC-I) e as linhagens de melanoma 501 MEL, A375, MALME3M e ML310	Pag. 38
Figura 16.	Cromatogramas das proteínas nucleares das sublinhagens G-361- pLKO e IBC-I por HPLC <i>nanoflow</i> .	Pag. 39
Figura 17.	Diagrama de Venn representativo do número de proteínas identificadas em cada extrato nuclear, ou em ambas sublinhagens de células de melanoma G-361	Pag. 40
Figura 18.	Espectro de massa de íons das proteínas obtidas das amostras de células pLKO para o tempo de retenção 37,33 min.	Pag. 41
Figura 19.	Espectro de massa de íons das proteínas obtidas amostra de células pLKO para o tempo de retenção 30,92 min.	Pag. 41
Figura 20.	Espectro de massa de íons das proteínas obtidas da amostra de células IBC-I para o tempo de retenção 33,22 min.	Pag. 42
Figura 21.	Espectro de massa de íons das proteínas obtidas da amostra de células IBC-I para o tempo de retenção 10,66 min.	Pag. 42
Figura 22.	Rede de interação de entre as proteínas identificadas na sublinhagem G-361-pLKO usando a plataforma STRING 9.1.	Pag. 43
Figura 23.	Rede de interação entre as proteínas identificadas na sublinhagem G-361-IBC-I usando a plataforma STRING 9.1.	Pag. 45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Categorias funcionais dos genes induzidos pelo silenciamento do gene DCD na linhagem G-361	Pag. 24
Tabela 2.	Categorias funcionais dos genes reprimidos pelo silenciamento do gene DCD na linhagem G-361	Pag. 25
Tabela 3.	Anotação funcional obtida na plataforma METACORE das vias alteradas pelo silenciamento do gene DCD.	Pag. 29
Tabela 4.	Lista de <i>Primers forward</i> e <i>reverse</i> desenhados para genes diferencialmente expressos selecionados para validação técnica.	Pag. 33
Tabela 5.	Lista de DEGs selecionados para validação técnica por RT-qPCR	Pag. 34
Tabela 6.	Processos biológicos que participam as proteínas nucleares da sublinhagem G-361-PLKO.	Pag. 44
Tabela 7.	Processos biológicos que participam as proteínas nucleares da sublinhagem G-361-IBC-I.	Pag. 45

RESUMO

PÉREZ-SOSA NM. Análise da expressão de genes regulados pela proteína Dermicidina nas células do melanoma maligno G-361 pelo método do DNA-*Microarray*. [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

A proteína dermicidina (DCD) é codificada por um gene localizado na porção 12q13 do cromossomo 12, presente apenas em primatas e humanos. A proteína é secretada por células de glândulas da pele, melanócitos, neurônios e células epiteliais da mama normal. Alguns estudos iniciais revelaram a participação da proteína DCD em processos oncogênicos nos carcinomas de mama, próstata e melanoma pela sua capacidade de atuar como um fator de crescimento e sobrevivência celular. Nos estudos realizados no nosso laboratório mostramos que a DCD é expressa em células normais da pele, placenta, cérebro e em vários tumores, incluindo os carcinomas de mama e melanoma maligno. Ensaio biológicos e bioquímicos mostraram que o “knockdown” da expressão de DCD no melanoma maligno G-361 via RNA de interferência (RNAi) diminuiu significativamente o crescimento *in vitro* em cultura celular e a formação de tumores em camundongos Nude. Resultados similares foram obtidos quando camundongos Nude transplantados com células de melanoma G-361 foram tratados com anticorpos policlonais de coelhos contra a proteína DCD.

Para compreender melhor o papel da proteína DCD na transformação de células de melanoma G-361 foram feitos ensaios de microarranjo de DNA para identificar os genes diferencialmente expressos entre as sublinhagens pLKO (controle) e IBC-I que expressa o shRNA para o mRNA da DCD. Entre os 374 genes alterados pelo silenciamento, encontramos 162 com expressão aumentada e 212 com a expressão reduzida. Os estudos de bioinformática pelo software MetaCore mostraram que o silenciamento do gene DNA modula as vias canônicas e redes de sinalização mediadas pelos

receptores e ligantes da família BAFF/APRIL que contralam a ativação do fator de transcrição NF- κ B, bem como para histonas envolvidas na remodelação da cromatina. Os níveis de expressão de mRNA de 9 genes de interesse foram validados por ensaios de RT-qPCR.

Em uma segunda fase do estudo, foram analisadas as proteínas presentes em extratos nucleares dos clones pLKO e IBC-I de melanoma maligno G-361 por espectrometria de massas. Nos extratos proteicos da sublinhagem pLKO foram identificadas 74 proteínas nucleares, enquanto que na sublinhagem IBC-I foram identificadas 31 proteínas. Um grupo de 21 proteínas foi identificado em ambas sublinhagens. Estudos de bioinformática pelo programa STRING revelou que 14 das proteínas identificadas na sublinhagem G-361-pLKO faziam interações diretas ou indiretas com a DCD. A rede formada por estas proteínas tem como centro a proteína p53, uma proteína chave na regulação do programa de morte celular e sobrevivência ao estresse oxidativo. Por outro lado, notou-se que a maioria das proteínas identificadas no extrato nuclear da sublinhagem IBC-I é da família das histonas e que poderiam atuar em complexos de remodelação da cromatina nas células G-361-IBC-I.

Nossos resultados nos possibilitaram sugerir que futuros estudos sobre a expressão das histonas e suas modificações pós-traducionais poderão ajudar a desvendar o possível papel da DCD na regulação epigenética do melanoma e em outros tipos de cânceres.

Descritores: Melanoma; Dermicidina; Expressão gênica; Espectrometria de massas; Histonas; NF- κ B .

ABSTRACT

PÉREZ-SOSA NM. Gene expression analysis regulated by Dermcidin protein in G-361 malignant melanoma cell line by DNA-*Microarray*. [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2014.

Dermcidin (DCD) is a human gene mapped to chromosome 12q13 region, only identified in primates and humans, and normally expressed in the eccrine glands of skin and brain. Several studies have confirmed that DCD-derived peptides contribute to innate and immune surveillance and in the oncogenic processes of breast, prostate and skin cancers, as revealed by its role as a growth factor and cell survival. We have further explored DCD function and its tumorigenic potential on skin melanocytes by specifically knocking down its expression in G-361 malignant melanoma cells via expressing constitutively short hairpin RNA against DCD mRNA. Biological and biochemical assays showed that the "knockdown" in the expression of DCD in G-361-pLKO control clone and a G-361-IBC-I clone expressing constitutively short hairpin RNA against DCD mRNA decreased significantly the in vitro growth in cell culture and tumor formation in nude mice. Similar results were obtained treating nude mice bearing G-361 melanoma xenografts with rabbit polyclonal antibodies against DCD protein.

Here, we present a DNA microarray-based study that identified the genes that are up- and down-regulated in a G-361-pLKO control clone and a G-361-IBC-I clone expressing constitutively short hairpin RNA against DCD mRNA. A total of 372 genes differentially expressed were identified; being 162 genes up-regulated and 212 genes down-regulated. Bioinformatic studies showed that DCD gene silencing modulates canonical pathways and signaling networks mediated APRIL/BAFF receptors and ligands and NF- κ B signaling pathway as well as chromatin remodeling mediated by histone family. The mRNA expression levels of 9 genes of interest were validated by RT-qPCR assays.

Next we analyzed the proteins present in nuclear extracts from G-361-pLKO and G-361-IBC-I clones by mass spectrometry. We identified 74 proteins in the G-361-pLKO clone and 31 proteins in the G-361-IBC-I. A group of 21 proteins was identified in both sublineages. Bioinformatics analyses by STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins) platform showed that a small portion of the proteins identified only in G-361-pLKO cells was predicted to interact directly with DCD. The network formed by these proteins is centered in the p53 protein, a key regulator of survival and cell death program in response to DNA damage and oxidative stress. On the other hand, this network was completely abrogated using the nuclear protein from G-361-IBC-I because of absence of DCD protein. Since most of the proteins identified in nuclear extracts are of the histone family, it is likely that they are acting in the chromatin-remodeling complexes which are important to remodel nucleosomes of the G-361-IBC-I cells.

Our results allowed us to suggest that future studies on the expression of histones and their posttranslational modifications may help to unravel the possible role of DCD in the epigenetic regulation of melanoma and other cancers.

Descriptors: Melanoma; Dermcidin; Gene expression; Mass spectrometry; Histones; NF- κ B.

1. INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença multifatorial que resulta de interações complexas entre alterações genéticas e fatores ambientais. Em geral um único fator ambiental ou apenas uma alteração genética não leva ao desenvolvimento de tumores; são necessárias várias alterações genéticas para que se desenvolva uma neoplasia (Loeb *et al*, 2008). A origem de um tumor ocorre através de várias alterações genéticas e epigenéticas. Essas alterações podem ser anomalias cromossômicas qualitativas e quantitativas que podem causar instabilidade genômica e aneuploidias, permitindo que erros e aberrações durante a segregação dos cromossomos leve a seleção progressiva de subclones de células-tronco e/ou células somáticas alteradas (Jelonek *et al*, 2010).

Para que estes clones de células sejam bem sucedidos, eles têm que passar por uma evolução clonal quando novas mutações, translocações, deleções e amplificações são introduzidas em genes críticos tais como proto-oncogenes, fatores supressores de tumores e enzimas de reparo do DNA para, assim, adquirir certas habilidades e capacidades biológicas. Dentre elas, destacam-se a auto-suficiência de fatores de crescimento, a resistência a fatores inibitórios de crescimento, evasão à apoptose, potencial replicativo ilimitado, estímulo a angiogênese e capacidade de invasão tecidual e metástase (Hanahan & Weinberg, 2000; Weinberg, 2008). A identificação e compreensão do papel de centenas de genes alterados no câncer são de fundamental importância para avançarmos na prevenção, diagnóstico e tratamento dos pacientes com terapias mais poderosas e dirigidas a múltiplos alvos.

Para que estes processos aconteçam, várias vias bioquímicas estão envolvidas, formando uma complexa rede de sinalização celular. Estas vias apresentam-se geralmente alteradas nos processos tumorais, pois os genes que as compõem sofrem alterações, culminando na desregulação do ciclo celular (Paige, 2003).

Antigamente o modelo genético do câncer era baseado em alterações cromossômicas. Atualmente diversas alterações moleculares que ocorrem entre os vários tipos de câncer, levaram à ideia de que estes envolvam muitas doenças. Os tumores sólidos progridem de tumores benignos, relativamente bem diferenciados e não invasivos, provavelmente envolvendo uma ou poucas mutações, para cânceres *in situ* com instabilidade genética, mas baixo potencial invasivo e metastático, sendo que por último progridem para tumores invasivos e metastáticos, através do aumento de mudanças genéticas que proporcionam adaptação a essas células em diversos outros ambientes do corpo (Feinberg *et al*, 2006).

Sabendo-se que o DNA é o material genético e com as poderosas tecnologias desenvolvidas, são muitas as oportunidades de estabelecer o conceito de câncer para níveis cada vez mais específicos, como para uma única molécula, e determinar quantas e quais alterações são requeridas no processo de tumorigênese. A determinação de alterações genéticas em câncer é de extrema importância, sendo que a identificação de um grande número de alterações em cânceres em progressão pode ser o método para quantificar a extensão da heterogeneidade de um tumor e avaliar pacientes quanto ao risco ou desenvolvimento de resistência a drogas (Loeb *et al*, 2008).

O desenvolvimento do câncer é um processo complexo no qual estão envolvidas anormalidades em muitos genes. A combinação de todos os genes alterados pode revelar as relações funcionais entre genes e cascatas que levam à tumorigênese, além de identificar alvos para o desenvolvimento de tratamentos (Yeang *et al*, 2008).

1.1. Dermicidina

Em 2000, o mRNA do gene Dermicidina (DCD) foi identificado em uma biblioteca de cDNA constituídas de extratos celulares derivados da pele, dendrócitos e melanócitos (Hipfel *et al*, 2000). Em seguida o gene foi mapeado no cromossomo 12, *locus* 12q13.1. O transcrito codifica a um

polipeptídio de 110 aminoácidos, o qual parece dar origem a uma proteína intacta de 11 kDa e vários fragmentos derivados das porções N-terminal e C-terminal, que foram nomeados de acordo com a função biológica, como segue: **1-** Y-P30, peptídeo de sobrevivência neural induzido por estresse oxidativo (Cunningham *et al*, 1998), **2** - Dermicidina, peptídeo antibiótico produzido por células exócrinas das glândulas sudoríparas (Schitteck *et al*, 2001), **3-** IBC, fator de crescimento e sobrevivência induzido nos tumores invasivos da mama (Porter *et al*, 2003).

A super-expressão do DCD parece exercer função oncogênica em tumores cutâneos da pele (Sagawa *et al*, 2003; Minami *et al*, 2004), melanoma maligno (Hipfel *et al*, 2000), próstata (Wang *et al*, 2003), gastro-intestinal (Deans *et al*, 2006), hepático (Lowrie *et al*, 2006), bem como, na capacidade metastática de células cancerígenas (Motoyama *et al*, 2007).

Os genes codificadores da DCD e da lacritina (gene vizinho e com mais de 50% de similaridade) estão presentes no genoma do macaco (cromossomo 11 macaca mulatta) e chimpanzé (cromossomo 12 Pan troglodyte). Porém, não se encontrou o gene ortólogo da lacritina e da DCD no camundongo ou rato (McKown *et al*, 2008). Portanto, novas abordagens tecnológicas são necessárias para caracterizar as funções biológicas e bioquímicas da proteína dermicidina (DCD) e desvendar os mecanismos que expliquem o seu potencial oncogênico no câncer.

Recentes avanços nos métodos de sequenciamento de DNA permitiram a identificação de genes que participam de regiões dos cromossomos que são translocadas, deletadas, mutadas e amplificadas em amostras de tumores de pacientes e em linhagens celulares estabelecidas (Kauraniemi & Kallioniemi, 2006; Neve *et al*, 2006; Nikolsky *et al*, 2008; Hu *et al*, 2008). Estes estudos mostraram que muitas das perturbações moleculares identificadas nas amostras de tumores estão preservadas nas linhagens de células estabelecidas (Neve *et al*, 2006). O gene da DCD está localizado na região 12q13 do cromossomo 12 humano onde estão co-localizados genes das proteínas CDK2 (*Cyclin-dependent kinase 2*), CDK4 (*Cyclin-dependent kinase 4*), STAT2 (*signal transducer and activator of*

transcription 2), SAS (*sarcoma amplified sequence*), MDM2 (*murine double minute 2*), LACRT (*lacritin*), INT1 (*intein 1*), GLI1 (*glioma-associated homolog 1*) e ERBB3 (*V-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3*). Portanto, acredita-se haver uma colaboração entre estes genes durante a transformação de células normais em maligna, esse evento poderia ser mediado por uma co-expressão e colaboração entre DCD e as outras proteínas que estão presentes na região 12q13 quando esta amplificada ou superexpressa (Porter *et al*, 2003). Neste sentido, tem sido nosso objetivo esclarecer os mecanismos moleculares pelo qual a proteína DCD exerce sua função oncogênica.

Os estudos realizados em nosso laboratório e de outros investigadores mostraram que a superexpressão do gene DCD em células do melanoma de roedores B16 (M Garay-Malpartida, tese de doutorado, ICB-USP, 2005; J. Pádua-Borges, tese de mestrado, ICB-USP, 2006), células derivadas de carcinoma da mama humana 21NT (Porter *et al*, 2003) e células da linhagem MCF-7 (Monitto *et al*, 2004) aumenta a capacidade de proliferação, formação de clones e tamanho dos tumores quando as células foram cultivadas *in vitro* ou injetadas em camundongos. Para avaliar este potencial oncogênico foram feitos experimentos de redução da expressão do gene pela técnica do RNA de interferência (Moreira *et al*, 2008). Os estudos mostraram que o silenciamento da expressão do DCD via expressão de RNAi nas células MDA-MB-361 foi capaz de provocar uma redução significativa ($p < 0,001$) na formação de colônias em cultura celular. Quando estas células foram injetadas em camundongos Nude, os tumores derivados do clone pLKO (controle) cresceram mais rapidamente quando comparados aos tumores derivados do clone IBC-I ($p < 0,05$). Portanto, o efeito RNAi também foi preservado durante o crescimento do tumor. Foi interessante notar que a expressão da citoqueratina-18 (CK-18) foi mais intensa nas amostras de células tumorais de animais transplantados com células do clone IBC-I com baixa expressão de DCD, indicando uma possível alteração na diferenciação celular (Moreira *et al*, 2008). O silenciamento de DCD também tornou as células MDA-MB-361 mais susceptíveis aos agentes citotóxicos H_2O_2 , estaurosporina e $TNF-\alpha$,

indicando que o DCD tem importante papel no mecanismo de proteção à morte celular (Cunnigham *et al*, 1998; Porter *et al*, 2003, Dayson Moreira, Tese Doutorado, ICB-USP, 2012).

Os estudos de análise da expressão global de genes que são induzidos e reprimidos pelo DCD nos clones IBC-I, -II e -III da linhagem de mama MDA-361 pelo método de *microarray* da Affymetrix evidenciaram 245 genes cujas diferenças de expressão foram superiores a 3 vezes em relação ao clone controle pLKO (Moreira *et al*, 2008). A redução de DCD causou um aumento na expressão de 25 genes apenas, enquanto reduziu a expressão de mais de 210 genes.

Durante os estudos de validação de expressão de genes obtidos por *microarray* através de ensaios de PCR em tempo real, notou-se que vários genes da família EGF/ERBB/HER estavam sendo regulados negativa e positivamente após a diminuição da expressão de DCD via expressão de RNAi. Em particular, viu-se que a expressão dos genes ERBB1/EGFR1, ErbB-2/HER-2 e ErbB-3/HER-3 e dos fatores de crescimento específicos destes receptores: BTC, AREG, HB-EGF e NGR-4 estava diminuída, enquanto a expressão de ErbB4/HER-4 e dos fatores de crescimento EREG, NGR2 e NGR3 estava aumentada. A expressão do receptor ErbB4/HER-4 foi aumentada em 3 vezes. É interessante mencionar que a expressão ErbB4/HER-4 está associada com a diferenciação epitelial da mama e geralmente a um melhor prognóstico da neoplasia de mama (Muraoka-Cook *et al*, 2008).

Os genes cuja expressão foi aumentada ou reduzida após o silenciamento da DCD foram analisados quanto a formação de redes de sinalização e envolvimento em processos biológicos e patológicos utilizando o programa de bioinformática MetaCore (Ekins *et al*, 2007; Nikolsky *et al*, 2008). Estes estudos mostraram que os genes regulados pelos DCD participam de processos biológicos diretamente afetados pela proteína nos ensaios biológicos, como exemplo, proliferação celular, resistência ao estresse oxidativo e diferenciação celular. O mais importante, confirmou-se uma extensa inter-conectividade entre o DCD e a via de sinalização de

receptores da família EGFR1/ErbBs. Como se sabe, os oncogenes EGFR1 e ERBB2 estão amplificados e/ou superexpressado em 2/3 dos casos de carcinoma da mama, sendo considerados importantes marcadores de diagnóstico e resposta a terapia e tempo de sobrevida das pacientes com doença progressiva (Kauraniemi & Kallioniemi, 2006; Citri & Yarden, 2006). Conclui-se, portanto, que o DCD exerce suas funções oncogênicas via modulação da família ErbBs de fatores de crescimento e receptores de membrana (Markovic *et al.*, em análise).

1.2. Melanoma e expressão gênica.

O melanoma maligno, simplesmente chamado de melanoma, é um câncer que tem origem nos melanócitos, que são células produtoras de melanina que se originam embriologicamente da crista neural. Dentre os tipos de câncer da pele, os melanomas são de pior prognóstico sendo o câncer de mais alta resistência aos fármacos usados na quimioterapia convencional (Nelson & Tsao, 2009). Nos estágios avançados, clones heterogêneos de células malignas podem formar metástases em vários órgãos e tecidos (Curtin *et al.*, 2005).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que anualmente ocorram cerca de 130 mil casos novos de melanoma no mundo, com maior incidência entre a população de pele branca. No Brasil, o melanoma corresponde a 4% de todos os tumores malignos de pele, porém, é responsável por 75% dos óbitos decorrentes da doença. De acordo com dados divulgados pelo Inca, Brasil deve registrar, apenas em 2013, mais de seis mil novos casos de melanoma (INCA, Instituto Nacional do Câncer, 2012, www.inca.gov.br).

O melanoma pode surgir por vias causais diferentes, seu desenvolvimento pode ser resultante de múltiplas e progressivas alterações no DNA celular, causadas por ativação de oncogenes, mutações ou deleções de genes supressores de tumor ou por alteração estrutural dos cromossomas (Nelson & Tsao, 2009).

Vários grupos têm se dedicado aos estudos de identificação de marcadores moleculares para o diagnóstico, prognóstico e potenciais alvos para o desenvolvimento de fármacos. Hoje sabemos que dezenas de genes contribuem na gênese de lesões melanocíticas e alguns dos mecanismos moleculares vêm sendo estudados em detalhes. Entre os genes mais estudados estão os genes reguladores do ciclo celular, como exemplo: os genes codificadores da ciclina D1 e CDK4 (um membro da família de enzima quinase-dependente de ciclinas); os genes codificadores da família de inibidores de CDKs: CDKN2A/p19/ARF e WAF-1/p21; o gene supressor de tumores p53, os genes codificadores de proteínas de vias de sinalização: B-RAF (*serine/threonine-protein kinase B-Raf*) que participa da via Ras-Raf-MEK-ERK), N-RAS (família de GTPases), entre outros. Estudos também têm sugerido a participação de genes codificadores de moléculas de matriz e adesão celular, entre eles, as integrinas ICAM e Mel-CAM, e os genes codificadores dos antígenos tumorais MAGE e PRAME, frequentemente associados com resposta imunológica dos pacientes (Thies *et al*, 2007; Nelson & Tsao, 2009).

Experimentos de expressão global de genes em chips de microarranjo de DNA têm possibilitado a identificação de genes que participam em eventos bioquímicos e metabólicos que são alterados no câncer, e assim, uma melhor compreensão da dinâmica dos mecanismos envolvidos nos processos de carcinogênese e progressão tumoral (Ekins *et al*, 2007; Nikolsky *et al*, 2008; Weinberg, 2008). Centenas de genes que participam das principais perturbações metabólicas e rotas e vias de sinalização intracelular que têm papel central na patogênese do câncer já foram reveladas em vários tipos de tumores, permitindo uma estratificação molecular dos tumores em relação aos estádios histopatológicos e parâmetros de resposta clínica dos pacientes (Nikolsky *et al*, 2008; Hu *et al*, 2008; Cheang *et al*, 2009). Desta forma, estas tecnologias inovadoras em genômica e bioinformática vêm sendo amplamente utilizadas nas pesquisas visando a construção de mapas genéticos e rotas bioquímicas alteradas durante a progressão tumoral em suas múltiplas etapas. Algumas centenas

de genes marcadores genéticos e epigenéticos para vários tipos de cânceres já foram identificados (Weinberg, 2008).

Os estudos de microarranjo de DNA (*Microarray ou gene chip*) para expressão global de genes em tecido tumoral mostraram que certos genes ligados aos genes chamados "*drivers*" do melanoma, em particular a via de sinalização MAPK, Ca^{2+} e WNT1, podem atuar como assinatura molecular ou biomarcadores de diagnóstico clínico de melanomas. No estudo apresentado por Liu e colaboradores encontrou-se uma assinatura molecular de 200 genes entre os quais apenas 12 genes poderiam prever o prognóstico clínico para pacientes com melanomas. Os genes biomarcadores encontrados são os seguintes: EGFR (*Epidermal Growth Fator*), FGFR2 (*Fibroblast Growth Factor Receptor-2*), FGFR3 (*Fibroblast Growth Factor Receptor-3*), IL8 (*Interleukin-8*), PTPRF (*Protein Tyrosine Phosphatase, Receptor Type- F*), TNC (*Tenascin-C*), CXCL13 (*Chemokine C-X-C Motif, Ligand-13*), COL11A1 (*Collagen, Type XI, Alpha-1*), CHP2 (*Calcineurin-Like EF-Hand Protein 2*), SHC4 (*Src Homology 2 Domain Containing*), PPP2R2C (*Protein Phosphatase 2, Regulatory Subunit B, Gamma*) e WNT4 (*Wingless-Type MMTV Integration Site Family, Member 4*) (Liu et al, 2013). Por outro lado, Brunner e colaboradores utilizando uma estratégia similar identificaram uma assinatura de 9 genes na qual estão presentes 6 genes protetores e três genes de risco. Entre os genes protetores foram identificados o gene DCD, e os genes: KRT9 (*keratin 9*), PIP (*Prolactin-Induced Protein*), SCGB1D2 (*Secretoglobin, Family 1D, Member 2*), SCGB2A2 (*Secretoglobin, Family 2A, Member 2*), COL6A6 (*Collagen, Type VI, Alpha 6*); e os 3 genes de risco são: KLHL41 (*Kelch-Like Family Member 41*), ECRG2 (*Serine Peptidase Inhibitor, Kazal Type 7*) e HES6 (*Hes Family BHLH Transcription Factor 6*). Também foi interessante notar que os genes DCD, PIP, SCGB1D2 e SCGB2A2 codificam proteínas secretadas no suor. Estes genes fazem parte de um grupo de 13 genes entre os 50 genes cuja expressão encontra-se reduzida (*down-regulated*) em melanomas avançados em pacientes integrantes do grupo DMFS (*Distant Metastasis-Free Patient Survival*) (Brunner et al, 2013).

Em um terceiro estudo, verificou-se que a expressão de DCD não tem valor preditivo em melanomas metastáticos (Timar *et al*, 2010). Portanto, os melanomas podem surgir por vias causais diferentes e envolver a participação de vários oncogenes. Também podemos concluir que a expressão anormal de DCD em melanócitos tem um papel definitivo na etiologia e progressão de melanomas. Assimn tornou-se muito importante a realização de novos estudos para se obter mais informações sobre o papel da DCD no melanoma, os quais poderão ajudar a monitorar, estratificar e rastrear os pacientes na direção de terapias personalizadas associadas com agentes únicos menos agressivos e mais eficazes.

2. OBJETIVOS

Avaliar o impacto da supressão da proteína DCD, via RNA de interferência, na transcrição de genes envolvidos no desenvolvimento do fenótipo maligno das células de melanoma G-361.

2.1. Objetivos específicos

- a) Identificar e comparar os genes que são induzidos e reprimidos nos clones de células de melanoma G-361 controle e expressando shRNA através de ensaios de expressão gênica global por microarranjo de DNA (Affymetrix GeneChip Human 1.0 ST array);
- b) Validar os genes regulados positiva e negativamente através de ensaios de amplificação por PCR em tempo real, e ensaios de expressão de proteínas por espectrometria de massas.

3. MÉTODOS

3.1. Comitê de Ética

O trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CEP-FMUSP) (protocolo nº 169/10).

3.2. Planejamento experimental

Neste trabalho foram utilizadas células da linhagem G-361, esta linhagem foi isolada de um homem de origem caucasiano com melanoma maligno, apresenta fenótipo invasivo e metastático, ou seja, tem múltiplas alterações genéticas. A referida linhagem foi adquirida da ATCC (*American Type Culture Collection* nº CRL-1424). Esta linhagem foi transduzida com os vetores lentivirais para a expressão do shRNAi-DCD. As sublinhagens derivadas foram denominadas G-361-pLKO e G-361-IBC-I. G-361-pLKO refere-se as células controle contendo o plasmídeo vazio e G-361-IBC-I refere-se as células que expressam o shRNA para o mRNA da DCD.

3.3. Avaliação dos níveis de expressão do gene DCD

As células foram cultivadas em frascos plásticos adequados para o cultivo de células aderentes. O pH e a temperatura foram mantidos na faixa fisiológica, através de incubação em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ e a 37°C. O meio de cultura foi renovado a cada três dias e a cultura foi subcultivada quando as células atingirem, aproximadamente, 80-90% de densidade de saturação. A linhagem foi cultivada em meio RPMI (desenvolvido no Roswell Park Memorial Institute) suplementado com 10% de SFB (soro fetal bovino). Os estoques celulares foram congelados em meio contendo 10% de DMSO (dimetilsulfóxido), e mantidos em container de nitrogênio líquido.

Antes de começar com as análises da expressão genica foram verificados os níveis de expressão do gene DCD nos clones celulares por ensaios de qRT-PCR.

3.4. Análise da expressão global de genes pela tecnica de DNA *MICROARRAY*

3.4.1. Extração e purificação de RNA total

A extração de RNA foi realizada pelo método de TRIzol (Life Technologies, Inc). Culturas confluentes de células ($1-2 \times 10^6$ células) das sublinhagens G-361-pLKO e G-361-IBC-I foram coletadas e utilizadas para extração. Para cada amostra foi adicionado 200 μ L de clorofórmio. Após 10 minutos a temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas durante 15 minutos a 4°C e 12.000 x g. O sobrenadante foi transferido para outro micro-tubo e foi adicionado 500 μ L de isopropanol. As amostras foram homogeneizadas por 2 minutos e deixadas à temperatura ambiente por 20 minutos para iniciar a precipitação. A seguir, as amostras permaneceram a 20°C por uma noite para permitir a precipitação do RNA total. Após a extração, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8% para confirmar a integridade do RNAm.

No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas durante 30 minutos a 4°C e 14.000 x g. O sobrenadante foi descartado para adição de 1mL de etanol 70%, seguida de centrifugação por 2 minutos a 4°C e 14.000 x g. Este processo foi repetido por mais duas vezes. O excesso de etanol foi retirado e o precipitado foi seco por 5-10 minutos a temperatura ambiente. A ressuspensão do precipitado de RNA total foi feita em 15 μ L de água DEPC. Para facilitar a ressuspensão, os tubos foram deixados em banho Maria a 55°C durante 15 minutos.

Após a extração, a purificação do RNA total foi realizada utilizando o Qiagen's Rneasy MinElute Cleanup (Qiagen, Inc), de acordo com as instruções do fabricante. Para esse procedimento, foram utilizados 10 μ g

de RNA total em o volume final de 100 μ L. Após a adição de 350 μ L de tampão RLT, foi adicionado 250 μ L de etanol 100% e a solução final transferida para uma coluna Rneasy MiniElute, acoplada a um tubo coletor, sendo submetida à centrifugação por 15 segundos a 8000 x *g*. Em seguida, o eluato foi descartado e 500 μ L de tampão RPE foram aplicados no centro da coluna, submetendo-a à nova centrifugação a 8000 x *g* por 15 segundos. Após descarte do eluato, foi adicionado mais 500 μ L de tampão RPE sobre a coluna, submetendo-a a centrifugação por 2 minutos a 8000 x *g*.

A seguir, a coluna foi colocada em um novo tubo de 1,5 mL e, após aplicação de 14 μ L de água livre de RNases, a amostra foi centrifugada por 1 minuto a 8000 x *g* para eluição do RNA puro, o qual foi submetido a quantificação.

3.4.2. Quantificação de RNA total

A quantificação do RNA total foi obtida pela leitura da absorbância nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm pelo espectrofotômetro NanoDrop (ND1000 Spectrophotometer - NanoDrop Technologies), sendo a pureza avaliada pela razão 260/280. Foram consideradas amostras de pureza aceitável quando os valores dessa razão variavam entre 1.8 a 2.1.

3.4.3. Ensaio de Microarranjo de oligonucleotídeos (DNA Microarray)

O RNA total foi convertido em cDNA (2 ng) na presença de primers oligo dT e transcriptase reversa. Amostras de cDNA foram marcadas com nucleotídeos biotina-CTP e biotina-UTP na presença de T7 polimerase, conforme descrito (Moreira *et al*, 2008). Em seguida, as amostras de cRNA (10 μ g) foram fragmentadas à 95°C por 35 min, e os fragmentos de 30-200 nucleotídeos hibridizados à 45°C, por uma noite, em lâminas de *Microarray* Affymetrix GeneChip Human 1.0 ST Array, contendo sondas de oligonucleotídeos para aproximadamente 28.869 transcritos de genes

humanos. Após lavagens as lâminas foram incubadas com solução contendo estreptavidina conjugada com ficoeritrina (streptavidin – Phycoerythrin SAPE). A leitura e quantificação da expressão foram feitas com o *Gene Chip Scanner* 3000 7G Affymetrix. As imagens foram analisadas pelo programa de bioinformática Expression Console™ Software 1.3.1 da Affymetrix. Esta etapa foi realizada no *Microarray Core Facility* do Dana-Farber Cancer Institute, em Boston, MA, USA.

3.4.4. Análise dos dados obtidos pela técnica de microarranjos de DNA

A partir dos dados da expressão genica pelo ensaio de DNA *Microarray* foi realizada uma análise preliminar *in silico* dos genes diferencialmente expressos. Esta análise inicial resultou em uma lista de genes que foram regulados pelo silenciamento da expressão do gene DCD. A lista de genes diferencialmente expressos (DEGs) foi analisada quanto à ontologia gênica e funcional, vias e redes regulatórias, processos e doenças usando a plataforma de bioinformática METACORE™ (GeneGo, disponível em www.genego.com/metacore) (Ekins *et al*, 2007; Nikolsky *et al*, 2008). MetaCore™ é uma plataforma computacional que permite uma integração e análises especializadas de diferentes tipos de dados experimentais (expressão de mRNA, proteômica, siRNA).

3.5. Análise da expressão dos genes de interesse por qRT-PCR

3.5.1. Síntese de cDNA pelo método da Transcriptase Reversa

A síntese de DNA complementar (cDNA) a partir de 2 µg RNA total foi realizada pelo método da transcriptase reversa. Inicialmente 2 µg de RNA total foi tratada com DNase I (Life Technologies, Inc), a reação foi feita em um volume final de 10 µl contendo 1 µl do tampão da enzima e 1 µl da enzima (50U/µl). As amostras foram incubadas por 15 minutos a 37°C e em seguida por 15 minutos a 75°C para inativação da enzima. Em seguida foi

realizada a da transcrição reversa. A reação foi feita em volume final de 20 µl na presença dos seguintes reagentes: 1 µl de dNTPs mix 10 mM (dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 4 µl de tampão de reação 5X (Tris-HCl 50 mM, KCl 75 mM e MgCl 3 mM), 2 µl de DTT 100 mM, 1 µl de inibidor de RNase (RNase OUT, Invitrogen) 40 U/µl, 1 µl do *primer* OLIGO dT 0.5 µg/µl, 1 µl da enzima transcriptase reversa M-MLV (Life Technologies, Inc) e 2 µg de RNA total tratado com DNase. As etapas da reação de transcrição reversa foram as seguintes: 1) desnaturação 65°C, 5 min; 2) síntese, 42°C, 60 min; 4) reação de inativação da enzima transcriptase reversa 70°C, 15 minutos.

3.5.2. RT-PCR Quantitativo

Para análise da expressão relativa de mRNA foram realizados ensaios de RT-PCR Quantitativo (qRT-PCR). Os *primers* utilizados para a amplificação dos transcritos de interesse foram desenhados com o auxílio do programa computacional Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>), verificadas *in silico* (University of California Santa Cruz Genome Bioinformatics) e sintetizados pela Exxtend Biotecnologia Ltda (Paulinia, SP). Para a quantificação do produto formado foi utilizado o reagente SYBR[®] Green Dye (Applied Biosystems, Inc). Este reagente possui afinidade pela *minor groove* da dupla fita de DNA. Quando não está ligado ao DNA, o SYBR[®] Green Dye emite uma pequena fluorescência no comprimento de onda de 520 nm. Entretanto, quando se liga à dupla fita de DNA, a fluorescência aumenta cerca de 100 x, permitindo então a detecção do produto do PCR em tempo real. Para a normalização dos dados, foram realizadas três reações de qRT-PCR para cada amostra de cDNA analisada, sendo uma utilizando *primers* para o gene-alvo e a outra utilizando *primers* para um gene de expressão constitutiva (exemplos: GAPDH, 18S, HPRT, ACTB), atuando como controle interno da quantidade de cDNA utilizada nas reações. Assim, a expressão do gene alvo foi determinada em função da expressão do gene controle.

A cada reação de qRT-PCR foi adicionado: 1 µl do cDNA diluído (1:10), 6,25 µl Platinum SYBR Green qPCR supermix (Life Technologies,

Inc) e 0,15 µl de cada *primer* a 20 nM , sendo a concentração final igual a 240 nM. As reações foram feitas no equipamento Stratagene Mx3005P Real time qPCR System (GE Healthcare). Os passos das reações foram as seguintes: 1) desnaturação a 95°C por 10 min para ativar a enzima, 2) 40 ciclos à 95°C por 30 segundos (desnaturação) e 60°C por 1 min (anelamento). As alterações relativas de expressão de cada gene foram normalizadas pela expressão de um gene controle (ACTB) pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak & Shmittgen, 2001) e as taxas de expressão relativas obtidas pelo programa REST 2005 (Pfaffl, 2004; <http://www.gene-quantification.de>).

3.6. Comparação dos genes de interesse em bases de dados de ensaios de *Microarray*

Com o intuito de comparar a expressão dos genes diferencialmente expressos nas linhagens G-361-PLKO e G-361-IBC-I diante outras linhagens celulares de melanoma, foram feitas comparações da expressão dos genes de interesse utilizando os dados disponíveis no *The Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE)* do Broad Institute, Cambridge, MA, USA (<http://www.broadinstitute.org>) (Barretina *et al*, 2012). Para realizar as comparações, foram gerados os arquivos “CEL” com os resultados de análises de expressão de mRNA por *microarrays* obtidos para as linhagens de melanoma denominadas: 501 MEL, A375, MALME3M, ML310 e SK-MEL-2. Este análise teve por objetivo comparar a expressão dos genes de interesse diferencialmente expressos nas sublinhagens G-361-PLKO e G-361-IBC-I e validados pela técnica de qRT-PCR.

3.7. Análise da expressão de proteínas

3.7.1 Extração de proteínas nucleares

O método adotado foi segundo descrito (Ding *et al*. 1998). Para extração de proteínas nucleares das sublinhagens G-361-pLKO e G-361-IBC-I, o meio de cultura foi retirado e a monocamada celular foi lavada duas

vezes com PBS gelado. Após as lavagens, foi adicionado um volume de PBS gelado suficiente para cobrir a monocamada, e a suspensão celular foi centrifugada a 5000 rpm por 1 min a 4°C, sendo que o sobrenadante foi desprezado e as células ressuspendidas em 150 µl de tampão hipotônico e incubadas a 4°C por 15 min, depois foi adicionado 9 µl de NP-40 10% e a suspensão celular foi homogeneizada no vórtex por 30 segundos na velocidade mais alta. As células lisadas foram centrifugadas a 12000 rpm por 1 min, obtendo-se assim, a fração citoplasmática (sobrenadante) e a nuclear (sedimento). A fração nuclear foi ressuspendida em 15 µl de tampão hipertônico e incubadas a 4°C por 20 min. Após este período, a mistura foi centrifugada a 14000 rpm por 5 min à 4°C, obtendo-se a fração enriquecida com proteínas nucleares, que foram aliquoteadas e estocadas a -70°C. Aliquotas de cada lisado foram submetidas à quantificação de proteínas pelo método de Bradford (BioRad).

3.7.2. Espectrometria de massas LC-MS

Os extratos proteicos nucleares foram submetidos a cromatografia em um sistema HPLC *nanoflow* (EasynLC-Proxeon Biosystem, Odense, Dinamarca). Cada amostra foi carregada em uma coluna de fase reversa C18 (10 cm de comprimento, 75 µm de diâmetro interno). A separação foi realizada em gradiente 2-50% de acetonitrila em ácido fórmico 0.1% por 45 min. Os peptídeos eluídos foram separados e analisados em espectrômetro de massa LTQ Velos Orbitrap (Thermo Scientific) sendo que os 10 íons mais intensos foram selecionados para fragmentação por dissociação induzida por colisão (CID). Os espectros de massa foram adquiridos no modo positivo. As amostras foram analisadas adquirindo uma varredura de MS em uma faixa de relação massa/carga (m/z) de 300 a 2000 no espectrômetro Orbitrap.

Esta etapa foi realizada no Centro de Facilidades de Apoio à Pesquisa (CEFAP) do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB- USP).

3.7.3. Identificação das proteínas

A identificação dos peptídeos foi feita com a ferramenta *Proteome Discover* (Thermo Scientific) que usa como banco de dados do UniProtKB / Swiss-Prot. Foi adotado um erro tolerável para massa do peptídeo de $\pm 1,5$ Da e de $\pm 0,8$ Da para massa do fragmento. Os resultados obtidos foram selecionados em relação à espécie *Homo Sapiens* (humano).

3.7.4. Análise de redes de vias de sinalização e processos biológicos relacionados com as proteínas identificadas

Para analisar as principais redes de sinalização e vias canônicas relacionadas às proteínas identificadas em um contexto biológico foi usado o programa STRING 9.1 (disponível em: <http://string-db.org>). STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins) é uma base de dados para identificação e predição de interação proteína-proteína de mais de 1100 organismos (Franceschini *et al*, 2013). Os filtros selecionados foram proteínas da espécie humana. Os resultados obtidos foram expressos em um *score* em escala log (*P* value) gerado com base na distribuição hipergeométrica e calculado pelo teste exato de Fischer, e correspondem as chances das proteínas participarem de redes de interação proteína-proteína.

3.8. Análise estatística

Os dados apresentados neste trabalho foram comparados pelo teste *t Student*, Anova e *Pair Wise P*. O resultado foi considerado significativo quando $P < 0,05$. Os cálculos foram feitos através do programa *GraphPad Prism 5*.

4. RESULTADOS

4.1. Confirmação do silenciamento do gene DCD

Em todos os experimentos realizados foram feitas primeiramente as análises da expressão gênica diferencial nas sublinhagens G-361-pLKO (vetor vazio) e G-361-IBC-I (células que expressam RNA de interferência contra o mRNA da DCD) para confirmar o silenciamento constitutivo do gene DCD.

Por ensaios de PCR semi-quantitativo e quantitativo foi confirmada a redução da expressão do gene DCD na sublinhagem G-361-IBC-I em relação a sublinhagem G-361-pLKO (Figura 1).

Figura 1. Expressão do gene DCD por RT-PCR (A) e PCR em tempo real (B) nos clones de células do melanoma G-361-pLKO (controle) e expressando shRNA contra a DCD, sublinhagem G-361-IBC-I. A expressão do gene da actina (ACTB) foi usada como controle endógeno; a taxa de expressão relativa do DCD em relação ao gene ACTB foi obtida pelo programa REST. ** $p < 0.001$, pelo teste *Pair Wise P(H1)*.

4.2. Análise da expressão gênica pela técnica de DNA *Microarray*

4.2.1. Integridade do RNA

Um passo determinante para o sucesso da técnica de *Microarray* é a qualidade do RNA total extraído e purificado. As amostras de RNA total purificadas apresentaram níveis de pureza satisfatórios tendo a relação 260/280 variando entre 1,9 a 2,0.

Figura 2. Avaliação da integridade das amostras de RNA por eletroforese em gel de agarose em condições desnaturantes. As bandas correspondem ao rRNA 28S e 18S.

4.2.2. Análise da qualidade da imagem dos GeneChips®

A avaliação da qualidade da hibridização foi realizada pelo *Affymetrix Expression Console™* Software 1.3.1. Os valores de intensidade de sinal resultante da hibridização com os Genechips® foram detectados utilizando o Gene Chip Scanner 3000 7G Affymetrix. Todas as áreas dos Genechips® foram inspecionadas com a finalidade de identificar possíveis artefatos ou manchas.

Figura 3: Imagem do GeneChip obtida pelo Scanner 3000 após a hibridização das amostras para a sublinhagem G-361-pLKO. Visualização do nome da lâmina pela hibridização do Oligo B2.

4.2.3. Normalização dos dados

Para reduzir erros e variações técnicas e tornar as intensidades das imagens (spots) comparáveis entre si foi realizada a normalização do experimento. Os dados foram processados com o programa dChip, usando o método de normalização *invariant set* e o método baseado em modelos de Li-Wong para calcular os níveis de expressão (Li & Wong, 2001). Os dados de intensidade de fluorescência são tradicionalmente visualizados utilizando-se gráficos de dispersão. Os gráficos a seguir foram feitos com o programa dChip.

Figura 4. Representações da normalização da sublinhagem G-361-pLKO. Parte Superior: Gráficos de dispersão dos fluoróforos Cy3 x Cy5 (A1 antes e A2 depois da normalização). Parte Inferior: MA-plot (A1.1 antes e A2.1 depois da normalização).

Figura 5. Representações da normalização da sublinhagem G-361-IBC-I. Parte Superior: Gráficos de dispersão dos fluóforos Cy3 x Cy5 (B1 antes e B2 depois da normalização). Parte Inferior: Mean-Average-plot (B11 antes e B2.1 depois da normalização).

4.2.4. Análises dos genes diferencialmente expressos (DEGs)

Para efeitos de comparação dos genes diferencialmente expressos foram utilizados os dados obtidos após a normalização. Nestas análises foram considerados apenas genes que apresentaram uma diferença de expressão superior a três vezes tanto para acima (induzidos) quanto para baixo (reprimidos), com uma significância estatística de $p < 0.05$ (Figura 6).

A comparação dos índices de expressão entre a sublinhagem controle G-361-pLKO e a sublinhagem G-361-IBC-I mostrou que o silenciamento do DCD produziu um aumento na expressão de 162 genes e uma redução na expressão de 212 genes (Anexo I).

Figura 6. Mean-Average-plot da comparação dos genes diferencialmente expressos. Os pontos em vermelho representam os genes (induzidos ou reprimidos) com uma diferença de expressão superior a três vezes e $p < 0.05$.

Figura 7 – Heatmap gerado com programa *ArrayMining* com dados dos genes diferencialmente expressos entre as sublinhagens G-361-pLKO e G-361-IBC-I. Valores de expressão gênica baixos são representados em verde claro enquanto os valores de expressão altos são indicados em vermelho claro.

4.2.5. Análise funcional dos DEGs

A partir da lista de DEGs começamos a busca dos genes de interesse, ou seja, os genes modulados pelo silenciamento do DCD e que poderiam apresentar alguma função importante no desenvolvimento do fenótipo maligno das células de melanoma G-361.

A pesquisa baseada em ontologia (função do gene) e vias metabólicas de cada um dos genes foi feita no banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) na plataforma DAVID (*Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*) (Huang *et al.*, 2009). Os genes com funções ou localizações celulares semelhantes foram classificados e agrupados por categoria ou função biológica como apresentado nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1. Categorias funcionais dos genes induzidos pelo silenciamento do gene DCD na sublinhagem G-361-ICB-I

ID Affymetrix	Símbolo do gene	Nome do gene	<i>Fold change</i>
Empacotamento do DNA (Formação do Nucleossomo)			
8117339	HIST1H3C	Histone cluster 1, H3C	1,54
8117429	HIST1H2BI	Histone cluster 1, H2B	1,55
8117583	HIST1H3H	Histone cluster 1, H3H	1,57
7924888	HIST3H2A	Histone cluster 3, H2A	1,63
8124391	HIST1H2AB	Histone cluster 1, H2AB	1,63
8124484	HIST1H2BJ	Histone cluster 1, H2BJ	1,7
8117377	HIST1H1E	Histone cluster 1, H1E	1,72
7919606	HIST1H2BA	Histone cluster 2, H2BF	3,37

Biossíntese de Proteínas			
7895275	RPL6	Ribosomal protein L6	5,6
7942586	RPS3	Ribosomal protein S3	2,82
8014749	RPL23	Ribosomal protein L23	1,6
8047635	RPL12	Ribosomal protein 12	1,54
7892730	RPL24	Ribosomal protein 24	7,07
Resposta Imune			
8046790	TNFRSF13B	Tumor necrosis factor (receptor) superfamily, member 13B	4,04
8004464	TNFSF13	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13	1,8
7922337	TNFSF18	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 18	1,71

Tabela 2. Categorias funcionais dos genes reprimidos pelo silenciamento do DCD na sublinhagem G-361-ICB-1

ID Affymetrix	Símbolo do gene	Nome do gene	<i>Fold change</i>
Regulação da transcrição			
7893211	TCEB2	Transcription elongation factor B (SIII), polypeptide 2	-4,35
7925611	TFB2M	Transcription factor B2, mitochondrial	-4,34
8174134	TCEAL6	Transcription elongation factor A (SII)-like 6	-2,63
8119241	ZNF292	Zinc finger protein 292	-6,53
8165672	ZNF804B	Zinc finger protein 804B	-5,4

8155246	ZCCHC7	Zinc finger, CCHC domain containing 7	-5,25
7949742	ZBTB44	Zinc finger and BTB domain 44	-3,43
8151585	ZNF616	Zinc finger protein 616	-3,23
8180283	SNORD68	Small nucleolar RNA, C/D box 68	-1,58
RNA Splicing			
7893766	SNORD18C	Small nucleolar RNA, C/D box 18C	-13,00
100302742	RNU6-42	U6 small nuclear 42	-8,34
7982062	SNORD115	Small nucleolar RNA, C/D box 115 cluster	-5,04
7981953	SNORD116-8	Small nucleolar RNA, C/D box 116-8	-3,94
8130578	SNORA20	Small nucleolar RNA, H/ACA box 20	-3,8
8132960	SNORA22	Small nucleolar RNA, H/ACA box 22	-2,01
7977058	SNORA28	Small nucleolar RNA, H/ACA box 28	-1,91
8130567	SNORA29	Small nucleolar RNA, H/ACA box 29	-1,83
Ciclo celular			
8095564	CDK6	Cyclin-dependent kinase 6	-5,16
8105862	CDK7	Cyclin-dependent kinase 7	-1,57
8132803	CDC14C	CDC14 cell division cycle 14	-2,00
Catabolismo de proteínas dependente de modificação			
7892685	USP22	Ubiquitin specific peptidase 22	-22,19
8078252	UBE2E2	Ubiquitin-conjugating E2E 2	-1,64

8097098	USP53	Ubiquitin specific peptidase 53	-1,57
388165	UBE2Q2P1	Ubiquitin-conjugating enzyme E2Q family member 2	-1,55
8173922	RNF13	Ring finger protein 13	-5,54
Controle do crescimento celular			
8063408	PTPN1	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 1	-10,47
7944363	PPP2R2A	Protein phosphatase 2, regulatory subunit B, alpha	-3,15
8152522	ENPP2	Ectonucleotide pyrophosphatase 2	-1,51
Adesão celular			
804755	PCDH9	Protocadherin 9	-6,73
8108713	PCDHB8	Protocadherin beta 8	-1,8

4.2.6. Ontologia Genica (GO) de processos celulares

A ontologia gênica dos DEGs (*in silico*) foi feita com o programa MetaCore (<http://thomsonreuters.com/metacore/>). Neste estudo verificou-se que vários dos genes identificados são diretamente envolvidos em processos pós-transcricionais das células. Como apresentado na figura 8, o processo que apresentou o maior valor estatístico foi organização do nucleossomo. Dentre os genes diferencialmente expressos nesse processo estão alguns genes da família das histonas. Também sobressaem genes envolvidos no processamento do RNA, especificamente na formação do spliceossomo.

Figura 8. Dendrograma de ontologias gênicas (GO) de funções e processos celulares alterados pelo silenciamento da DCD. As barras laranja representam os valores estatísticos para cada função e/ou processo celular alterado na sublinhagem G-361-IBC-I em relação a sublinhagem controle G-361-pLKO.

4.2.7. Anotação funcional das vias alteradas

A tabela 3 mostra os resultados obtidos da análise de formação de vias e redes entre os 374 genes usando a plataforma Metacore. A via que apresentou o maior valor estatístico foi a via de sinalização APRIL e BAFF e a via de sinalização anti-apoptótica que envolve os membros da família do TNF- α (fator de necrose tumoral) e genes da família do fator de transcrição NF- κ B (factor nuclear kappa B).

Tabela 3. Anotação funcional obtida na plataforma METACORE das vias alteradas pelo silenciamento do gene DCD.

Categoria¹	p-value	Genes	Benjamini²
1 Apoptose e sobrevivência Sinalização APRIL e BAFF	4,546E-04	Calcineurin A (catalytic), TACI(TNFRSF13), APRIL(TNFSF13), TRAF3	5,50 E-01
2 Via de sinalização Anti-apoptótica TNFs / NF- κ B / IAP	1,957E-03	TACI(TNFRSF13), APRIL(TNFSF13), TRAF3	6,30 E-02
3 Transcrição (Papel de Akt na ativação do Fator induzido por hipóxia HIF1)	1,957E-03	PGK1, VEGF-A, Transferrin	8,20 E-01
4 Apresentação de Antígenos Via MHC de Classe I	2,177E-03	PSMB5, Calnexin, PDIA3	7,20 E-01

¹Categoria- Refere-se ao enriquecimento funcional; ²Benjamini- teste estatístico para corrigir os valores de enriquecimento e evitar falso positivo.

Após o silenciamento do gene DCD nas células de Melanoma G-361 os genes TNFRSF13B e TNFSF13 foram induzidos, enquanto que os genes TRAF3 e PPP3CB foram reprimidos. Estes resultados sugerem a possível modulação da via de sinalização APRIL e BAFF que está diretamente relacionada com a sinalização do NF- κ B pelo silenciamento do DCD. A figura 9 apresenta todos os genes conhecidos que participam desta via.

Figura 9. Modulação da via de sinalização APRIL /BAFF pelo silenciamento do gene DCD nas células de Melanoma G-361. Os termômetros vermelhos representam regulação positiva e os azuis, a regulação negativa. Dados obtidos com a plataforma MetaCore.

Na figura 10 está representada a rede de conectividade entre todos genes diferencialmente expressos nas células G-361 após o silenciamento do DCD. Os centros da rede foram centralizados nos fatores de transcrição NF- κ B e c-Myc.

Figura 10. Rede de conectividade entre os genes diferencialmente expressos nas células G-361 após o silenciamento do DCD. Linhas verdes escuras representam interações diretas e linhas verdes finas claras interações indiretas. Dados obtidos pela plataforma MetaCore.

4.3. Seleção dos genes candidatos para validação de expressão diferencial por RT-qPCR

A partir dos resultados obtidos pelas análises de bioinformática e geradas pelo software MetaCore selecionamos os genes que seriam validados por qRT-PCR baseados nos seguintes critérios:

1. Função do gene bem estabelecida em bancos de dados como NCBI para genes (www.ncbi.nlm.nih.gov/gene), e presença do gene na análise de Ontologia Gênica e nas vias de sinalização mais relevantes.
2. Relação do gene com processos oncogênicos, e impacto das publicações que relacionam o gene com diferentes aspectos do melanoma maligno.

Os genes HIST1H1, HIST1H2AB, HIST1H2BA, HIST1H2BI foram selecionados para ser validados pelos resultados obtidos na análise funcional, uma vez que 9 genes da família das histonas foram categorizados como genes induzidos após o silenciamento do DCD. Os genes TNFRSF13B, TNFSF13, PPP3CB, TRAF3 foram selecionados pelos resultados obtidos na anotação funcional das vias alteradas, estes genes fazem parte da via de sinalização APRIL e BAFF, que apresentou o maior valor estatístico.

Um passo fundamental para iniciar a quantificação da expressão dos genes selecionados por PCR em tempo real foi a seleção de pares de *primers* específicos. Os *primers* foram desenhados utilizando o software Primer3 (disponível em: <http://frodo.wi.mit.edu/>) e o software PrimerBank (disponível em <http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank>). A especificidade para cada par foi confirmada *in silico* na base de dados UCSC genomics (disponível no site: <http://genome.ucsc.edu>).

A escolha do gene normalizador ou genes de referência, entre os vários genes descritos na literatura (exemplos: HPRT, GAPDH, 18S, B-

ACTIN), foram feitas análise com o software BestKeeper[®] (disponível em <http://www.gene-quantification.de/bestkeeper.html>). Nesta pesquisa encontramos que o gene Beta-actina era o gene mais adequado para ser usado como normalizador das reações de qRT-PCR. A Tabela 4 apresenta os genes selecionados e os *primers* utilizados na validação.

Tabela 4. *Primers forward e reverse* desenhados para genes diferencialmente expressos selecionados para validação técnica.

Gene	Forward Primer	Reverse Primer	Produto (pb)	Eficiência
ACTB	ATGGTCAACCCACCGT GT	TTCTGCTGTCTTTGGAAGT TGC	200	1
DCD	CACCAAAGCCAAGGAA GCAG	CAGCTATAGTACTGAGTCA AGG	173	0,95
HIST1H1E	CTGGGGAAGCCAAGCC TAAG	CTGCTTTTCGCCTTTTTCGG G	158	0,98
HIST1H2AB	ACTCGGTCTTCTCGTGC AG	GCTCCTCGTCATTGCGGAT	120	0,97
HIST1H2BA	ATGCCGGAGGTGTCAT CTAAA	AGAATAACTCTCCTTACGG GTCC	122	1
HIST1H2BI	GGCTATGGGGATTATGA ACTCCT	CACAGCCGTTTGGATCTCC	124	0,97
HDAC1	CTACTACGACGGGGAT GTTGG	GAGTCATGCGGATTCGGTG AG	77	0,98
TNFSF13	CCTCACGGTGGTGTCTT TCTA	AACGGCACGCTTATTTCTG CT	126	1
TNFRSF13B	GGCAGGATCTCATAGC CACC	TGAGTAATGAGTGGCCTGG G	100	0,98
TRAF3	CGCCAGGAGAGTCCAT CTT	AGCAGAACGCTGCGGAC	120	1
PPP3CB	GATGTCAAGCGATGTGT TGG	CAGAGCCTAGCCGAGCC	90	0,95

4.4. Validação da expressão diferencial por RT-qPCR

Selecionamos 8 genes para validação de expressão por RT-qPCR. São eles: TNFRSF13B, TNFSF13, PPP3CB, TRAF3, HIST1H1E, HIST1H2AB, HIST1H2BA, HIST1H2BI. Na Tabela 5 é mostrado a lista de genes selecionados, a taxa de variação (*fold change*) e o valor significância encontrado na técnica de RT-qPCR.

Tabela 5. DEGs selecionados para validação técnica por RT-qPCR

Símbolo do gene	Microarray †			RT-qPCR *		
	<i>Fold Change</i>	Hiper ou Hipo	↑ Valor de P ↓	Hiper ou Hipo	↑ Valor de P ↓	
TNFRSF13B	4.06	↑	<0.05	↑	<0.001	
TNFSF13	1.8	↑	<0.05	↑	<0.001	
PPP3CB	-1.51	↓	<0.05	↓	0.660	
TRAF3	-4.06	↓	<0.05	↓	0.043	
HIST1H1E	1.71	↑	<0.05	↑	<0.001	
HIST1H2AB	1.63	↑	<0.05	↑	<0.001	
HIST1H2BA	1.96	↑	<0.05	↑	<0.001	
HIST1H2BI	1.55	↑	<0.05	↑	<0.001	

† t-test (Dchip)

* *Teste Pair Wise P (H1)*

O gráfico na figura 11 apresenta as variações de expressão de alguns genes da família das histonas observadas entre as duas sublinhagens. Estes genes apresentaram a mesma tendência do ensaio de *Microarray* (Genes induzidos na linhagem G-361-IBC I), os 4 genes validados tiveram significância estatística ($p < 0.001$).

Figura 11. Efeito do silenciamento do gene DCD sobre a expressão de alguns genes da família das histonas. A expressão relativa de cada gene foi determinada por RT-qPCR. Os experimentos foram realizados em triplicatas e repetidos em três ensaios independentes. *Colunas*, média; *barras*, erro padrão; ** $p < 0.001$, pelo teste *Pair Wise P (H1)*.

As caudas amino-terminais das histonas estão sujeitas a uma variedade de modificações pós-traducionais (metilação, acetilação, fosforilação), estas modificações podem levar à ativação ou ao silenciamento gênico. Uma das modificações mais estudadas atualmente é a acetilação, que depende da atividade das histonas acetiltransferases e das histonas desacetilases (Quang et al, 2012), assim, decidimos aprofundar um pouco no estudo das histonas, e além dos genes descritos nos resultados do *Microarray*, analisamos a expressão do gene HDCA1 (histona desacetilase 1), gene associado com a proliferação tumoral em muitos tipos de cânceres (Singh et al, 2013). Os resultados indicam que na sublinhagem G-361- IBC-I, a expressão deste gene aumenta significativamente (Figura 12).

Figura 12. Efeito do silenciamento do gene DCD sobre a expressão do gene HDAC1. A expressão relativa do gene foi determinada por RT-qPCR. Os experimentos foram realizados em triplicatas e repetidos em três ensaios independentes. Colunas, média; barras, erro padrão; * $p < 0.05$, pelo teste *Pair Wise P* (H1).

Na figura 13 observamos a expressão relativa dos genes associados à modulação da via de sinalização APRIL/BAFF, todos os genes foram validados e apresentaram valores de expressão similares aos obtidos no ensaio de *Microarray*, TNFRSF13B e TNFSF13 foram induzidos e os genes PPP3CB e TRAF3 foram reprimidos após silenciamento do DCD, três dos quatro genes validados apresentaram significância estatística.

Figura 13. Efeito do silenciamento do gene DCD sobre a expressão de alguns genes presentes na via de sinalização TNFs/NF- κ B. A expressão relativa de cada gene foi determinada por RT-qPCR. Os experimentos foram realizados em triplicatas e repetidos em três ensaios independentes. Colunas, média; barras, erro padrão; ** $p < 0.001$; * $p < 0.05$, pelo teste *Pair Wise P* (H1).

4.5. Comparação dos genes de interesse em bases de dados de ensaios de *Microarray*

Para efeitos de comparação dos genes diferencialmente expressos após silenciamento do DCD na linhagem G-361 diante outras linhagens de melanoma, foram utilizados os dados de estudos de análise de expressão genica em cinco linhagens de melanoma denominadas: 501 MEL, A375, MALME3M, ML310 e SK-MEL-2. Estes resultados de ensaio de expressão de mRNA por microarray (file CEL) encontram-se disponibilizados no *Cancer Cell line encyclopedia* (CCLE) (Barretina et al. 2013). Nestas análises foram considerados apenas os genes validados pela técnica de qRT-PCR. A comparação dos índices de expressão dos genes da família das histonas entre as sublinhagens (G-361-pLKO, G-361-IBC-I) e as linhagens de melanoma 501 MEL, A375, MALME3M, ML310 e SK-MEL-2 mostrou diferenças consideráveis na expressão destes genes.

A expressão do gene HIST1H2AB foi maior nas sublinhagens G-361-IBC-I e G-361-pLKO ($p < 0.001$), o gene HIST1H1 encontrou-se mais expresso nas linhagens 501 MEL e A375 ($p < 0.05$), e finalmente, a expressão do gene HIST1H2BI foi maior nas linhagens ML310 e SK-MEL-2 ($p < 0.001$).

Figura 14. Comparação da expressão dos genes da família das histonas entre as sublinhagens G-361-pLKO e G-361-IBC-I e as linhagens de melanoma 501 MEL, A375, MALME3M e ML310. Colunas, média; barras, erro padrão; *** $p < 0.001$; ** $p < 0.05$, pelo teste *Pair Wise P* (H1).

Quanto os genes da via de sinalização TNFs/NF- κ B, o gene PP3CB foi o único que apresentou diferenças na expressão, sendo mais expresso nas linhagens 501 MEL ($p<0.001$), A375 ($p<0.05$), MALME3M ($p<0.001$), ML310 ($p<0.001$) e SK-MEL-2 ($p<0.001$). Os outros genes avaliados não apresentaram diferenças significativas na expressão quando comparados entre as linhagens avaliadas.

Figura 15. Comparação da expressão dos genes da via de sinalização TNFs/NF- κ B entre as sublinhagens (G-361-pLKO, G-361-IBC-I) e as linhagens de melanoma 501 MEL, A375, MALME3M e ML310. Colunas, média; barras, erro padrão; *** $p<0.001$; ** $p<0.05$, pelo teste *Pair Wise P* (H1).

4.6. Análise proteômica

4.6.1. Perfil de expressão proteica nos extratos nucleares das sublinhagens G-361 pLKO e IBC-I

Visando a validação de alguns dos processos celulares com a possível participação da DCD e das proteínas identificadas através dos estudos de expressão gênica, em uma segunda etapa deste estudo foram caracterizadas as proteínas presentes nos extratos nucleares obtidos das sublinhagens G-361-pLKO e G-361-IBC-I por método de espectrometria de

massas. Para a realização desta extração, foi adotada a mesma metodologia de extração e fracionamento das proteínas nucleares para identificação de proteínas associadas á ativação de fatores de transcrição NF- κ B por citocinas (Ding *et al*, 1998).

Nos extratos proteicos foram identificadas um total de 107, sendo 74 proteínas da sublinhagem pLKO, e 31 proteínas no extrato da sublinhagem IBC-I (Figura 16). Destas, 21 proteínas estavam presentes em ambas sublinhagens. Os dados gerados pelas ferramentas bioinformáticas (identificação da proteína com código de acesso, PM, pI teórico) estão resumidos no anexo II.

Figura 16. Diagrama de Venn representativo do número de proteínas identificadas em cada extrato nuclear, ou em ambas sublinhagens de células de melanoma G-361.

Entre as proteínas nucleares identificadas encontram-se novamente histonas da família H2A e H2B (pLKO) e H4 (IBC I), além das histonas canônicas, identificamos a variante de histona H3F3B (também conhecida como H3.3B) presente nos dois extratos proteicos. Na figura 17 podemos observar os cromatogramas indicando em vermelho os tempos de retenção onde foram detectadas as histonas.

Figura 17. Cromatogramas das proteínas nucleares das sublinhagens G-361- pLKO e IBC-I por HPLC *nanoflow*. Em vermelho encontram-se indicados os tempos de retenção de peptídeos de interesse.

Nas figuras 18 e 19 apresentam-se os espectros de massa dos íons que identificam as proteínas histonas H2AFJ e HIST1H2BK.

Figura 18. Espectro de massas dos íons das proteínas nucleares presentes na sublinhagem G-361-pLKO para o tempo de retenção 37,33 min.

Figura 19. Espectro de massas dos íons das proteínas nucleares presentes na sublinhagem G-361-pLKO para o tempo de retenção de 30,92 min.

No perfil proteico da amostra de proteínas nucleares da sublinhagem G-361-IBC-I encontramos uma diminuição no número total de proteínas, somente 10 proteínas foram diferencialmente expressas com respeito à amostra controle (total 31). Entre as proteínas descritas encontram-se histonas da família H4 (HIST1H4A), e novamente a histona da família H3 (H3F3B).

Figura 20. Espectro de massas dos íons das proteínas nucleares da sublinhagem G-361-IBC-I para o tempo de retenção 33,22 min.

Figura 21. Espectro de massas dos íons das proteínas nucleares presentes da sublinhagem G-361-IBC-I para o tempo de retenção 10,66 min.

4.7. Análise de redes e processos biológicos formados entre as proteínas nucleares identificadas na sublinhagens

A figura 22 e a Tabela 6 mostram os resultados obtidos da análise de processos biológicos envolvendo a proteína DCD e as proteínas identificadas na sublinhagem G-361-pLKO usando a plataforma STRING 9.1 (Franceschini *et al*, 2013). Notar que um dos centros de integração das interações é TP53.

Figura 22. Rede de interação entre as proteínas identificadas na sublinhagem G-361-pLKO usando a base de dados da plataforma STRING 9.1. Nesta rede estão representadas 34 proteínas das quais 14 foram identificadas nos extratos nucleares e 20 proteínas foram identificadas em outros estudos de interação proteína-proteínas em que a proteína DCD participa. Linhas azuis escuras representam interações diretas e linhas azuis claras finas interações indiretas.

Tabela 6. Processos biológicos mediados pelas proteínas nucleares identificadas na sublinhagem pLKO e proteínas que interagem com a DCD segundo a plataforma STRING.

	Categoria	p-value	Proteínas
1.	Regulação da morte celular	9,5E-03	CDKN1A HSPD1 HSP90B1 S100B USP7 CDKN2A NFKBIA UBC MDM2 ALB
2.	Resposta celular ao estresse	1,39E-03	ASTE1 ALB SUMO1 USP7 TCEA1 AKT1
3.	Regulação do crescimento celular	2,3E-01	TP53 CDKN2A ENO1 CDKN1A

A figura 23 e a tabela 7 mostram os resultados obtidos da análise de processos biológicos mediados pelas proteínas nucleares identificadas na sublinhagem G-361-IBC-I usando a plataforma STRING 9.1. Neste caso, foi excluída da lista a proteína DCD, a rede foi formada por 31 proteínas, sendo 11 proteínas identificadas no extrato nuclear.

Figura 23. Rede de interação entre as proteínas identificadas na sublinhagem G-361-IBC-I usando a plataforma STRING 9.1. Nesta rede estão representadas 31 proteínas das quais 11 foram identificadas nos extratos nucleares e 20 foram identificadas em outros estudos de interação proteína-proteína. A maioria das proteínas não apresenta uma interação direta. Linhas azuis escuras representam interações diretas e linhas azuis claras finas interações indiretas.

Tabela 7. Processos biológicos mediados pelas proteínas nucleares identificadas na sublinhagem G-361-IBCI conforme plataforma STRING.

	Categoria	p-value	Proteínas
1.	Remodelação da cromatina	1,4 E-03	HIST1H4C HIST1H4B HIST4H4 ACTB
2.	Resposta inflamatória e resposta ao estresse	2,13E-03	C3 AZM AHSG SERPINF2
3.	Regulação da adesão célula-célula	7,9E-03	SERPINF2 PLG

5.0. DISCUSSÃO

A identificação e compreensão do papel dos genes alterados no câncer são de fundamental importância para avançarmos na prevenção, diagnóstico e tratamento dos pacientes com terapias mais poderosas e dirigidas a múltiplos alvos. Estudos iniciais mostraram que a proteína DCD é expressa de forma constitutiva por glândulas écrinas onde parece ter função antibiótica no controle de microorganismos da pele (Schitteck *et al*, 2001). Em seguida, vários estudos mostraram que o gene DCD estava hiperexpresso em alguns subtipos de tumores da mama (Porter *et al*, 2003; Markovic, 2003), próstata (Wang *et al*, 2003) e gastrointestinais (Deans *et al*, 2006). Existem fortes indícios de que esta expressão desregulada estaria envolvida na regulação do crescimento celular (Porter *et al*, 2003). Recentemente, foi publicado que o DCD faz parte do grupo de 9 genes que compõem uma assinatura de expressão de genes para o diagnóstico clínico do melanoma humano (Freedman *et al*, 2011; Brunner *et al*, 2013). Porém, o mecanismo pelo qual o DCD exerce atividades na carcinogênese e progressão do câncer ainda é desconhecido.

Baseados nos fatos anteriormente descritos, realizamos um estudo de análise da expressão global de genes expressos por DNA-*Microarray* nas sublinhagens de melanoma G-361-pLKO (controle) e G-361 IBC-I (expressando shiRNA contra o mRNA da DCD), com o intuito de conhecer as implicações do silenciamento do DCD em células com fenótipo maligno e com múltiplas aberrações genéticas, e assim, aproximarmos ao entendimento das vias de sinalização pelas quais o DCD poderia atuar no desenvolvimento e na progressão do melanoma maligno. Observamos 374 genes diferencialmente expressos (DEGs) ($p < 0,05$), sendo 162 genes induzidos e 212 reprimidos. Segundo a análise funcional dos DEGs, os genes que foram induzidos estão principalmente relacionados com os processos de empacotamento do DNA, especificamente com a formação do nucleossomo. Esta categoria funcional foi confirmada por nove genes

codificadores de histonas, dos quais, validamos quatro genes por qRT-PCR (HIST1H1, HIST1H2AB, HIST1H2BA, HIST1H2BI).

Existem cinco famílias de histonas canônicas (H1, H2A, H2B, H3 e H4), cada uma delas é codificada por um grupo diferente de genes. No cromossomo 6 localizam-se os genes codificadores da família H1 e no cromossomo 1, os genes codificadores das famílias H2A, H2B e H3 (Albig *et al*, 1997; Bhasin *et al*, 2006). Os genes codificadores da família H4 estão localizados no cromossomo 12, mesmo cromossomo do DCD, mas em um braço diferente, o 12p12, onde também está localizado o gene K-RAS, que está frequentemente alterado em melanomas (Curtin *et al*, 2005). A cromatina está organizada em unidades básicas, os nucleossomos, que consistem em um centro proteico formado por um octâmero, constituído por duas moléculas das histonas H2A, H2B, H3 e H4, no qual o DNA enrola-se em voltas com aproximadamente 146 pares de bases (Kouzarides, 2007). A estrutura da cromatina desempenha um papel central na regulação genica e em outros processos nucleares, incluindo a replicação do DNA (Berger, 2007). Células em proliferação realizam a síntese de histonas canônicas na fase S do ciclo celular, o que converte a indução de genes codificadores destas histonas em um processo chave durante a transição de G1 para S, estas histonas também são conhecidas como “histonas dependentes da replicação” (Xiaofen *et al*, 2003).

Observou-se, no presente trabalho, aumento significativo da expressão de genes codificadores de histonas canônicas após silenciamento do DCD, especialmente das famílias H2A e H2B (Tabela 1, Figura 11). Os genes que codificam estas famílias de histonas estão localizados em grupos ou “clusters”, que podem conter dezenas de genes. Esta localização em *clusters* levou a pensar que estes genes seriam regulados como um grupo e que poderiam apresentar funções equivalentes (Marzluff *et al*, 2008), porém, estudos recentes mostraram variação da expressão entre genes da mesma família, o que poderia influenciar o desenvolvimento do câncer (Adams *et al*, 2007; Singh *et al*, 2013).

Singh e colaboradores demonstraram diferenças nos níveis de expressão dos genes da família H2A em linhagens celulares de câncer de bexiga e em pacientes com leucemia linfocítica crônica, a expressão da maioria dos genes desta família encontrou-se aumentada quando comparada com os níveis em células normais, porém alguns genes também foram reprimidos. Dentre os genes da mesma família de histonas houve diferença na expressão, por exemplo, o gene HISTH2AE teve maior expressão em comparação com outros genes da família H2A. No mesmo estudo, mediante silenciamento do gene HIST1H2AC na linhagem de osteosarcoma humano U2OS, foi evidenciado aumento na proliferação celular e na tumorigenicidade (Singh *et al*, 2013).

Shann e colaboradores demonstraram também a superexpressão do gene HIST1H2AC em células MCF-7 e em tumores de mama RE+ (receptor de estrogênio positivo) (Shann *et al*, 2008). Recentemente, Su e colaboradores examinaram o papel do HIST1H2AC na tumorigênese da mama em células MCF-7, evidenciando diminuição da proliferação celular e interrupção do ciclo celular na fase G0/G1 após silenciamento do HIST1H2AC. Os mesmos autores sugeriram uma possível regulação do RE α (receptor de estrogênio alfa) mediada pela expressão do HIST1H2AC e a regulação de genes alvo, em particular dos genes BCL-2 e c-MYC (Su *et al*, 2013).

Além da variação na expressão das histonas canônicas, a complexidade da cromatina também pode ser influenciada pelas modificações pós-traducionais (MPTs) nestas proteínas e pela presença de variantes de histona (Henikoff *et al*, 2004). No ano 2000, Strahl e Allis postularam que diferentes MPTs na cauda N-terminal das histonas agiriam em sequência ou em combinação formando um "código de histonas", que uma vez reconhecido teria implicações em distintos eventos celulares, tais como a regulação da replicação e da transcrição, a condensação de cromossomos, o reparo do DNA e a apoptose (Strahl & Allis, 2000).

De modo geral, as MPTs podem resultar em transcrição ou silenciamento gênico através da ação de enzimas capazes de acetilar,

desacetilar ou transferir grupos metil. Vários estudos tem demonstrado que alterações na expressão destas enzimas poderiam levar à carcinogênese (Chen *et al*, 2010). Entre os mecanismos epigenéticos, a acetilação é um dos mecanismos mais estudados, por ser um componente essencial na regulação da estrutura da cromatina e na atividade transcricional (Berdasco *et al*, 2010). As histonas desacetilases (HDACs) catalisam a remoção de grupos acetila das histonas resultando na compactação da cromatina (heterocromatina), silenciando a transcrição por impedir o contato de fatores de transcrição, complexos regulatórios e RNA polimerase com o DNA. A reação inversa, de promoção da transcrição, ocorre por acetilação quando a eucromatina é formada, esta é uma estrutura de conformação mais aberta, que promove o contato com os fatores de transcrição (Berdasco *et al*, 2010).

Lai e colaboradores relataram o silenciamento inapropriado de genes críticos pelas HDACs, o que resultou na inativação de genes supressores de tumor e desta forma, para no desenvolvimento da transformação neoplásica (Lai *et al*, 2012). Baseados nesses fatos, decidimos avaliar a expressão do gene HDAC1 (Histona desacetilase-1) por qRT-PCR na linhagem G-361. Escolhemos este gene, por ser um potente inibidor da acetilação das histonas H3 e H4 e por estar relacionado com a indução da senescência em melanoma (Nikolaou *et al*, 2012).

Foi interessante notar que após silenciamento do gene DCD, houve um aumento significativo na expressão do HDAC1 ($p < 0,05$), o que poderia estar relacionado com o papel do DCD na proliferação celular, sendo que ao aumentar a desacetilação das histonas, a transcrição poderia ser silenciada e consequentemente a proliferação celular e o crescimento tumoral diminuiriam (Figura 12). No entanto, é importante indicar que a manutenção da função celular normal exige um equilíbrio entre a ação das enzimas acetiltransferases de histona (HATs) e histona desacetilases (HDACs), já que, antes as atividades aberrantes destas enzimas podem começar processos de carcinogênese (Masica & Karchin, 2013)

Por outro lado, a análise da lista de genes diferencialmente expressos pela plataforma MetaCore, sugeriu a modulação da via de sinalização APRIL/BAFF após silenciamento do DCD na linhagem G-361 (Figura 9). Nossos resultados mostraram aumento significativo ($p < 0.001$) da expressão dos genes TNFRSF13B (conhecido com TACI, sigla do inglês *Transmembrane Activator and CAML Interactor*) e TNFSF13 (conhecido como APRIL, sigla do inglês *A Proliferation-Inducing Ligand*). A família dos TNFs está intimamente ligada à regulação da morte celular, proliferação, ativação e diferenciação. APRIL é um ligante membro desta família, nomeado assim, pela sua capacidade de estimular a proliferação de células tumorais ligando-se aos receptores BCMA e TACI (Xu *et al*, 2012), este último também regulado positivamente após silenciamento do DCD. Vários estudos demonstraram a superexpressão do gene APRIL em linhagens de células tumorais e em tumores sólidos (Roosnek *et al*, 2009; Kimberley *et al*, 2009; Lemancewicz *et al*, 2013).

Nossos resultados também revelaram a modulação negativa da expressão dos genes TRAF3 e PPP3CB (conhecido como Calcineurin A). A proteína codificada por TRAF3 faz parte da família de fatores associados aos receptores TNF (TRAF, sigla do inglês *TNF receptor associated factor*) e pode participar da ativação da resposta imune e induzir a ativação do NF- κ B (Hauer *et al*, 2005). A análise de vias canônicas realizada na plataforma MetaCore também sugeriu que a principal rede de expressão genica alterada poderia centrar-se no fator de transcrição NF- κ B (Figura 10). Quando comparamos esses dados e os apresentados em diversos trabalhos (Ascierto *et al*, 2010; Yu *et al*, 2011; Song *et al*, 2012) encontramos algumas concordâncias que serão discutidas a seguir. Recentes estudos relatam a importância do NF- κ B como um potencial alvo para o tratamento do melanoma, especificamente por estar envolvido na resposta pró-inflamatória, que é a primeira linha de defesa contra doenças infecciosas e estresse celular, por ser um importante fator anti-apoptótico, que pode induzir transcrição de várias proteínas como Bcl-xL e proteínas TRAF (TRAF1, 2 ou 3) ou induzir inibidores da apoptose, como as proteínas IAP (IAP1 e C-IAP2)

(Hagemann *et al*, 2008; Ferreiro & Komives, 2010; Arbab *et al*, 2012). NF- κ B também pode promover o crescimento celular, aumentando a expressão da ciclina D1, que é um importante regulador da progressão do ciclo celular (Karin & Lin, 2002; Kuo *et al*, 2012). Dada a amplitude dos mecanismos biológicos associados ao NF- κ B, não é surpreendente que no melanoma esta via de sinalização possa estar alterada (Lanaro *et al*, 2009; Kol & Fisher, 2011). Estudos também destacaram a superexpressão de alguns dos componentes da família do NF- κ B, como as proteínas p50 e p65/RelA, em células de melanoma e nevos displásicos quando comparados com melanócitos e nevos normais (McNulty *et al*, 2004; Madonna *et al*, 2012).

Todas estas informações, unidas as produzidas neste estudo, sugerem a necessidade de continuar estudando o papel do NF- κ B no melanoma, para melhor esclarecer o real papel da proteína DCD na ativação ou repressão desta via de sinalização.

Baseados nos resultados discutidos acima, sobre a importância dos genes da família das histonas canônicas, modulação na expressão de genes da via de sinalização APRIL/BAFF e do NF- κ B, realizamos um estudo para a caracterização de proteínas nucleares por espectrometria de massa. Esperávamos como estes estudos confirmar se proteínas codificadas por estes genes estavam sendo expressas nos extratos nucleares obtidos das sublinhagens G-361-pLKO e G-361-IBC-1 e assim confirmar seus papéis nos processos biológicos modulados pela expressão do gene DCD. A superexpressão dos ligantes APRIL e TACI, e consequentemente a ativação do NF- κ B, achávamos que seria possível a identificação de proteínas desta via, como, por exemplo, p50/p65. Contudo, nas análises dos extratos nucleares não conseguimos evidenciar a presença destes membros desta família de proteínas (Anexo 2). Por outro lado, os resultados de caracterização de proteínas nucleares por espectrometria de massas, mostraram mais evidências da participação das histonas em um possível mecanismo de modulação epigênica da cromatina induzido pela DCD.

Nos estudos de expressão de genes por *Microarray* e a posterior validação por qRT-PCR, encontramos que a redução da expressão de DCD leva a superexpressão de genes canônicos de histonas. Na espectrometria de massas também identificamos este tipo de histonas (Figuras 18-21) e também identificamos a variante de histona H3F3B (também conhecida como H3.3B). Na sublinhagem G-361-pLKO foram identificadas as histonas canônicas HIST1H2BK e H2AFJ (Tabela 6), esta última codificada por um gene (com o mesmo símbolo, H2AFJ) descrito por Dee e colaboradores como parte do grupo de 9 genes que compõem uma assinatura gênica da progressão tumoral no melanoma humano, sendo um gene hiperexpresso nas lesões melanocíticas primárias (Dee *et al*, 2005)

Na sublinhagem G-361-IBC-I identificamos a histona canônica HIST1H4A e a histona variante H3F3B (também conhecida como H3.3B), que de fato, também estava expressa no extrato nuclear de G-361- pLKO. Estudos anteriores relataram a incorporação da histona variante H3.3B aos nucleossomos por um mecanismo não dependente da replicação, contrário ao mecanismo de ativação das histonas canônicas (Ahmad & Henikoff, 2002; Loyola *et al*, 2006), esta variante tem sido implicada como potencial mediador da memória epigenética na acetilação e na metilação de histonas (Ejlassi *et al*, 2011). McKittrick e colaboradores demonstraram o papel chave da H3.3B na remodelagem da cromatina (McKittrick *et al*, 2004), e estudos recentes mostraram que alterações frequentes nesta histona, como mutações, estariam relacionadas com o aumento da tumorigenicidade em glioblastoma (Quang *et al*, 2012). Até o presente momento não existem na literatura informações sobre o possível papel desta variante de histona no melanoma, o que seria uma nova temática para investigações futuras.

Como esperado, nossos resultados revelaram que dentre os processos biológicos mediados pelas proteínas identificadas após silenciamento do DCD na sublinhagem G-361-IBC-I, está a remodelação da cromatina (Figura 23, Tabela 7). Também foi identificado o processo da regulação da resposta inflamatória pela presença das proteínas AZM, KRT1, MT2A. A presença destas proteínas do estresse podem dar à célula os

meios para identificar e facilitar a renovação de proteínas denaturadas durante a inflamação e estresse metabólico, como também facilitar a eliminação e re-síntese das proteínas defeituosas (Lawrence *et al*, 2005). Este processo também poderia estar ligado à sinalização TNFs/NF- κ B descrita na análise do *Microarray* após silenciamento do DCD, sendo que NF- κ B desempenha um papel central na progressão de doenças autoimunes e inflamatórias (Strnad & Burke, 2007). A sinalização do NF- κ B pode regular o recrutamento de células através da expressão de moléculas de adesão como a molécula de adesão intercelular-1 (ICAM -1), a produção dependente de citocinas pró-inflamatórias, tais como membros do fator de necrose tumoral (também descritos após silenciamento do DCD) (Viemann *et al*, 2004).

Em resumo, com o silenciamento gênico do DCD na linhagem de melanoma G-361 foi possível demonstrar seu envolvimento na modulação da expressão das histonas. Para o nosso conhecimento, até o presente momento, não existem estudos que avaliaram a influência do DCD em eventos epigenéticos no melanoma humano. Nossos resultados nos possibilitaram sugerir que futuros estudos sobre a expressão das histonas (canônicas e variantes) e suas modificações pós-traducionais poderão desvendar o possível papel da DCD na regulação epigenética do melanoma e em outros tipos de cânceres. Por outro lado, o silenciamento do DCD também poderia estar envolvido na regulação de expressão de genes da via de sinalização APRIL/ BAFF e, por conseguinte na sinalização do TNFs/NF- κ B, uma via que vem sendo estudada em muitas pesquisas pela importância na progressão do melanoma e como futuro alvo no tratamento da doença.

6.0. CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos podemos sugerir que o silenciamento do gene DCD:

- 1- Altera o perfil de expressão de genes envolvidos na transformação maligna do melanoma;
- 2- Pode regular a expressão de genes codificadores de histonas e possivelmente de proteínas que participam da regulação do empacotamento e transcrição do DNA;
- 3- Pode modular diferencialmente a expressão de mensageiros dos receptores e ligantes da via de sinalização APRIL/BAFF e consequentemente a via de ativação do NF- κ B;
- 4- Pode regular a expressão de proteínas envolvidas nos processos de morte celular e resposta ao estresse oxidativo.

7.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams, P.D. Remodeling of chromatin structure in senescent cells and its potential impact on tumor suppression and aging. *Gene*, 2007. 397: p. 84-93.

Ahmad, K., et al. The histone variant H3.3 marks active chromatin by repliation-independent nucleosome assembly. *Mol Cell*, 2002. 9: p. 1191-200.

Albig, W., et al. Human histone gene organization: nonregular arrangement within a large cluster. *Genomics*, 1997. 40: p. 314-22.

Arbab, I.A., et al. Dentatin induces apoptosis in prostate cancer cells via Bcl-2 and NF-kappaB Inhibition. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012. 13: p. 85.

Ascierto, P.A., et al. Melanoma: a model for testing new agents in combination therapies. *J Transl Med*, 2010. 8: p. 38.

Bardeesy, N., et al. Role of epidermal growth factor receptor signaling in RAS-driven melanoma. *Mol Cell*, 2005. 25: p. 4176-88.

Baselga, J. and S. Swain. Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3. *Nature Ver*, 2009. 9: p. 463-75.

Basu, S., et al. CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90,hsp70, and calreticulin. *Immunity*, 2001. 14(3): p. 303-13.

Belizário, J.E., et al. Bioactivity of skeletal muscle proteolysis-inducing factor in the plasma proteins from patients with weight loss. *Br J Cancer*, 1991. 64: p. 705-10.

Berdasco, M. and M. Esteller. Aberrant epigenetic landscape in cancer: how cellular identity goes awry. *Developmental Cell*, 2010. 19(5): p. 698-711.

Berger, S.L. The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature*, 2007. 447: p. 407-12.

Bhasin, M., et al. Recognition and classification of histones using support vector machine. *J Comput Biol*, 2006. 13: p. 102-12.

Borges, J.D. Avaliação das alterações morfológicas e bioquímicas no músculo esquelético durante a caquexia induzida pelo tumor B16-PIF. (Dissertação de mestrado). 2006. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Brunner, G., et al. A nine-gene signature predicting clinical outcome in cutaneous melanoma. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2013. 13(92): p. 249-58.

Cheang, M.C.U., et al. Gene expression profiling of breast cancer. *Ann Rev Pathol Mech Dis*, 2008. 3: p. 67-97.

Chin, K., et al. Genomic and transcriptional aberrations linked to breast cancer pathophysiologies. *Cancer Cell*, 2006. 10: p. 529-41.

Citri, A. and Y. Yarden. EGF-ERBB signaling: towards the systems level. *Nature Rev Mol Cell Biol*, 2006. 7: p. 505-16.

Cunningham, T.J., et al. Identification of a survival-promoting peptide in medium conditioned by oxidatively stressed cell lines of nervous system origin. *J Neurosci*, 1998. 18: p. 7047-60.

Cunningham, T.J., et al. Identification of the human cDNA for new survival evasion peptide (DSEP): studies in vitro and in vivo of overexpression by neural cells. *Exp Neurol*, 2002. 177: p. 32-9.

Curtin, J.A., et al. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Eng J Med*, 2005. 353: p. 2135-47.

Deans C., et al. Host cytokine genotype is related to adverse prognosis and systemic inflammation in gastro-oesophageal cancer. *Ann Surg Oncol*, 2007. 14: p 329–39.

Dee, N.J., et al. Analysis of differential gene expression in human melanocytic tumour lesions by custom made oligonucleotide arrays. *Br J Cancer*, 2005. 92: p. 2249-61.

Ding, G.J., et al. Characterization and quantitation of NF- κ B nuclear translocation induced by interleukin-1 α and tumor necrosis factor- α . *J Biol Chem*, 1998. 273: p. 28897-28905.

Djerf, E.A., et al. ErbB receptor tyrosine kinase contribute to proliferation of malignant melanoma cells: inhibition by gefitinib (ZD1839). *Melanoma Res*, 2009. 19: p. 156-66.

Ejlassi-Lassalette, A., et al. H4 replication-dependent diacetylation and Hat1 promote S-phase chromatin assembly in vivo. *Mol Biol Cell*, 2011. 22: p. 245-55.

Elkins, S., et al. Pathways mapping tools for analysis of high content data. *Meth Mol Biol*, 2007. 356: p. 319-50.

Feinberg, A.P., et al. The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nature Rev Genetics*, 2006. 7(1): p. 21-33.

Ferreiro, D.U. and E.A. Komives. Molecular mechanisms of system control of NF-kappaB signaling by IkappaBalpha. *Biochemistry*, 2010. 49: p. 1560-1567.

Fontes de Oliveira, C.C. Efeitos biológicos do PIF/DCD (proteolysis-inducing factor/dermcidin) durante o crescimento e diferenciação celular. (Dissertação de Mestrado), 2005. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Franceschini, A., et al. STRING v9.1: protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration. *Nucleic Acids Res*, 2013 (Database issue): p. D808-15.

Freedman, J.A., et al. Use of gene expression and pathway signatures to characterize the complexity of human melanoma. *Am J Pathol*, 2011. 178: p. 2513-21.

Garay, M. Clonagem, expressão e estudo funcional do proteolysis-inducing factor (PIF). (Tese de Doutorado), 2005. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Gordon-Thomson, C., et al. ErbB receptors mediate both migratory and proliferative activities in human melanocytes and melanoma cells. *Mel Res*, 2005. 15 (1): p. 21-8.

Hagemann, T., et al. 'Re-educating' tumor-associated macrophages by targeting NF-kappaB. *J Exp Med*, 2008. 205: p. 1261–8.

Hanahan, D. and R.A. Weinberg. The hallmarks of cancer. *Cell*, 2000. 100: p. 57-70.

Hanahan, D. and R.A. Weinberg. The hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 2011. 144: p. 646-74.

Hauer, J., et al. TNF receptor (TNFR)-associated factor (TRAF) 3 serves as an inhibitor of TRAF2/5-mediated activation of the noncanonical NF-kappaB pathway by TRAF-binding TNFRs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005. 102: p. 2874-9.

Henikoff, S., et al. Histone variants, nucleosome assembly and epigenetic inheritance. *Trends Genet*, 2004. 20: p. 320-6.

Hipfel, R., et al. Specifically regulated genes in malignant melanoma tissues identified by subtractive hybridization. *Br J Cancer*, 2000. 82(6): p. 1149-57.

Hu, M., et al. Regulation of in situ to invasive breast carcinoma transition. *Cancer Cell*, 2008. 13: p. 394-406.

Huang, D.W., et al. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID Bioinformatics Resources. *Nature Protoc*, 2009. 4(1): p. 44-57.

INCA. Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil. 2011: Rio de Janeiro.

Jelonek, K., et al. Association between single-nucleotide polymorphisms of selected genes involved in the response to DNA damage and risk of colon, head and neck, and breast cancers in a Polish population. *Journal Applied Genetics*, 2010. 51(3): p. 343-52.

Junttila, T.T., et al. Ligand-independent HER/HER3/PI3K complex is disrupted by trastuzumab and is effectively inhibited by the PI3K inhibitor GDC-0941. *Cancer Cell*, 2009. 15: p. 429-40.

Karin, M., et al. NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol*, 2002. 3: p. 221-7.

Kauraniemi, P. and A. Kallioniemi. Activation of multiple cancer-associated genes at the ERBB2 amplicon in breast cancer. *Endocrine-Related Cancer*, 2006. 13: p. 39-49

Kimberley, F.C., et al. APRIL in B-cell malignancies and autoimmunity. *Results Probl Cell Differ*, 2009. 49: p. 161-82.

Kol, J.M. and D.E. Fisher. A new era: melanoma genetics and therapeutics. *J Pathol*, 2011. 223: p. 241-50.

Kouzarides, T. Chromatin modifications and their function. *Cell*, 2007. 128: p. 693-705.

Kroemer, G., et al. Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell*, 2010. 40: p. 280-93.

Krusche, C.A., et al. Histone deacetylase-1 and 3 protein expression in human breast cancer: a tissue microarray analysis. *Breast Cancer Res Treat*, 2005. 90: p. 15-23.

Kuo, S.H., et al. Expression of BCL10 in cervical cancer has a role in the regulation of cell growth through the activation of NF-kB-dependent cyclin D1 signaling. *Gynecol Oncol*, 2012. 126: p. 245-51.

Lai, F., et al. Histone deacetylases (HDACs) as mediators of resistance to apoptosis in melanoma and as targets for combination therapy with selective BRAF inhibitors. *Adv Pharmacol*, 2012. 65: p. 27-43.

Lanaro, A., et al. NEMO-binding domain peptide inhibits proliferation of human melanoma cells. *Cancer Lett*, 2009. 274: p. 331-6.

Lawrence, T., et al. IKK alpha limits macrophage NF-kappa B activation and contributes to the resolution of inflammation. *Nature*, 2005. 434: p. 1138-43.

Lemancewicz, D., et al. Evaluation of TNF superfamily molecules in multiple myeloma patients: Correlation with biological and clinical features. *Leukemia Research*, 2013. 37: p. 1089-93.

Li Cheng and Wing Hung. Model-based analysis of oligonucleotide arrays: Expression index computation and outlier detection, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2001. 98: p. 31-36.

Liu, W., et al. A new 12-gene diagnostic biomarker signature of melanoma revealed by integrated microarray analysis. *Peer J*, 2013. 1: p. 49.

Livak, K.J. and T.D. Schmittgen. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the CT ($2^{-\Delta\Delta CT}$) method. *Methods*, 2001. 25(4): p. 402-8.

Loeb, L.A., et al. Cancers exhibit a mutator phenotype: clinical implications. *Cancer Res*, 2008. 68(10): p. 3551-7.

Lowrie, A.G., et al. Dermcidin expression in hepatic cells improves survival without N-glycosylation, but requires asparagine residues. *Br J Cancer*, 2006. 94(11): p. 1663-71.

Loyola, A., et al. PTMs on H3 variants before chromatin assembly potentiate their final epigenetic state. *Mol Cell*, 2006. 24: p. 309-16.

Madonna, G. et al. NF- κ B as potential target in the treatment of melanoma. *J Transl Med*, 2012. 10: p. 53.

Majczak, G.A.H. Caracterização estrutural da proteína recombinante rhPIF/DICD (Proteolysis Inducing-Factor/Dermcidin). (Tese de Doutorado em Farmacologia), 2005. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo.

Majczak, G.A., et al. Prediction and biochemical characterization of intrinsic disorder in the structure of human proteolysis-inducing factor/dermcidin protein. *Genet Mol Res*, 2007. 6(4): p. 1000-1011.

Malik, H.S. and S. Henikoff, Phylogenomics of the nucleosome. *Nat Struct Biol*, 2003. 10: p. 882-91.

Mareel, M. and A. Leroy. Clinical, cellular and molecular aspects of cancer invasion. *Physiology Review*, 2003. 83: p. 337-76.

Markovic, J. Expressão gênica do fator indutor de proteólise (PIF) e de sua forma variante (PIF-SV) em células normais e malignas. (Dissertação de Mestrado), 2003. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.

Markovic. J., et al. Dermcidin exerts its oncogenic effects in breast cancer via modulating ERBB signaling. *Breast Cancer Res* (em análise).

Marzluff, W.F., et al. Metabolism and regulation of canonical histone mRNAs: life without a poly(A) tail. *Nat Rev Genet*, 2008. 9: p. 843–54.

Masica, D. and R. Karchin. Collections of simultaneously altered genes as biomarkers of cancer cell drug response. *Cancer Res*, 2013. 73: p. 1699-708.

McNulty, S.E., et al. Comparative expression of NFκB proteins in melanocytes of normal skin vs benign intradermal naevus and human metastatic melanoma biopsies. *Pigment Cell Res*, 2004.17: p. 173-180.

McKittrick, E., et al. Histone H3.3 is enriched in covalent modifications associated with active chromatin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004.101: p. 1525–30.

McKown, R.L., et al. Lacritin and other proteins of the lacrimal function unit. *Exp. Eye Res*, 2008. 86: p. 1000-11.

Minami, Y., et al. Immuno-histochemical staining of cutaneous tumours with G-81, a monoclonal antibody to dermcidin. *Br J Dermatol*, 2004. 151: p. 165-169.

Monitto, L.C., et al. Characterization of a human homologous of proteolysis-inducing factor and its role in cancer cachexia. *Clin Can Res*, 2004. 10: p. 5962-5869.

Moreira, D.F. Redução do crescimento e resistência celular de carcinoma mamário após silenciamento do gene PIF/DCD (proteolysis-inducing-factor/dermcidin) via expressão shRNA. (Dissertação de Mestrado), 2008. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Moreira, D.F. Avaliação de genes envolvidos na via de sinalização induzida pela proteína dermcidina no câncer de mama. (Tese de Doutorado), 2012. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.

Moreira, D.F., et al. Genes up and down regulated by dermcidin in breast cancer: a microarray analysis. *Genet Mol Res*, 2008. 7(4): p. 925-32.

Mori, M., et al. Cancer cachexia syndrome developed in nude mice bearing melanoma cells producing leukemia-inhibitory factor. *Cancer Res*, 1991. 51: p. 6656-6659.

Motoyama, J-P.L., et al. Identification of dermcidin in human gestational tissue and characterization of its proteolytic activity. *Biochem Bioph Res Commun*, 2007. 357(4): p. 828-837.

Muraoka-Cook, R.S., et al. Earp III S. ErbB4/HER4: role in mammary gland development, differentiation and growth inhibition. *Mamm Gland Biol Neoplasia*, 2008. 13: p. 235-46.

Nelson, A.A. and H. Tsao. Melanoma and genetics. *Clin Dermatol*, 2009. 27(1): p. 46-52.

Neve, R.M., et al. A collection of breast cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell*, 2006. 10: p. 515-27.

Nikolaou, V.A., et al. Melanoma: new insights and new therapies. *J Invest Dermatol*, 2012. 132: p. 854-63.

Nikolsky, Y., et al. Wide functional synergy between Amplified and Mutated Genes in Human Breast Cancer. *Cancer Res*, 2008. 68(22): p. 9532-40.

Paige, A.J. Redefining tumour suppressor genes: exceptions to the two-hit hypothesis. *Cell Molecular Life Science*, 2003. 60(10): p. 2147-2163.

Peterson, C.L., et al. Histones and histone modifications. *Curr Biol*, 2005. 14(4): p. 546-551.

Pfaffl, M.W., et al. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time. *PCR*, 2002. 30(9): p. 1-10.

Polyak, K. Breast cancer: origins and evolution. *J Clin Invest*, 2007. 117: p. 3155-3163.

Polyak, K., et al. Co-evolution of tumor cells and their microenvironment. *Trends Genet*, 2008. 25: p. 30-38.

Porter, D., et al. Molecular markers in ductal carcinoma in situ of the breast. *Mol Cancer Res*, 2003. 1: p. 362-375.

Porter, D., et al. A neural survival factor is a candidate oncogene in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci*, 2003. 100(19): p. 10931-10936.

Quang, D.A., et al. Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma. *Nature*, 2012. 482: p. 226-231.

Romero, I., et al. The tumour suppressor Fhit positively regulates MHC class I expression on cancer cells. *J Pathol*, 2012. 227: p. 337-367.

Roosnek, E., et al. Tumors that look for their springtime in APRIL. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2009. 72: p. 91-7.

Sagawa, K., et al. Production and characterization of a monoclonal antibody for sweat-specific protein and its application for sweat identification. *Int J Legal Med*, 2003. 117: p. 90-5.

Sambrook, J., et al. Molecular Cloning: A laboratory Manual. Cold Spring Harbor Press, 1989. Cold Spring, NY.

Schartl, M., et al. A mutated EGFR is sufficient to induce malignant melanoma with genetic background-dependent histopathologies. *J Invest Derm*, 2012.130: p. 249-258.

Schittek, B., et al. Dermcidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands. *Nat Immunol*, 2001. 2(12): p. 1133-1137.

Shann, Y.J., et al. Genome-wide mapping and characterization of hypomethylated sites in human tissues and breast cancer cell lines. *Genome Res*, 2008.18: p. 791-801.

Shipsitsin, M., et al. Molecular definition of breast tumor heterogeneity. *Cancer Cell*, 2007.11: p. 259-273.

Singh, R., et al. Increasing the complexity of chromatin: functionally distinct roles for replication-dependent histone H2A isoforms in cell proliferation and carcinogenesis. *Nucleic Acids Research*, 2013. 41: p. 9284-9295.

Soengas, M.S. and S.W. Lowe. Apoptosis and melanoma chemoresistance. *Oncogene*, 2003. 22: p. 3138–3151.

Song, J.K., et al. Deficiency of C-C chemokine receptor 5 suppresses tumor development via inactivation of NF-kappaB and upregulation of IL-1Ra in melanoma model. *PLoS One*, 2012.7: p 337-347.

Strnad, J. and J.R Burke. Ikappa B kinase inhibitors for treating autoimmune and inflammatory disorders: potential and challenges. *Trends Pharmacol Sci*, 2007. 28: p. 142-148.

Stewart, G.D., et al. The dermcidin gene in cancer: role in cachexia, carcinogenesis and tumor cell survival. *Cur Opin Clin Nutrit Metab Care*, 2008. 11: p. 208-213.

Strahl, B.D. and C.D. Allis. The language of covalent histone modifications. *Nature*, 2000. 403: p. 41-45

Su, Chia-Hs., et al. An H2A histone isotype regulates estrogen receptor target genes by mediating enhancer-promoter-3'-UTR interactions in breast cancer cells. *Nucleic Acids Research*, 2013. 10: p 1093.

This, A., et al. Clinically proven markers of metastasis predict metastatic spread of human melanoma cells engrafted in scid mice. *Br J Cancer*, 2007. 96: p. 609-616.

Tímar, J., et al. Gene signature of the metastatic potential of cutaneous melanoma: too much for too little? *Clin Exp Metastasis*, 2010. 27(6): p. 371-387.

Todorov, P., et al. Characterization of cancer cachetic factor. *Nature*, 1996. 379: p. 739-742.

Viemann, D., et al. Transcriptional profiling of IKK2/NF-kappa B- and p38 MAP kinase-dependent gene expression in TNF-alpha-stimulated primary human endothelial cells. *Blood*, 2004. 103: p. 3365-3373.

Vogelstein, B. and K.W. Kinzler. Cancer genes and the pathways they control. *Nature Med*, 2004. 10(8): p. 789-799.

Wang, Z., et al. Expression of the human cachexia-associated protein in prostate cancer and in a prostate cancer animal model of cachexia. *Int J Cancer*, 2003. 105: p: 123-129.

Weinberg, R.A., A Biologia do Câncer. Editora Artmed, 2008, Porto Alegre. Edição 2008.

Wieland, B.M., et al. Is there a human homologue to the murine proteolysis-inducing factor? *Clin Cancer Res*, 2007. 13: p. 4984-4992.

Xiaofen, Y., et al. Defective S phase chromatin assembly causes DNA damage, activation of the S phase checkpoint, and S phase arrest. *Mol. Cell*, 2003. 11: p. 341–351.

Xu, J., et al. Transcription of promoter from the human APRIL gene regulated by Sp1 and NF- κ B. *Neoplasia*, 2012. 59(3): p. 341-7.

Yeang, C.H., et al. Combinatorial patterns of somatic gene mutation in cancer, *FASEB J*, 2008. 22(8): p. 262-265.

Yu, X., et al. Pattern recognition scavenger receptor CD204 attenuates Toll-like receptor 4-induced NF-kappaB activation by directly inhibiting ubiquitination of tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factor 6. *J Biol Chem*, 2011. 286: p.18795-18806.

Anexo I

LISTA DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM CELULAS G-361 EXPRESSANDO shRNA CONTRA O DCD

PROBE AFFIMETRIX	Gene Symbol	Gene Name	PLKO	IBCI	fold change
7892685	USP22	Ubiquitin Specific Peptidase 22 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	9208,65	415,08	-22,19
7893157	NBEAL1	Neurobeachin-Like 1 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	15.17	1.00	-15,17
7892570	NPM1	Nucleophosmin (Nucleolar Phosphoprotein B23, Numatrin)	17.31	1.15	-15,05
7893766	SNORD18C	Small Nucleolar RNA, C/D Box 18C [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	13.00	1.00	-13
7892598	NARS	Asparaginyl-Trna Synthetase [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	11.40	1.00	-11,4
7893193	PSMB2	Proteasome (Prosome, Macropain) Subunit, Beta Type, 2 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	32.00	3.00	-10,67
8063408	PTPN1	Protein Tyrosine Phosphatase, Non-Receptor Type 1 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	10.47	1.00	-10,47
7893108	TARDBP	TAR DNA Binding Protein [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	10.00	1.00	-10
7893320	FNTA	Farnesyltransferase, CAAX Box, Alpha [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	9.49	1.00	-9,49
8006502	POTEA	POTE Ankyrin Domain Family, Member A [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	8.42	1.00	-8,42
100302742	RNU6-42	U6 Small Nuclear 42	17.1	2.03	-8,34
7976838	MIR376C	MIR376C Microrna 376c [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	17.08	2.05	-8,33
7892806	HNRNPC	Heterogeneous Nuclea Ribonucleoprotein C (C1/C2)	19.19	2.38	-8,07
7892646	EIF3D	Eukaryotic Translation Initiation Factor 3, Subunit D	8.04	1.00	-8,04
7896712	LAMP3	Lysosomal-Associated Membrane Protein 3 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	48.00	6.00	-8
7927924	STOX1	Storkhead Box 1 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	7.89	1.00	-7,89
7892787	IK	IK Cytokine, Down-Regulator Of HLA II	7.53	1.00	-7,53
8065853	TRPC4AP	Transient Receptor Potential Cation Channel, Subfamily C, Member 4 Associated Protein [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	16.56	2.32	-7,14
8069448	CCDC73	Coiled-Coil Domain Containing 73 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	71.43	10.01	-7,13
8047559	PCDH9	Protocadherin 9 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	6.73	1.00	-6,73
8119241	ZNF292	Zinc Finger Protein 292 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	34.69	5,32	-6,53
7971642	WIPF2	WAS/WASL Interacting Protein Family, Member 2 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	6.40	1	-6,4
7932960	AP2A2	Adaptor-Related Protein Complex 2, Alpha 2 Subunit [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	14.80	2,45	-6,04
8096075	SLC16A1	Solute Carrier Family 16, Member 1 (Monocarboxylic Acid Transporter 1) [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	8.17	1,35	-6,03
7895244	PLCB1	Phospholipase C, Beta 1 (Phosphoinositide-Specific) [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	6.00	1	-6

8121485	TAF1D	TATA Box Binding Protein (TBP)-Associated Factor, RNA Polymerase I, D, 41kda [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	30.76	5.31	-5,8
7896529	GUK1	Guanylate Kinase 1 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	34.59	6.07	-5,7
7939420	JAK2	Janus Kinase 2 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	5.69	1.00	-5,69
8048896	FBXO36	FBXO36 F-Box Protein 36 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	11.24	2.02	-5,56
8173922	RNF13	Ring Finger Protein 13 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	6.09	1.10	-5,54
7894429	HSP90AB4P	Heat Shock Protein 90kda Alpha (Cytosolic), Class B Member 4, Pseudogene [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	16.09	2.93	-5,5
8011009	LRCH2	Leucine-Rich Repeats And Calponin Homology (CH) Domain Containing 2 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	678.02	124.52	-5,45
8165672	ZNF804B	Zinc Finger Protein 804B [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	54.29	10	-5,4
8089287	PHF14	PHD Finger Protein 14 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	17.66	3.28	-5,38
8155246	ZCCHC7	Zinc Finger, CCHC Domain Containing 7 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	610.97	116.38	-5,25
7892813	RHOA	Ras Homolog Family Member A [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	5.20	1.00	-5,2
8151211	CPA6	Carboxypeptidase A6 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	7.11	1.37	-5,18
8095564	CDK6	Cyclin-Dependent Kinase 6 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	15.05	2.92	-5,16
	TRAV14DV4	T Cell Receptor Alpha Variable 14/Delta Variable 4	20.04	3.98	-5,08
7892866	CANX	Calnexin [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	6.76	1.34	-5,05
7982062	SNORD115	Small Nucleolar RNA, C/D Box 115 Cluster [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	11.76	2.34	-5,04
7954490	DYNC2H1	Dynein, Cytoplasmic 2, Heavy Chain 1 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	9.45	1.91	-4,96
7895429	RPL4	Ribosomal Protein L4 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	18.34	3.72	-4,94
7892571	GDI2	GDP Dissociation Inhibitor 2 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	9.96	2.10	-4,75
7892804	SNX3	Sorting Nexin 3 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	36.02	7.61	-4,73
7964627	PREX2	Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphate-Dependent Rac Exchange Factor 2 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	4.72	1.00	-4,72
7893287	DDX39B	DDX39B DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) Box Polypeptide 39B [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	29.07	6.24	-4,66
7894974	HINT1	Histidine Triad Nucleotide Binding Protein 1 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	4.54	1.00	-4,54
8031680	AQP9 a	Quaporin 9 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	6.17	1.38	-4,48
8106929	MIPEP	Mitochondrial Intermediate Peptidase [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	24.81	5.54	-4,47
8081034	CUL4B	Cullin 4B [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	15.25	3.47	-4,39
7893211	TCEB2	Transcription Elongation Factor B (SIII), Polypeptide 2 (18kda, Elongin B) [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	10.85	2.49	-4,35
7925611	TFB2M	Transcription Factor B2, Mitochondrial [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	275.16	63.34	-4,34
8105645	EDA	Ectodysplasin A [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	5.08	1.18	-4,3
7918753	OPRM1	Opioid Receptor, Mu 1 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	29.20	6.82	-4,28
7912531	XPNPEP3	X-Prolyl Aminopeptidase (Aminopeptidase P) 3, Putative [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	22.30	5.28	-4,22

8030292	DKKL1	Dickkopf-Like 1 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	502.27	121.08	-4,15
7960848	SLC27A2	Solute Carrier Family 27 (Fatty Acid Transporter), Member 2 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	11.14	2.74	-4,07
8062693	TRAF3	TNF Receptor-Associated Factor 3 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	20.02	4.93	-4,06
7901948	EFCAB7	EF-Hand Calcium Binding Domain 7 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	17.72	4.40	-4,02
7981953	SNORD116-8	Small Nucleolar RNA, C/D Box 116-8	7.60	1.85	-3,94
7928328	MCU	Mitochondrial Calcium Uniporter [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	3.90	1.00	-3,9
7893071	PRPF8	PRP8 Pre-Mrna Processing Factor 8 Homolog (S. Cerevisiae) [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	689.68	180.47	-3,82
8097034	HDX	Highly Divergent Homeobox [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	16.28	4.28	-3,8
8130578	NORA20	Small Nucleolar RNA, H/ACA Box 20 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	66.86	17.58	-3,8
7894214	RPS24	Ribosomal Protein S24 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	930.21	245.37	-3,79
7948879	STX5	Syntaxin 5 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	3.73	1.00	-3,73
7950724	ARID2	AT Rich Interactive Domain 2 (ARID, RFX-Like) [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	3.92	1.08	-3,62
7934154	CRADD	CASP2 And RIPK1 Domain Containing Adaptor With Death Domain [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	733.00	213.55	-3,43
7949742	ZBTB44	Zinc Finger And BTB Domain Containing 44 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	7.19	2.10	-3,43
8111415	ADAMTS12	ADAM Metalloproteinase With Thrombospondin Type 1 Motif, 12 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	9.46	2.81	-3,37
8058496	TBL1XR1	Transducin (Beta)-Like 1 X-Linked Receptor 1 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	429.44	127.93	-3,36
8023547	GABRG3	Gamma-Aminobutyric Acid (GABA) A Receptor, Gamma 3 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	8.28	2.48	-3,34
8112664	RAB3GAP1	RAB3 Gtpase Activating Protein Subunit 1 (Catalytic) [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	7.62	2.30	-3,31
7973838	NUBPL	Nucleotide Binding Protein-Like [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	10.95	3.32	-3,3
7895294	ILF2	Interleukin Enhancer Binding Factor 2 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	13.00	4.00	-3,25
8151585	ZNF616	Zinc Finger Protein 616 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	5.12	1.59	-3,23
8099302	MIR95	Microrna 95 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	5.21	1.62	-3,21
7937079	BNIP3	BCL2/Adenovirus E1B 19kda Interacting Protein 3 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	217.96	68.26	-3,19
8036954	ADCK4	Aarf Domain Containing Kinase 4 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	21.06	6.60	-3,19
8035937	ANKRD27	Ankyrin Repeat Domain 27 (VPS9 Domain) [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	50.26	15.78	-3,18
7895204	ATP6V0E1	Atpase, H+ Transporting, Lysosomal 9kda, V0 Subunit E1 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	23.74	7.54	-3,15
7944363	PPP2R2A	Protein Phosphatase 2, Regulatory Subunit B, Alpha [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	784.27	248.86	-3,15
8111666	MYO1E	Myosin IE [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	318.81	101.27	-3,15
8165932	TBL1X	Transducin (Beta)-Like 1X-Linked [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	101.53	32.46	-3,13

8044735	MYRIP	Myosin VIIA And Rab Interacting Protein [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	18.51	5.96	-3,11
8173928	ZNF565	Zinc Finger Protein 565 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	9.54	3.08	-3,1
8115010	SH3TC2	SH3 Domain And Tetratricopeptide Repeats 2 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	12.32	3.99	-3,09
8081113	BASP1	Brain Abundant, Membrane Attached Signal Protein 1 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	99.70	32.74	-3,05
7892844	C1D	C1D Nuclear Receptor Corepressor [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	107.97	35.80	-3,02
7905254	NUP210L	Nucleoporin 210kda-Like [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	289.01	95.69	-3,02
7895606	HNRNPA1P7	Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A1 Pseudogene 7 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	41.60	13.82	-3,01
8117653	ZKSCAN8	Zinc Finger With KRAB And SCAN Domains 8 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	251.34	83.49	-3,01
7893484	C19orf12	Chromosome 19 Open Reading Frame 12 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	17.00	6.00	-2,83
8023755	DGUOK	Deoxyguanosine Kinase [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	42.10	15.23	-2,76
7956399	FANCD2	Fanconi Anemia, Complementation Group D2 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	11.86	4.31	-2,75
8094897	LACE1	Lactation Elevated 1 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	44.77	16.58	-2,7
7898723	CELA3A	Chymotrypsin-Like Elastase Family, Member 3A [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	1210.18	451.15	-2,68
8013567	C17orf108	Chromosome 17 Open Reading Frame 108	6.27	2.44	-2,66
8174134	TCEAL6	Transcription Elongation Factor A (SII)-Like 6	12.11	4.61	-2,63
7893355	DOT1L	DOT1-Like, Histone H3 Methyltransferase [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	78.00	30.00	-2,6
8132843	HAUS6	HAUS Augmin-Like Complex, Subunit 6 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	2,85	1.15	-2,45
8020058	NDUFV2	NADH Dehydrogenase (Ubiquinone) Flavoprotein 2, 24kda	39.73	16.38	-2,43
8046680	PLEKHA3	Pleckstrin Homology Domain Containing, Family A (Phosphoinositide Bind	6.80	2.82	-2,41
7894529	ATP6V0B	Atpase, H+ Transporting, Lysosomal 21kda, V0 Subunit B [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	2,4	1.00	-2,4
7969933	RNY5	RNA, Ro-Associated Y5	112.75	49.61	-2,27
7973221	TRAV13-2	T Cell Receptor Alpha Variable 13-2	58.10	26.25	-2,21
7910398	SPHAR	S-Phase Response (Cyclin Related)	30.18	14.15	-2,13
7973221	TRAV10	T Cell Receptor Alpha Variable 10	17.00	8.00	-2,13
7916969	MIR186	Microrna 186	37.53	18.28	-2,05
8082261	ROPN1B	Ropporin, Rophilin Associated Protein 1B	117.62	57.56	-2,04
8057803	TMEFF2	Transmembrane Protein With EGF-Like And Two Follistatin-Like Domains 2	33.09	16.45	-2,01
8132960	SNORA22	Small Nucleolar RNA, H/ACA Box 22	73.22	36.45	-2,01
8132803	CDC14C	CDC14 Cell Division Cycle 14	30.46	14.78	-2
7942998	FOLH1B	Folate Hydrolase 1B	545.63	273.52	-1,99
8036969	CYP2A6	Cytochrome P450, Family 2, Subfamily A, Polypeptide 6	19.02	9.69	-1,94

7977058	SNORA28	Small Nucleolar RNA, H/ACA Box 28	31.14	16.28	-1,91
7961182	KLRC2	Killer Cell Lectin-Like Receptor Subfamily C, Member 2	50.01	26.27	-1,9
7944006	RBM7	RNA Binding Motif Protein 7	33.10	17.47	-1,9
8180306	WDR82	WD Repeat Domain 82	76.63	40.88	-1,87
8005501	FAM18B1	Family With Sequence Similarity 18, Member B1	4.29	2.31	-1,86
7921713	TSTD1	Thiosulfate Sulfurtransferase (Rhodanese)-Like Domain Containing 1	52.42	28.38	-1,85
7970595	C1QTNF9	C1q And Tumor Necrosis Factor Related Protein 9	4.55	2.48	-1,83
8108713	PCDHB8	Protocadherin Beta 8	7.98	4.37	-1,83
8078330	RBMS3	RNA Binding Motif, Single Stranded Interacting Protein 3	1072.90	586.98	-1,83
8130567	SNORA29	Small Nucleolar RNA, H/ACA Box 29	35.42	19.40	-1,83
8139935	TYW1B	Trna-Yw Synthesizing Protein 1 Homolog B (S. Cerevisiae)	11.10	6.07	-1,83
7905374	PIPSL	PIP5K1A And PSMD4-Like	422.81	232.90	-1,82
8162019	KIF27	Kinesin Family Member 27	15.75	8.65	-1,82
7946015	OR51A2	Olfactory Receptor, Family 51, Subfamily A, Member 2	110.43	61.17	-1,81
8030351	SNORD34	Small Nucleolar RNA, C/D Box 34	50.73	28.10	-1,81
8096109	MRPS18C	Mitochondrial Ribosomal Protein S18C	39.84	22.46	-1,76
7934278	P4HA1	Prolyl 4-Hydroxylase, Alpha Polypeptide I	5.42	3.05	-1,76
8059689	SNORD20	Small Nucleolar RNA, C/D Box 20	139.60	80.32	-1,75
7930882	FAM45B	Family With Sequence Similarity 45, Member A Pseudogene	8.23	4.68	-1,75
7926715	GPR158	G Protein-Coupled Receptor 158	43.10	24.91	-1,73
8007797	RPS26P11	Ribosomal Protein S26 Pseudogene 11	325.30	187.79	-1,73
7940441	PGA5	Pepsinogen 5, Group I (Pepsinogen A)	1949.00	1153.00	-1,7
8043283	KDM3A	Lysine (K)-Specific Demethylase 3A	53.41	31.56	-1,69
100287932	TIMM23	Translocase Of Inner Mitochondrial Membrane	297.76	176.80	-1,68
8011823	ZNF594	Zinc Finger Protein 594	31.22	18.62	-1,68
8132929	GBAS	Glioblastoma Amplified Sequence	10.95	6.58	-1,66
7902398	SNORD45A	Small Nucleolar RNA, C/D Box 45A	6.01	3.63	-1,65
7908924	PRELP	Proline/Arginine-Rich End Leucine-Rich Repeat Protein	13.24	8.06	-1,64
8078252	UBE2E2	Ubiquitin-Conjugating Enzyme E2E 2	72.00	44.00	-1,64
7954777	ALG10	Asparagine-Linked Glycosylation 10, Alpha-1,2-Glucosyltransferase Homo	23.22	14.27	-1,63
7938313	SNORA23	Small Nucleolar RNA, H/ACA Box 23	26.41	16.28	-1,62
8038962	ZNF836	Zinc Finger Protein 836	3.43	2.12	-1,62
8063531	C20orf107	Chromosome 20 Open Reading Frame 107	52.01	32.23	-1,61
7961798	SOX5	SRY (Sex Determining Region Y)-Box 5	43.81	27.18	-1,61

8058857	IGFBP5	Insulin-Like Growth Factor Binding Protein 5	179.52	111.53	-1,61
8119898	VEGFA	Vascular Endothelial Growth Factor A	52.86	33.08	-1,6
8069499	ANKRD30B	Ankyrin Repeat Domain 30B	68.05	42.47	-1,6
8113591	PGGT1B	Protein Geranylgeranyltransferase Type I, Beta Subunit	48.72	30.62	-1,59
7916785	INSL5	Insulin-Like 5	114.81	72.04	-1,59
7995793	MT1L	Metallothionein 1L (Gene/Pseudogene)	2531.72	1591.68	-1,59
8180311	DYNC1I2	Dynein, Cytoplasmic 1, Intermediate Chain 2	173.77	109.20	-1,59
8112728	RAP1B	RAP1B, Member Of RAS Oncogene Family	498.05	313.21	-1,59
7980547	SEL1L	Sel-1 Suppressor Of Lin-12-Like	17.56	11.05	-1,59
7979725	PIGH	Phosphatidylinositol Glycan Anchor Biosynthesis, Class H	29.95	18.95	-1,58
8180283	SNORD68	Small Nucleolar RNA, C/D Box 68	109.00	69.00	-1,58
8180257	CEP170	Centrosomal Protein 170kda	44.05	27.88	-1,58
8031043	MIR516B1	Microrna 516b-1	156.72	99.81	-1,57
7997188	HP	Haptoglobin	510.94	325.70	-1,57
8105862	CDK7	Cyclin-Dependent Kinase 7	2.92	1.86	-1,57
8074916	C22orf43	Chromosome 22 Open Reading Frame 43	8.29	5.29	-1,57
8094301	MIR218-1	Microrna 218-1	148.59	94.51	-1,57
8097098	USP53	Ubiquitin Specific Peptidase 53	39.64	25.18	-1,57
8150881	PLAG1	Pleiomorphic Adenoma Gene 1	46.15	29.58	-1,56
8092578	ETV5	ETC Variant 5	392.59	251.62	-1,56
8169947	OR13H1	Olfactory Receptor, Family 13, Subfamily H, Member 1	34.22	21.92	-1,56
8157153	PALM2	Paralemmin 2	202.36	129.61	-1,56
8167866	PAGE2	P Antigen Family, Member 2 (Prostate Associated)	721.54	463.63	-1,56
8163892	LOC100128064	Hypothetical LOC100128064	15.61	10.00	-1,56
8094139	DEFB131	Defensin, Beta 131	1226.38	786.57	-1,56
7981964	SNORD116-1	Small Nucleolar RNA, C/D Box 116-1	3490.76	2245.97	-1,55
8140433	POMZP3	POM121 And ZP3 Fusion	65.29	42.11	-1,55
388165	UBE2Q2P1	Ubiquitin-Conjugating Enzyme E2Q Family Member 2 Pseudogene 1	111.42	71.75	-1,55
8128837	C6orf186	Chromosome 6 Open Reading Frame 186	144.17	93.21	-1,55
7973221	TRDV2	T Cell Receptor Delta Variable 2	2.64	1.72	-1,54
7973010	OR4N2	Olfactory Receptor, Family 4, Subfamily N, Member 2	862.83	559.33	-1,54
8014603	TBC1D3B	TBC1 Domain Family, Member 3	38.41	24.92	-1,54
8014603	DACH1	Dachshund Homolog 1 (Drosophila)	43.02	27.87	-1,54
7908672	PKP1	Plakophilin 1 (Ectodermal Dysplasia/Skin Fragility Syndrome)	115.96	75.37	-1,54
7945040	HYLS1	Hydroletharus Syndrome 1	862.83	559.33	-1,54

8180348	XCL2	Chemokine (C Motif) Ligand 2	76.98	49.92	-1,54
8101839	EIF4E	Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E	126.19	82.32	-1,53
7973221	TRAV27	T Cell Receptor Alpha Variable 27	139.13	90.95	-1,53
284233	LOC284233	Hypothetical LOC284233	3.70	2.41	-1,53
7921862	C1orf192	Chromosome 1 Open Reading Frame 192	32.33	21.20	-1,53
8035318	UNC13A	Unc-13 Homolog A (C. Elegans) [<i>Homo Sapiens</i>]	100.08	65.59	-1,53
8030982	ZNF845	Zinc Finger Protein 845	533.14	349.20	-1,53
7980680	FOXP3	Forkhead Box N3	48.54	31.98	-1,52
8128716	CD164	CD164 Molecule, Sialomucin	161.45	106.09	-1,52
8063011	WFDC10A	WAP Four-Disulfide Core Domain 10A	10.60	6.96	-1,52
8156935	ZNF189	Zinc Finger Protein 189	23.91	15.72	-1,52
7973813	AP4S1	Adaptor-Related Protein Complex 4, Sigma 1 Subunit	86.43	56.82	-1,52
7920515	UBE2Q1	Ubiquitin-Conjugating Enzyme E2Q Family Member 1	30.98	20.44	-1,52
7981951	SNORD116-6	Small Nucleolar RNA, C/D Box 116-6	545.83	358.72	-1,52
8052382	FANCL	Fanconi Anemia, Complementation Group L	110.79	72.95	-1,52
8042066	CCDC104	Coiled-Coil Domain Containing 104	45.97	29.71	-1,51
7930454	PDCD4	Programmed Cell Death 4 (Neoplastic Transformation Inhibitor)	991.09	656.32	-1,51
7928999	LIPN	Lipase, Family Member N	171.31	113.73	-1,51
8014650	NPEPPS	Aminopeptidase Puromycin Sensitive	79.81	52.95	-1,51
8148158	WDR67	WD Repeat Domain 67	227.41	150.49	-1,51
8152522	ENPP2	Ectonucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase 2	50.54	33.41	-1,51
7934393	PPP3CB	Protein Phosphatase 3, Catalytic Subunit, Beta Isozyme	104.59	69.29	-1,51
8168500	PGK1	Phosphoglycerate Kinase 1	4708,55	3817,07	-1,5
8155754	MAMDC2	MAM Domain Containing 2	1604.19	1069.31	-1,5
8136662	MGAM	Maltase-Glucoamylase (Alpha-Glucosidase)	80.88	53.87	-1,5
7953218	RAD51AP1	RAD51 Associated Protein 1	270.69	180.18	-1,5
7916777	MIR101-1	Microna 101-1	21.90	14.00	-1,5
8155699	FXN	Frataxin	13.63	9.10	1,5
7904726	TXNIP	Thioredoxin Interacting Protein	208.60	123.07	1,5
7915504	ELOVL1	ELOVL Fatty Acid Elongase 1	6	9	1,5
8180223	LOC221442	Adenylate Cyclase 10 (Soluble) Pseudogene 1	1.24	1.86	1,5
7921360	OR6Y1	Olfactory Receptor, Family 6, Subfamily Y, Member 1	24.16	36.16	1,5
8109926	GABRP	Gamma-Aminobutyric Acid (GABA) A Receptor, Pi	31.85	48.06	1,51
8006812	PSMB3	Proteasome (Prosome, Macropain) Subunit, Beta Type, 3	468.99	710.06	1,51
7992678	LOC652276	Potassium Channel Tetramerisation Domain Containing 5 Pseudogene	151.55	228.21	1,51

8055214	LOC440905	Uncharacterized LOC440905	30.59	46.24	1,51
7945688	INS-IGF2	INS-IGF2 Readthrough	113.07	170.61	1,51
7979416	TIMM9	Translocase Of Inner Mitochondrial Membrane 9 Homolog (Yeast) [<i>Homo Sapiens</i>]	59.11	89.00	1,51
7928890	AGAP11	Ankyrin Repeat And Gtpase Domain Arf Gtpase Activating Protein 11	30.43	45.96	1,51
8117741	OR2H2	Olfactory Receptor, Family 2, Subfamily H, Member 2	85.35	128.14	1,51
7965200	CCDC59	Coiled-Coil Domain Containing 59	1486.31	2257.02	1,52
8187841	POLR2H	Polymerase (RNA) II (DNA Directed) Polypeptide H	2634.71	4003.68	1,52
7187823	FBP2	Fructose-1,6-Bisphosphatase 2	76.71	116.49	1,52
7037843	CNOT7	CCR4-NOT Transcription Complex, Subunit 7	4.43	6.74	1,52
8187842	HSD3BP4	Hydroxy-Delta-5-Steroid Dehydrogenase, 3 Beta, Pseudogene 4	16.28	24.76	1,52
8107840	MFAP3	Microfibrillar-Associated Protein 3	18.45	28.05	1,52
7217840	BTNL8	Butyrophilin-Like 8	13.56	20.80	1,53
9797841	TIFAB	TRAF-Interacting Protein With Forkhead-Associated Domain, Family Member B	1.68	2.58	1,53
8512345	ZNF492	Zinc Finger Protein 492	36.06	55.01	1,53
8123812	TRGV5	T Cell Receptor Gamma Variable 5	585.83	902.29	1,54
8047635	RPL12	Ribosomal Protein L12	57.43	88.32	1,54
8435435	PMS2P1	Postmeiotic Segregation Increased 2-Like 1 Pseudogene	13.88	21.30	1,54
8364565	HIST1H3C	Histone Cluster 1, H3c	212.33	327.90	1,54
8044534	FAIM	Fas Apoptotic Inhibitory Molecule	20.36	31.36	1,54
8046755	RPRM	Reprimo, TP53 Dependent G2 Arrest Mediator Candidate	19.31	29.78	1,54
8047567	PSMB5	Proteasome Subunit, Beta Type, 5	78.67	122.05	1,55
8047867	GSTA5	Glutathione S-Transferase Alpha 5	224.83	348.91	1,55
8117429	HIST1H2BI	Histone Cluster 1, H2bi	5.13	7.95	1,55
8145842	KPNA4	Karyopherin Alpha 4 (Importin Alpha 3)	20.57	32.07	1,56
8134340	AGPS	Alkylglycerone Phosphate Synthase	32.81	51.03	1,56
7567777	GRINL1A	Glutamate Receptor, Ionotropic, N-Methyl D-Aspartate-Like 1A	118.66	184.69	1,56
9342441	LNK2	Ligand Of Numb-Protein X 2	101.46	158.50	1,56
8512453	HIST1H3H	Histone Cluster 1, H3h	67,88	106.41	1,57
8767812	NLN	Neurolysin (Metallopeptidase M3 Family)	27.28	42.82	1,57
8048906	OR5T2	Olfactory Receptor, Family 5, Subfamily T, Member 2	24,49	38.60	1,58
7835435	LRR1	Leucine Rich Repeat Containing 1	17.18	27.06	1,58
8003565	ZNF673	Zinc Finger Family Member 673	13.55	21.46	1,58
8564534	TLE4	Transducin-Like Enhancer Of Split 4 (E(Sp1)	6,4	10.14	1,59
7446755	UGT2B28	UDP Glucuronosyltransferase 2 Family, Polypeptide B28	631,78	1006.74	1,59

7807567	RPL23	Ribosomal Protein L23	16,15	25.79	1,6
6467867	GOLGA8A	Golgin A8 Family, Member A	7,97	12.87	1,61
8346456	TRBV19	T Cell Receptor Beta Variable 19	72,54	116.71	1,61
7996785	PRELID1	PRELI Domain Containing 1	35,37	57.04	1,61
7125793	BCORP1	CL6 Corepressor Pseudogene 1	8,96	14.48	1,62
8180311	DDX21	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) Box Helicase 21	1,17	1.90	1,62
8453528	HIST3H2A	Histone Cluster 3, H2a	31,21	50,85	1,63
73453547	HIST1H2AB	Histone Cluster 1, H2ab	49,95	81,25	1,63
76564655	LGALS9C	Lectin, Galactoside-Binding, Soluble, 9C	5,92	9.71	1,64
8180283	TUBB4	Tubulin, Beta 4A Class Iva	26,98	44.12	1,64
84534537	PECAM1	Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule 1	14,82	24.43	1,65
8031043	ARHGEF5	Rho Guanine Nucleotide Exchange Factor (GEF) 5	22,26	36.68	1,65
7980390	C14orf148	NADP-Dependent Oxidoreductase Domain Containing 1	20,22	33.63	1,66
9890390	SNORD25	Small Nucleolar RNA, C/D Box 25	63,98	105.97	1,66
8175747	MAGEA3	Melanoma Antigen Family A, 3	1121,2	1884.73	1,67
8141173	OCM2	Oncomodulin 2	48,03	81.13	1,68
8180417	METTL2B	Methyltransferase Like 2B	8,8	14.76	1,68
8124484	HIST1H2BJ	Histone Cluster 1, H2bj	40,55	69.24	1,7
7921003	C1orf61	Chromosome 1 Open Reading Frame 61	17,15	29.26	1,71
8180362	MPRIP	Myosin Phosphatase Rho Interacting Protein	188,62	322.32	1,71
7922337	TNFSF18	Tumor Necrosis Factor (Ligand) Superfamily, Member 18	30,62	52.32	1,71
8117377	HIST1H1E	Histone Cluster 1, H1e	7,54	13.03	1,72
8030982	ZNF528	Zinc Finger Protein 528	12,67	21.89	1,72
7938261	OR2T6	Olfactory Receptor, Family 2, Subfamily T, Member 6	44,89	78.61	1,75
8013860	TIAF1	TGFB1-Induced Anti-Apoptotic Factor 1	16,81	29.77	1,77
8061497	FRG1B	FSHD Region Gene 1 Family, Member B	20,21	36.00	1,78
7971615	EBPL	Emopamil Binding Protein-Like	19,77	35.54	1,8
8004464	TNFSF+B32213	Tumor Necrosis Factor (Ligand) Superfamily, Member 13	5,87	10.57	1,8
7917516	GBP1	Guanylate Binding Protein 1, Interferon-Inducible	44,26	82.22	1,86
8054045	FAHD2B	Fumarylacetoacetate Hydrolase Domain Containing 2B	22,01	41.01	1,86
7983274	PDIA3	Protein Disulfide Isomerase Family A, Member 3	7,99	14.91	1,87
8140443	FDPSSL2A	Farnesyl Diphosphate Synthase Pseudogene 2	3,63	6.97	1,92
8180369	OR4N4	Olfactory Receptor, Family 4, Subfamily N, Member 4	3,49	6.81	1,95
7967563	UBC	Ubiquitin C	8,41	16.32	1,95
8174047	TIMM8A	Translocase Mitochondrial Membrane 8 Homolog A	5,22	10.24	1,96

7904465	HIST1H2BA	Histone Cluster 1, H2ba	11	21.60	1,96
8049349	UGT1A10	Glucuronosyltransferase 1 Family, Polypeptide A10	354,74	705.79	1,99
8180322	KRTAP21-1	Keratin Associated Protein 21-1	33,09	16.45	2
8074170	POTEKP	Ankyrin Domain Family, Member K, Pseudogene	8,35	4.01	2,04
8124459	ZNF322B	Zinc Finger Protein 322 Pseudogene 1	5,58	11.15	2,06
8108633	PCDHA4	Protocadherin Alpha 4	26,07	57.25	2,14
8131444	PMS2CL	PMS2 C-Terminal Like Pseudogene	2,67	5.71	2,2
7925622	AHCTF1	AT Hook Containing Transcription Factor 1	17,32	39.86	2,29
7951662	CRYAB	Crystallin, Alpha B	1,81	4.21	2,33
8065730	EIF2S2	Eukaryotic Translation Initiation Factor 2, Subunit 2 B	10,88	27.66	2,54
7954995	SPTBN5	Spectrin, Beta, Non-Erythrocytic 5 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	227.69	599.53	2,63
7893397	SRP14	Signal Recognition Particle 14kda (Homologous Alu RNA Binding Protein) [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	7.53	20.52	2,72
8160718	PTENP1	PTENP1 Phosphatase And Tensin Homolog	619,26	1729.72	2,79
7942586	RPS3	Ribosomal Protein S3	57	161.00	2,82
7895154	ARF1	ADP-Ribosylation Factor 1 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	57.00	161.00	2,82
8100476	NOX5	NADPH Oxidase, EF-Hand Calcium Binding Domain 5 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	140.57	397.15	2,83
7893091	RPL35	Ribosomal Protein L35 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	6.00	18.00	3
8046012	ITPR2	Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor, Type 2 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	68.55	217.77	3,18
8089283	CYB5R4	Cytochrome B5 Reductase 4 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	3.62	11.57	3,19
7893885	SEPT2	Septin 2 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	5.00	16.00	3,2
8174277	CUX2	Cut-Like Homeobox 2 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	28.70	91.75	3,2
7893621	FRMD5	FERM Domain Containing 5 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	4.95	15,3	3,2
8012887	CDRT15	CMT1A Duplicated Region Transcript 15	7,01	21,89	3,22
8160394	IFNA10	Interferon, Alpha 10	3,97	12,77	3,22
8121508	GTF3C6	General Transcription Factor IIIC, Polypeptide 6, Alpha 35kda [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	2.41	7.81	3,23
7892572	ANAPC5	Anaphase Promoting Complex Subunit 5 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	58.00	192.00	3,31
8100389	ADAM10	ADAM Metallopeptidase Domain 10 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	2.72	9.08	3,34
8069133	NLGN4X	Neuroigin 4, X-Linked [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	2.61	8.77	3,35
7893009	CTDNBP1	CTD Nuclear Envelope Phosphatase 1 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	4.78	16.06	3,36
7919606	HIST2H2BF	Histone Cluster 2, H2bf	9,24	31.12	3,37
7964720	NINL	Ninein-Like [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	1.42	4.94	3,47
7922293	GALNT11	GALNT11 UDP-N-Acetyl-Alpha-D-Galactosamine:Polypeptide N-Acetylgalactosaminyltransferase 11 (Galnac-T11) [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	1.25	4.37	3,51

8019875	FLOT1	Flotillin 1 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	1.47	5.22	3,56
8178811	HLA-DRB6	Major Histocompatibility Complex, Class II, DR Beta 6	9,3	11.08	3,58
7976667	OR2L13	Olfactory Receptor, Family 2, Subfamily L, Member 13	13.30	47.95	3,61
8068662	PTPRM	Protein Tyrosine Phosphatase, Receptor Type, M [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	3.43	12.68	3,7
7896140	RPL10A	Ribosomal Protein L10a [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	30.00	114.00	3,8
7893170	ZNF259	Zinc Finger Protein 259 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	4.13	15.81	3,82
8023545	TMEM107	Transmembrane Protein 107 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	4.14	16.30	3,94
8148206	GID4	GID Complex Subunit 4, VID24 Homolog (S. Cerevisiae) [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	2.65	10.59	3,99
7892609	ABCF1	ATP-Binding Cassette, Sub-Family F (GCN20), Member 1	1.00	4.00	4
8046790	TNFRSF13B	Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily, Member 13B [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	9,44	36,75	4,06
7951552	ANKRD55	Ankyrin Repeat Domain 55 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	158.43	653.55	4,13
8120462	SEMA5A	Sema Domain, Seven Thrombospondin Repeats (Type 1 And Type 1-Like), Transmembrane Domain (TM) And Short Cytoplasmic Domain, (Semaphorin) 5A [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	13.30	55.99	4,21
8133858	GALNT10	UDP-N-Acetyl-Alpha-D-Galactosamine:Polypeptide N-Acetylgalactosaminyltransferase 10 (Galnac-T10) [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	44.93	189.32	4,21
7917468	BANP	BTG3 Associated Nuclear Protein [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	229.10	966.22	4,22
7894591	SLC25A3	Solute Carrier Family 25 (Mitochondrial Carrier; Phosphate Carrier), Member 3 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	1.15	5.07	4,4
7906233	NTRK1	Neurotrophic Tyrosine Kinase, Receptor, Type 1 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	9.82	43.64	4,44
8038137	SLC6A9	Solute Carrier Family 6 (Neurotransmitter Transporter, Glycine), Member 9 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	13.55	61.67	4,55
7895058	ZNF146	Zinc Finger Protein 146 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	8.00	37.00	4,63
8090801	CACNA1E	Calcium Channel, Voltage-Dependent, R Type, Alpha 1E Subunit [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	137.06	638.30	4,66
7892858	KAT7	K(Lysine) Acetyltransferase 7 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	1.00	4.93	4,93
7895275	RPL6	Ribosomal Protein L6 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	3.98	20.04	5,04
7904872	SPON1	Spondin 1, Extracellular Matrix Protein [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	95.67	497.25	5,2
7989216	PCBD2	Pterin-4 Alpha-Carbinolamine Dehydratase/Dimerization Cofactor Of Hepatocyte Nuclear Factor 1 Alpha (TCF1) 2	1.09	5.81	5,31
7935144	DNAH2	Dynein, Axonemal, Heavy Chain 2 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	1.80	9.57	5,32
7929954	CRKL	V-Crk Sarcoma Virus CT10 Oncogene Homolog (Avian)-Like [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	2.47	13.49	5,45
7930452	RBM20	RNA Binding Motif Protein 20 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	2.54	14.11	5,56
7957627	VEZT	Vezatin, Adherens Junctions Transmembrane Protein [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	1.81	10.28	5,69

7892982	SMNDC1	Survival Motor Neuron Domain Containing 1 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	1.00	6	6
8175432	RBMX	RNA Binding Motif Protein, X-Linked [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	2.54	15,43	6,08
7894806	HNRNPD	Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein D (AU-Rich Element RNA Binding Protein 1, 37kda) [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	7.79	48,09	6,17
8081454	DDX54	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) Box Polypeptide 54 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	1.00	6,4	6,4
7977801	DSG4	Desmoglein 4 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	3.52	23.45	6,66
7892502	NONO	Non-POU Domain Containing, Octamer-Binding	7.28	49.94	6,86
7892733	YY1	YY1 Transcription Factor [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	3.54	24.67	6,98
7892660	DAD1	Defender Against Cell Death 1 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	1.00	7.00	7
7892730	RPL24	Ribosomal Protein L24	1.00	7.07	7,07
7894089	F8	F8 Coagulation Factor VIII, Procoagulant Component [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	3.12	23.41	7,5
7996917	SNTB2	Syntrophin, Beta 2 (Dystrophin-Associated Protein A1, 59kda, Basic Component 2) [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	1.00	7.55	7,55
7892740	HNRNPM	Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein M [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	1.00	8.00	8
7894927	CBX3	Chromobox Homolog 3 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	1.07	8.57	8,04
7895082	HNRNPK	Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein K [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	2.13	17.82	8,37
8055087	MTA3	Metastasis Associated 1 Family, Member 3 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	1.00	8.81	8,81
7894594	SNORA72	Small Nucleolar RNA, H/ACA Box 72 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	1.00	10.07	10,07
7892706	EIF3F	Eukaryotic Translation Initiation Factor 3, Subunit F	1.00	10.30	10,3
7893577	STARD7	Star-Related Lipid Transfer (START) Domain Containing 7 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	1.20	12.52	10,43
7893243	SART3	Squamous Cell Carcinoma Antigen Recognized By T Cells 3 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	1.40	15.56	11,11
8088996	TRAFD1	TRAF-Type Zinc Finger Domain Containing 1 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	4.35	52.39	12,05
7893736	KHDRBS1	KH Domain Containing, RNA Binding, Signal Transduction Associated 1 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	1.00	12.81	12,81
7896021	RPS27A	Ribosomal Protein S27a	1.16	16.64	14,39
7894238	KARS	Lysyl-Trna Synthetase [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	1.00	15.00	15
7895650	SNORD117	Small Nucleolar RNA, C/D Box 117 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	1.00	15.38	15,38
7893994	PARK7	Parkinson Protein 7 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	1.00	17.34	17,34
7895382	EIF4G2	Eukaryotic Translation Initiation Factor 4 Gamma, 2 [<i>Homo Sapiens</i> (Human)]	1.00	20.00	20

Anexo II

Proteínas identificadas nos extratos nucleares

1. Proteínas identificadas nos extratos nucleares da sublinhagem G-361-pLKO

ACCESSION	DESCRIPTION	SCORE	COVERAGE	# PROTEINS	# UNIQUE PEPTIDES	# PEPTIDES	# PSMS	# AAS	MW [KDA]	CALC. PI
1. P60709	Actin, cytoplasmic 1 OS=Homo sapiens GN=ACTB PE=1 SV=1 - [ACTB_HUMAN]	83,19	37,07	22	5	9	18	375	41,7	5,48
2. Q5JP53	Tubulin beta chain OS=Homo sapiens GN=TUBB PE=2 SV=1 - [Q5JP53_HUMAN]	82,63	44,13	30	9	9	18	426	47,7	4,81
3. P04264	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6 - [K2C1_HUMAN]	59,31	19,10	2	7	8	13	644	66,0	8,12
4. P06733	Alpha-enolase OS=Homo sapiens GN=ENO1 PE=1 SV=2 - [ENOA_HUMAN]	50,27	22,81	17	5	5	9	434	47,1	7,39
5. P68363	Tubulin alpha-1B chain OS=Homo sapiens GN=TUBA1B PE=1 SV=1 - [TBA1B_HUMAN]	42,24	17,74	24	5	5	9	451	50,1	5,06
6. P02771	Alpha-fetoprotein OS=Homo sapiens GN=AFP PE=1 SV=1 - [FETA_HUMAN]	38,32	5,42	2	3	3	8	609	68,6	5,68
7. P14618	Pyruvate kinase PKM OS=Homo sapiens GN=PKM PE=1 SV=4 - [KPYM_HUMAN]	35,12	13,75	10	4	4	7	531	57,9	7,84
8. P01024	Complement C3 OS=Homo sapiens GN=C3 PE=1 SV=2 - [CO3_HUMAN]	33,33	2,65	1	2	2	6	1663	187,0	6,40
9. P08238	Heat shock protein HSP 90-beta OS=Homo sapiens GN=HSP90AB1 PE=1 SV=4 - [HS90B_HUMAN]	32,24	9,39	8	3	5	8	724	83,2	5,03
10. Q5T8M8	Actin, alpha skeletal muscle OS=Homo sapiens GN=ACTA1 PE=2 SV=1 - [Q5T8M8_HUMAN]	32,16	18,82	20	1	5	9	287	32,0	5,41
11. P02765	Alpha-2-HS-glycoprotein OS=Homo sapiens GN=AHSG PE=1 SV=1 -	31,92	5,18	2	3	3	9	367	39,3	5,72

12. P10809	[FETUA_HUMAN] 60 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=HSPD1 PE=1 SV=2 - [CH60_HUMAN]	26,07	10,82	8	4	4	6	573	61,0	5,87
13. P13639	Elongation factor 2 OS=Homo sapiens GN=EEF2 PE=1 SV=4 - [EF2_HUMAN]	23,88	9,67	1	4	4	5	858	95,3	6,83
14. P68104	Elongation factor 1-alpha 1 OS=Homo sapiens GN=EEF1A1 PE=1 SV=1 - [EF1A1_HUMAN]	23,08	17,10	5	4	4	6	462	50,1	9,01
15. Q5T985	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2 OS=Homo sapiens GN= TIH2 PE=2 SV=1 - [Q5T985_HUMAN]	22,07	3,21	2	3	3	5	935	105,2	7,03
16. G3V1A4	Cofilin 1 (Non-muscle), isoform CRA_a OS=Homo sapiens GN=CFL1 PE=2 SV=1 - [G3V1A4_HUMAN]	21,80	28,19	7	2	2	4	149	16,8	8,35
17. P01023	Alpha-2-macroglobulin OS=Homo sapiens GN=A2M PE=1 SV=3 - [A2MG_HUMAN]	18,99	1,36	3	1	2	6	1474	163,2	6,46
18. P63104	14-3-3 protein zeta/delta OS=Homo sapiens GN=YWHAZ PE=1 SV=1 - [1433Z_HUMAN]	18,69	18,37	11	3	3	4	245	27,7	4,79
19. Q86U12	Full-length cDNA clone CS0CAP007YF18 of Thymus of Homo sapiens (human) OS=Homo sapiens GN=HSP90AA1 PE=2 SV=1 - [Q86U12_HUMAN]	18,13	7,99	8	1	3	5	413	49,3	5,41
20. P69905	Hemoglobin subunit alpha OS=Homo sapiens GN=HBA1 PE=1 SV=2 - [HBA_HUMAN]	17,48	16,90	2	2	2	5	142	15,2	8,68
21. F8W079	ATP synthase subunit beta, mitochondrial (Fragment) OS=Homo sapiens GN=ATP5B PE=2 SV=1 - [F8W079_HUMAN]	15,43	19,72	7	3	3	4	284	30,2	8,29
22. P04259	Keratin, type II cytoskeletal 6B OS=Homo sapiens GN=KRT6B PE=1 SV=5 - [K2C6B_HUMAN]	14,67	8,87	8	2	3	4	564	60,0	8,00
23. P08195-2	Isoform 2 of 4F2 cell-surface antigen heavy chain OS=Homo sapiens GN=SLC3A2 -	14,16	5,86	7	2	2	4	529	57,9	5,35

24. P31949	[4F2_HUMAN] Protein S100-A11 OS=Homo sapiens GN=S100A11 PE=1 SV=2 - [S10AB_HUMAN]	13,87	24,76	1	2	2	3	105	11,7	7,12
25. E9PI65	Heat shock cognate 71 kDa protein (Fragment) OS=Homo sapiens GN=HSPA8 PE=2 SV=1 - [E9PI65_HUMAN]	13,58	21,43	16	1	3	4	168	17,9	5,29
26. P08107-2	Isoform 2 of Heat shock 70 kDa protein 1A/1B OS=Homo sapiens GN=HSPA1A - [HSP71_HUMAN]	13,07	5,63	12	1	3	4	586	63,9	5,71
27. P20742	Pregnancy zone protein OS=Homo sapiens GN=PZP PE=1 SV=4 - [PZP_HUMAN]	12,52	1,42	4	1	2	4	1482	163,8	6,38
28. H0YFX9	Histone H2A (Fragment) OS=Homo sapiens GN=H2AFJ PE=2 SV=1 - [H0YFX9_HUMAN]	12,37	20,65	11	1	1	3	92	10,0	9,70
29. P02774-2	Isoform 2 of Vitamin D-binding protein OS=Homo sapiens GN=GC - [VTDB_HUMAN]	12,03	4,83	4	1	1	2	352	39,5	5,26
30. P25705-2	Isoform 2 of ATP synthase subunit alpha, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ATP5A1 - [ATPA_HUMAN]	12,00	4,37	3	1	1	2	503	54,5	8,24
31. D6P XK4	Alpha actinin 4 short isoform OS=Homo sapiens GN=ACTN4 PE=2 SV=1 - [D6P XK4_HUMAN]	11,89	3,18	14	2	2	3	692	79,9	5,17
32. P04004	Vitronectin OS=Homo sapiens GN=VTN PE=1 SV=1 - [VTNC_HUMAN]	11,64	3,14	1	1	1	3	478	54,3	5,80
33. P37802	Transgelin-2 OS=Homo sapiens GN=TAGLN2 PE=1 SV=3 - [TAGL2_HUMAN]	11,64	18,59	1	2	2	2	199	22,4	8,25
34. P05141	ADP/ATP translocase 2 OS=Homo sapiens GN=SLC25A5 PE=1 SV=7 - [ADT2_HUMAN]	10,97	8,39	2	1	2	3	298	32,8	9,69
35. P13645	Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KRT10 PE=1 SV=6 - [K1C10_HUMAN]	10,94	7,19	1	2	2	2	584	58,8	5,21
36. O00299	Chloride intracellular channel protein 1 OS=Homo sapiens GN=CLIC1 PE=1 SV=4 -	10,18	7,47	1	1	1	2	241	26,9	5,17

37. P02788-2	[CLIC1_HUMAN] Isoform DeltaLf of Lactotransferrin OS=Homo sapiens GN=LTF - [TRFL_HUMAN]	9,55	1,80	4	1	1	3	666	73,1	7,85
38. P00338-5	Isoform 5 of L-lactate dehydrogenase A chain OS=Homo sapiens GN=LDHA - [LDHA_HUMAN]	9,26	12,03	13	1	2	2	241	26,7	8,15
39. P06744	Glucose-6-phosphate isomerase OS=Homo sapiens GN=GPI PE=1 SV=4 - [G6PI_HUMAN]	9,25	2,69	2	1	1	2	558	63,1	8,32
40. P40227-2	Isoform 2 of T-complex protein 1 subunit zeta OS=Homo sapiens GN=CCT6A - [TCPZ_HUMAN]	8,59	3,50	3	1	1	2	486	53,3	7,27
41. B4DTM7	Uncharacterized protein OS=Homo sapiens GN=VCL PE=2 SV=1 - [B4DTM7_HUMAN]	8,41	6,42	3	1	1	2	327	36,2	6,44
42. I7HJJ0	ADP/ATP translocase 3 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=SLC25A6 PE=4 SV=1 - [I7HJJ0_HUMAN]	8,38	24,68	4	1	2	2	158	17,3	9,74
43. A8MW50	L-lactate dehydrogenase (Fragment) OS=Homo sapiens GN=LDHB PE=2 SV=1 - [A8MW50_HUMAN]	8,29	13,79	11	1	2	2	232	25,2	5,81
44. E7ET33	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3 OS=Homo sapiens GN=ITI3 PE=2 SV=1 - [E7ET33_HUMAN]	7,72	1,72	3	1	1	2	698	78,1	6,38
45. I3L425	Pigment epithelium-derived factor (Fragment) OS=Homo sapiens GN=SERPINF1 PE=2 SV=1 - [I3L425_HUMAN]	6,92	16,09	6	1	1	2	87	9,1	4,51
46. F5GXQ1	35 kDa inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 OS=Homo sapiens GN=ITI4 PE=2 SV=1 - [F5GXQ1_HUMAN]	6,45	1,79	6	1	1	2	560	62,1	5,52
47. P49588	Alanine--tRNA ligase, cytoplasmic OS=Homo sapiens GN=AARS PE=1 SV=2 - [SYAC_HUMAN]	6,34	1,96	1	1	1	1	968	106,7	5,53
48. F8VQ14	T-complex protein 1 subunit	6,16	3,61	4	1	1	2	416	44,8	6,54

	beta OS=Homo sapiens GN=CCT2 PE=2 SV=1 - [F8VQ14_HUMAN]											
49. K7EM20	14-3-3 protein epsilon (Fragment) OS=Homo sapiens GN=YWHAE PE=4 SV=1 - [K7EM20_HUMAN]	6,14	25,22	3	1	1	1	115	12,9	4,59		
50. F8VWQ0	Phosphate carrier protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=SLC25A3 PE=2 SV=1 - [F8VWQ0_HUMAN]	5,79	17,31	3	1	1	1	156	16,9	8,47		
51. E7EUT5	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Homo sapiens GN=GAPDH PE=2 SV=1 - [E7EUT5_HUMAN]	5,77	9,23	3	1	1	1	260	27,9	6,95		
52. Q6PI48	Aspartate--tRNA ligase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=DARS2 PE=1 SV=1 - [SYDM_HUMAN]	5,72	2,48	1	1	1	2	645	73,5	8,02		
53. K7EL50	Calreticulin (Fragment) OS=Homo sapiens GN=CALR PE=3 SV=1 - [K7EL50_HUMAN]	4,89	17,79	2	1	1	1	163	19,1	4,46		
54. M0QZN2	40S ribosomal protein S5 OS=Homo sapiens GN=RPS5 PE=4 SV=1 - [M0QZN2_HUMAN]	4,60	11,19	4	1	1	1	134	14,8	8,48		
55. O60814	Histone H2B type 1-K OS=Homo sapiens GN= PE=1 SV=3 - [HIST1H2BK H2B1K_HUMAN]	4,49	11,90	16	1	1	1	126	13,9	10,32		
56. Q5T0I1	Gelsolin (Fragment) OS=Homo sapiens GN=GSN PE=2 SV=1 - [Q5T0I1_HUMAN]	4,44	6,58	6	1	1	1	228	25,8	7,08		
57. E9PBS1	Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase (Fragment) OS=Homo sapiens GN=PAICS PE=2 SV=1 - [E9PBS1_HUMAN]	4,42	3,63	2	1	1	1	413	45,6	6,68		
58. F8W696	Truncated apolipoprotein A-I OS=Homo sapiens GN=APOA1 PE=2 SV=1 - [F8W696_HUMAN]	4,37	6,53	2	1	1	1	245	27,9	6,13		
59. H7C0N0	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=ITI1 PE=2 SV=1 -	4,30	2,80	5	1	1	1	464	51,8	6,19		

60. F5H4R7	[H7C0N0_HUMAN] Importin subunit beta-1 OS=Homo sapiens GN=KPNB1 PE=2 SV=1 - [F5H4R7_HUMAN]	4,04	2,88	4	1	1	1	660	73,2	4,78
61. Q5T3N0	Annexin A1 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=ANXA1 PE=2 SV=1 - [Q5T3N0_HUMAN]	3,80	11,30	3	1	1	1	115	12,6	6,55
62. P12259	Coagulation factor V OS=Homo sapiens GN=F5 PE=1 SV=4 - [FA5_HUMAN]	3,79	0,63	1	1	1	1	2224	251,5	6,05
63. P02795	Metallothionein-2 OS=Homo sapiens GN=MT2A PE=1 SV=1 - [MT2_HUMAN]	3,70	19,67	6	1	1	1	61	6,0	7,83
64. P41250	Glycine--tRNA ligase OS=Homo sapiens GN=GARS PE=1 SV=3 - [SYG_HUMAN]	3,62	1,76	1	1	1	1	739	83,1	7,03
65. G3V3L6	C-1-tetrahydrofolate synthase, cytoplasmic OS=Homo sapiens GN=MTHFD1 PE=2 SV=1 - [G3V3L6_HUMAN]	3,44	3,79	4	1	1	1	634	69,4	8,43
66. F5GY37	Prohibitin-2 OS=Homo sapiens GN=PHB2 PE=2 SV=1 - [F5GY37_HUMAN]	3,44	4,49	3	1	1	1	267	29,7	9,88
67. K7EK07	Histone H3 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=H3F3B PE=3 SV=1 - [K7EK07_HUMAN]	3,39	24,24	2	1	1	1	132	14,9	11,30
68. H0Y8S0	Stress-70 protein, mitochondrial (Fragment) OS=Homo sapiens GN=HSPA9 PE=4 SV=1 - [H0Y8S0_HUMAN]	3,35	14,71	2	1	1	1	102	11,3	7,18
69. Q9BYH1-2	Isoform 1 of Seizure 6-like protein OS=Homo sapiens GN=SEZ6L - [SE6L1_HUMAN]	3,34	4,33	2	1	1	1	716	79,0	4,69
70. Q00266	S-adenosylmethionine synthase isoform type-1 OS=Homo sapiens GN=MAT1A PE=1 SV=2 - [METK1_HUMAN]	3,24	5,82	1	1	1	1	395	43,6	6,29
71. O76099	Olfactory receptor 7C1 OS=Homo sapiens GN=OR7C1 PE=2 SV=1 - [OR7C1_HUMAN]	3,11	9,06	1	1	1	1	320	35,5	7,61
72. P57103-7	Isoform 8 of Sodium/calcium	3,08	1,95	1	1	1	1	925	102,7	5,21

	exchanger 3 OS=Homo sapiens GN=SLC8A3 - [NAC3_HUMAN]										
73. P81605	Dermcidin OS=Homo sapiens GN=DCD PE=1 SV=2 - [DCD_HUMAN]	3,05	10,00	2	1	1	1	110	11,3	6,54	
74. F8VSC5	SCY1-like protein 2 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=SCYL2 PE=2 SV=1 - [F8VSC5_HUMAN]	2,85	2,64	2	1	1	1	681	77,0	7,05	

2. Proteínas identificadas nos extratos nucleares da Sublinhagem G-361-IBC-I

ACCESSION	Description	Score	Coverage	# Proteins	# Unique Peptides	# Peptides	# PSMs	# AAs	MW [kDa]	calc. pI
1. P01024	Complement C3 OS=Homo sapiens GN=C3 PE=1 SV=2 - [CO3_HUMAN]	38,44	3,37	1	3	3	8	1663	187,0	6,40
2. P02765	Alpha-2-HS-glycoprotein OS=Homo sapiens GN=AHSG PE=1 SV=1 - [FETUA_HUMAN]	23,26	3,27	1	1	1	6	367	39,3	5,72
3. P02774-2	Isoform 2 of Vitamin D-binding protein OS=Homo sapiens GN=GC - [VTDB_HUMAN]	22,51	11,08	5	2	2	4	352	39,5	5,26
4. P69905	Hemoglobin subunit alpha OS=Homo sapiens GN=HBA1 PE=1 SV=2 - [HBA_HUMAN]	20,56	21,83	2	2	2	5	142	15,2	8,68
5. P06396-2	Isoform 2 of Gelsolin OS=Homo sapiens GN=GSN - [GELS_HUMAN]	18,47	7,52	7	2	2	4	731	80,6	5,85
6. P01023	Alpha-2-macroglobulin OS=Homo sapiens GN=A2M PE=1 SV=3 - [A2MG_HUMAN]	17,25	1,36	4	2	2	5	1474	163,2	6,46
7. P02771	Alpha-fetoprotein OS=Homo sapiens GN=AFP PE=1 SV=1 - [FETA_HUMAN]	14,80	4,27	2	2	2	3	609	68,6	5,68
8. P00747	Plasminogen OS=Homo sapiens GN=PLG PE=1 SV=2 - [PLMN_HUMAN]	14,08	3,21	1	2	2	3	810	90,5	7,24
9. P02795	Metallothionein-2 OS=Homo sapiens GN=MT2A PE=1 SV=1 - [MT2_HUMAN]	11,33	19,67	6	1	1	3	61	6,0	7,83
10. P60709	Actin, cytoplasmic 1 OS=Homo sapiens GN=ACTB PE=1 SV=1 - [ACTB_HUMAN]	10,41	12,00	18	2	2	2	375	41,7	5,48
11. Q6EMK4	Vasorin OS=Homo sapiens GN=VASN PE=1 SV=1 - [VASN_HUMAN]	9,47	2,53	1	1	1	2	673	71,7	7,39
12. Q5T985	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2 OS=Homo sapiens GN=ITIH2 PE=2 SV=1 - [Q5T985_HUMAN]	8,40	1,60	2	2	2	2	935	105,2	7,03
13. F5GXS0	C4b-B OS=Homo sapiens GN=C4B PE=2 SV=1 - [F5GXS0_HUMAN]	7,25	0,82	5	1	1	2	1698	187,6	7,33
14. F5GXQ1	35 kDa inter-alpha-trypsin	6,89	1,79	6	1	1	2	560	62,1	5,52

	inhibitor heavy chain H4 OS=Homo sapiens GN=ITIH4 PE=2 SV=1 - [F5GXQ1_HUMAN]										
15.	C9JV37	Thrombin light chain (Fragment) OS=Homo sapiens GN=F2 PE=2 SV=1 - [C9JV37_HUMAN]	6,72	2,78	3	1	1	2	324	35,9	4,82
16.	P62805	Histone H4 OS=Homo sapiens GN=HIST1H4A PE=1 SV=2 - [H4_HUMAN]	6,50	9,71	1	1	1	2	103	11,4	11,36
17.	K7EK07	Histone H3 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=H3F3B PE=3 SV=1 - [K7EK07_HUMAN]	5,89	24,24	2	1	1	1	132	14,9	11,30
18.	P35527	Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT9 PE=1 SV=3 - [K1C9_HUMAN]	4,95	2,57	1	1	1	1	623	62,0	5,24
19.	P23142-2	Isoform A of Fibulin-1 OS=Homo sapiens GN=FBLN1 - [FBLN1_HUMAN]	4,34	5,48	7	1	1	1	566	61,5	4,93
20.	H7C0N0	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=ITIH1 PE=2 SV=1 - [H7C0N0_HUMAN]	4,24	2,80	5	1	1	1	464	51,8	6,19
21.	P04264	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6 - [K2C1_HUMAN]	4,11	1,86	1	1	1	1	644	66,0	8,12
22.	E7ET33	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3 OS=Homo sapiens GN=ITIH3 PE=2 SV=1 - [E7ET33_HUMAN]	3,95	1,72	3	1	1	1	698	78,1	6,38
23.	P10809	60 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=HSPD1 PE=1 SV=2 - [CH60_HUMAN]	3,87	2,09	1	1	1	1	573	61,0	5,87
24.	I3L425	Pigment epithelium-derived factor (Fragment) OS=Homo sapiens GN=SERPINF1 PE=2 SV=1 - [I3L425_HUMAN]	3,85	16,09	6	1	1	1	87	9,1	4,51
26.	Q96C45	Serine/threonine-protein kinase ULK4 OS=Homo sapiens GN=ULK4 PE=1 SV=2 - [ULK4_HUMAN]	3,46	1,88	1	1	1	1	1275	142,4	6,29
27.	F5GY37	Prohibitin-2 OS=Homo sapiens GN=PHB2 PE=2 SV=1 - [F5GY37_HUMAN]	3,41	4,49	3	1	1	1	267	29,7	9,88
28.	A8MUN2	Apolipoprotein B-48 OS=Homo	3,36	1,45	2	1	1	1	828	92,6	7,42

29.	C9JMH6	sapiens GN=APOB PE=2 SV=2 - [A8MUN2_HUMAN]									
		Alpha-2-antiplasmin (Fragment) OS=Homo sapiens GN=SERPINF2 PE=2 SV=1 - [C9JMH6_HUMAN]	3,29	4,31	3	1	1	1	255	27,8	6,77
30.	F8VQ14	T-complex protein 1 subunit beta OS=Homo sapiens GN=CCT2 PE=2 SV=1 - [F8VQ14_HUMAN]	3,29	3,61	4	1	1	1	416	44,8	6,54
		Isoform 3 of Rho guanine nucleotide exchange factor 9 OS=Homo sapiens GN=ARHGEF9 - [ARHG9_HUMAN]	2,00	2,90	5	1	1	1	414	49,4	7,08