

Ana Carolina Bassi Stern

Análise da influência da restrição nutricional na modulação proteica de células de leucemia mielóide crônica (K562).

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Ciências Médicas

Área de concentração: Distúrbios do Crescimento celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Paulo Bydlowski

São Paulo

2016

Ana Carolina Bassi Stern

Análise da influência da restrição nutricional na modulação proteica de células de leucemia mielóide crônica (K562).

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Ciências Médicas

Área de concentração: Distúrbios do Crescimento celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Paulo Bydlowski

São Paulo

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Stern, Ana Carolina Bassi

Análise da influência da restrição nutricional na modulação proteica de células de leucemia mieloide crônica (K562) / Ana Carolina Bassi Stern. -- São Paulo, 2016.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências Médicas. Área de concentração: Distúrbios do Crescimento Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia.

Orientador: Sérgio Bydlowski.

RESUMO

STERN ACB. Análise da influência da restrição nutricional na modulação proteica de células de leucemia mielóide crônica (K562). [Tese]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2016.

A formação de uma célula cancerígena é um processo constituído por múltiplas etapas no qual ocorrem diversas alterações genéticas e epigenéticas. O stress ambiental induzido pela restrição nutricional ao tumor causa a desregulação do metabolismo celular, além de aumentar a liberação de citosinas, quimiocinas e fatores de crescimento. Existem diversos estudos que descrevem os impactos do estresse ambiental na progressão tumoral e aquisição de resistência, contudo a maioria destes dá enfoque ao efeito da hipoxia e hipoglicemia. Apesar da restrição lipídica e sérica também serem fontes de estresse microambiental, pouco se sabe sobre os efeitos destas restrições na célula cancerígena. No presente estudo, foi avaliada a influência da restrição sérica e lipídica *in vitro* nas células de leucemia mielóide crônica K562 e verificadas possíveis alterações na expressão proteica das células que se encontram em restrição nutricional. Foi observado que a restrição lipídica, em todos os testes realizados, não induziu alterações significativas em relação ao controle. Na restrição plasmática, por sua vez, houve diminuição da viabilidade celular, aumento da apoptose, aumento da quantidade de células na fase G2 do ciclo celular e desenvolvimento de uma resistência adquirida a fatores de stress ambiental como pH e presença de espécies oxido redutivas e ao quimioterápico vincristina. Com a análise proteômica baseada em espectrometria de massas, para identificação e quantificação de proteínas, foi possível identificar diferenças

no padrão de expressão de proteínas relacionadas as alterações supracitadas como SD1, MGST2, MGST1, GSTT1 e MGT3.

Descritores: K562; BCR-AB; morte celular; proteômica; MDR, restrição lipídica, restrição sérica.

ABSTRACT

STERN ACB. Influencial analysis in protein modulation of chronic myelogenous leukemia cells (K562) driven by nutritional deficiency. [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2016.

The formation of a cancer cell is a multistep process in which there are several genetic and epigenetic changes. The environmental stress induced by tumor nutritional deficiency causes disruption of cell metabolism, and increases the release of cytokines, chemokines and growth factors. There are many studies describing the effects of environmental stress on tumor progression and acquisition of resistance; however, most of these focus on the effect of hypoxia and hypoglycemia. Although the lipid and serum restriction can also be sources of microenvironmental stress, little is known about the effects of these restrictions on cancer cells. In the present study, we evaluated the influence of serum lipid and restriction in chronic myelogenous leukemia cells K562 *in vitro*. Lipid restriction didn't show significant changes when compared controls. Plasmatic restriction reduced cell viability, increased cell death and the amount of cells in G2 phase of cell cycle. Also increased cells with acquired resistance to environmental stress factors such as pH or the presence of oxide species reductive or chemotherapeutic agent vincristine. With mass spectrometrybased proteomics, it was possible to identify the change in expression of proteins related to the aforementioned effects such as SD1, MGST2, MGST1, GSTT1 e MGT3.

Descritores: K562; BCR-AB; cell death; proteomics; MDR, lipid restriction, serum restrictum.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Sérgio Paulo Bydlowski pela orientação, por se empenhar em minha formação científica.

Aos Prof. Dr. Giuseppe Palmisano pelo fundamental suporte metodológico, ensinamento e incentivo necessários para o desenvolvimento desse trabalho e para o meu crescimento científico.

Aos Drs Débora Levy e Jorge Ruiz, pelos ensinamentos no início desta jornada, importantes para meu amadurecimento tanto científico como pessoal.

À Dra Luciana Morganti Ferreira Maseli, por todo apoio, ajuda e sempre disponibilizar um ombro amigo. Vou sentir saudades dos nossos almoços com direito a suco de maracujá e fotos de dogs fofos.

A Dra Nair Maeda, Naná, pelas conversas e lanchinhos que deixaram meus dias mais leves e alegres.

A Rita de Cássia Cavaglieri, pelo auxílio nos experimentos de citometria de fluxo, sua alegria e pureza de alma contagiam.

Dra Adriana de Aguiar Debes, pela ajuda na correção e diagramação deste trabalho, Nos aproximadoa pouco tempo (ainda bem), mas você já me surpreendeu várias vezes. Voê tem um coração de ouro.

Aos amigos de laboratório, Cleidinha Menarbini Appolonio, Dra Rosângela Soares, Lina Fukuya, Denise Chaves, Mariana Clavé, Suelen Feitoza, Bruno Sini, Joel Cunha e Sr Joel, pelo companheirismo, ajuda e amizade.

Aos amigos, Bytata, menino Igor, Flavinha, Louis, Geisy, Jinkx, Ursula, Rita, Nadia, Cesar, Perin, Ella, Gabi, Ana, Thais, Deisoca; vocês são a família que eu escolhi, vocês me fazem sorrir nos momentos mais difíceis e presentes nos mais alegres.

A ao meu amigo JJ, em separado, porque ele é especial.

A Dra Lívia Rosa Fernandes (Liviá), por ter compartilhado seus conhecimentos e ter ajudado nas análises proteômicas. Ao longo desta jornada você se tornou uma verdadeira amiga. Sua companhia na bancada e discussões noturnas, tiveram uma contribuição ímpar para este trabalho.

Aos irmãos, pelo incentivo direto ou indireto pelo apoio incondicional, força, incentivo e amizade sem igual

Pacha, por me ouvir e atentamente e sempre ficar ao meu lado nos momentos de ansiedade.

Liti por fazer parte deste livro de histórias.

Aos meus pais, Marisa e Julio, por tudo que fizeram ao longo de minha vida. Desejo poder ter sido merecedor do esforço dedicado por vocês em todos os aspectos, especialmente em minha formação moral e acadêmica.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento do Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pela concessão do auxílio financeiro para execução desse trabalho.

Ao banco de Sangue da Santa Casa de Misericórdia de SP.

A virtude com a qual o homem livre evita os perigos revela-se tão grande quanto a
virtude com a qual ele os enfrenta” – Espinosa, Ética IV, prop 69

A minha família, pelo incentivo e pelo apoio constantes que me deu coragem para questionar realidades e propor sempre um novo mundo de possibilidades.

SUMÁRIO

Agradecimentos

Resumo

Abstract

SUMÁRIO.....	12
<i>LISTA DE FIGURAS</i>	15
<i>Lista de símbolos e abreviaturas.....</i>	17
Introdução.....	19
Incidência de câncer no Brasil e no mundo	20
Processo carcinogênico.....	21
Ambiente tumoral	24
Leucemia mielóide crônica.....	35
Objetivo.....	40
Metodologia.....	42
FRACIONAMENTO DO PLASMA.....	43
Determinação da Concentração das Proteínas.....	44
Cultura de células de leucemia mieloide crônica	45

Caracterização do perfil de proteínas totais através de espectrometria de massa.....	45
Analise cromatologica liquida com espectrometria de massa em tandem.....	46
Análise dos dados e bio informatica.....	47
Viabilidade celular	49
Ciclo celular	50
Extrusao e Intrusão.....	50
ANÁLISE ESTATÍSTICA	51
Resultados.....	52
Ciclo celular	54
Resistência adquirida.....	55
Extrusão e intrusão.....	57
Estudo do efeito da restrição lipídica e sérica	58
Discussão.....	74
Alterações metabólicas	76
Ciclo celular	77
CCNB2.....	79
CDK5	80
<i>Desenvolvimento de resistência a fatores ambientais.....</i>	<i>81</i>
<i>Desenvolvimento de resistência a multiplas drogas</i>	<i>84</i>
Conclusão	89

Anexos.....	91
<i>Anexo 1:</i>	92
<i>Anexo 2:</i>	93
<i>Anexo 3</i>	94
<i>Anexo 4</i>	95
<i>Anexo 5</i>	96
<i>Anexo 6</i>	97
Bibliografia	119

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 GRÁFICO CONTENDO A PROJEÇÃO DO NÚMERO DE MORTES, EM MILHÕES, DAS CAUSAS SELECCIONADAS MAIS USUAIS,	22
.....	
FIGURA 2- <i>REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS ETAPAS DO PROCESSO DE CARCINOGÊNESE</i>	25
.....	
FIGURA 3- DIAGRAMA DO CICLO DE LANDS.	35
.....	
FIGURA 4 A AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR DA LINHAGEM K-562 EXPOSTAS A RESTRIÇÃO NUTRICIONAL E RESTRIÇÃO LIPÍDICA.....	54
.....	
FIGURA 5 NA ¹ LISE DO CICLO CELULAR DAS CÉLULAS K562 CULTIVADAS EM CONDIÇÕES NORMAIS, RESTRIÇÃO SÉRICA E LIPÍDICA PELOS PERÍODOS DE A) 24H E B)	56
.....	
FIGURA 6- QUANTIFICAÇÃO (% DE EVENTOS) DAS CÉLULAS K562 NAS FASES DO CICLO CELULAR CULTIVADAS EM CONDIÇÕES NORMAIS, RESTRIÇÃO SÉRICA E LIPÍDICA PELOS PERIODOS DE A) PH- B)H ₂ O ₂ - C) DOXORRUBICINA-D) VINCristinaE) AAs-.....	57
.....	
FIGURA 7- AVALIAÇÃO A INTRUSÃO E EXTRUSÃO.....	58
.....	
FIGURA 8-: ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA) 24 H (A) E 72 H (B).....	60

FIGURA 9- DIAGRAMA DE INTENSIDADE (HEATMAP) DO AGRUPAMENTO HIERRQUICO DE PROTEINAS REGULADAS ($P<0,05$) APÓS INCUBAÇÃO COM LPDS (A E B) OU EM RESTRIÇÃO SÉRICA (C E D) POR 24 E 72 H.....61

FIGURA 10- GRÁFICO VOLCANO DAS PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE REGULADAS EM UMA COMPARAÇÃO PAR A PAR DA LINHAGEM K562 CONTROLE E K562 EM RESTRIÇÃO LIPIDICA POR 24 H (A) E 72 H (C), RESTRIÇÃO SÉRICA 24H (C) E 72 (D),.....62

FIGURA 11 - NETWORK 1:PROTEÍNAS QUE POSSUEM AS SEGUINTE FUNÇÕES: SOBREVIVÊNCIA E MORTE CELULAR, CRESCIMENTO E PROLIFERAÇÃO CELULAR, DOENÇAS INFECIOSAS70

FIGURA 12- NETWORK 2- :PROTEÍNAS QUE POSSUEM AS SEGUINTE FUNÇÕES: CICLO CELULAR, SOBREVIVÊNCIA E MORE CELULAR, DESENVOLVIMENTO CELULAR71

FIGURA 13 **NETWORK 3** :PROTEÍNAS QUE POSSUEM AS SEGUINTE FUNÇÕES: MORTE CELULAR, CICLO CELULAR, CRESCIMENTO E PROLIFERAÇÃO CELULAR.....72

FIGURA 14 **NETWORK** :PROTEÍNAS QUE POSSUEM AS SEGUINTE FUNÇÕES: SOBREVIVÊNCIA E MORTE CELULAR, CICLO CELULAR, CRESCIMENTO E PROLIFERAÇÃO CELULAR.....73

FIGURA 15-**NETWORK** :PROTEÍNAS QUE POSSUEM AS SEGUINTE FUNÇÕES: REPLICAÇÃO E REPARAÇÃO DO DNA , DESORDENS DO TECIDO CONJUNTIVO74

LISTA DE SÍMBOLOS E ABBREVIATURAS

Sigla	Definição
A549	Linhagem celular de carcinoma pulmonar humano
	Proteína de resistência a múltiplas drogas do grupo B1 dependente de
ABCB1	ATP
ABL	Oncogene homólogo a leucemia viral Abelson murine
ARNT	Receptor nuclear de aril hidrocarbono
BCR	Cluster de quebra proteica
BSA	Soroalbumina bovina
CB	Crise blástica
CCNB2	Ciclina B2
CDK	Quinase dependente de ciclina
CRKL	Proteína similar à Crk (do inglês: CRK-like)
CXCL12	CXC quimiotática para Linfócitos e Monócitos
CYP	Citocromo P450
DEPTOR	Domínio DEP contendo a proteína de interação com mTOR
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FAK	Quinase de adesão local
FGF	Fator de crescimento fibroblástico
G α 1	Proteína que se liga ao mTOR para formar o complexo mTOR1
GRB2	Factor de crescimento ligado ao receptor protein 2
GSH	Forma reduzida da glutationa
GST	Glutationa S-tranferase
HCT116	Linhagem celular de câncer de cólon humano
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HeLa	Linhagem celular de câncer cervical humano
HIF	Fatores induzidos por hipóxia
HMG-CoA	3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A
HRES	Elementos responsáveis à hipóxia
IAPS	Proteína inibidora de apoptose

LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LMA	Leucemia mielóide crônica
LMC	Leucemia mielóide crônica
LPCAT 3	Isofosfatidilcolina aciltransferase 3
LPDS	Desordens linfoproliferativas
MAPK	Proteína quinase ativada por mitogenese
MCalV	Câncer murino no IV estágio
MEF	Fator potenciador dos miócitos
MEK1	Proteína quinase ativada por mitogenese quinase 1
MEK2	Proteína quinase ativada por mitogenese quinase 2
MGST	Glutationa S-tranferase microsomal
mRNA	RNA mensageiro
MTOR	Proteína alvo de rapamicina mamífera
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide
P34CDC2	Proteína quinase que é um regulador universal da fase M do ciclo celular
P85	Proteína reguladora de fosfatidilinositol 3-quinase
P-gP	P-glicoproteína atualmente classificada como ABCB1
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
PYK2	Proteína tirosina quinase 2
RAF	Proto-oncogene serina/treonina-proteína quinase
RAS	Vírus do sarcoma de rato
ROS	Especies reativas do oxigênio
SFB	Soro fetal bovino
SH2	Src Homologa 2
SOS	Proteína homóloga ao gene Son-of-sevenless
SRC	Proto-oncogene tirosina-proteína quinase Src
TKI	Inibidor de tirosina quinase
TSC	Complexo de esclerose tuberosa
VEGF	Fator de crescimento de entotélio vascular
VPR	Proteína viral R

INTRODUÇÃO

INCIDÊNCIA DE CÂNCER NO BRASIL E NO MUNDO

A industrialização e urbanização atreladas aos avanços na área da medicina e da ciência farmacêutica contribuíram para a alteração do padrão demográfico mundial. Nesta nova conjuntura houve a diminuição das taxas de natalidade e mortalidade, o incremento da expectativa de vida, o envelhecimento populacional e, consequentemente, a modificação nos padrões de saúde-doença caracterizados pela alteração no perfil de mortalidade com diminuição da taxa de doenças infecciosas e o aumento da taxa de doenças crônicas-degenerativas, especialmente doenças cardiovasculares e câncer. Em 2005, o número de mortes causadas pelo câncer representaram 21,7% dos óbitos mundiais. Estima-se que em 2020, o número de casos novos seja da ordem de 15 milhões por ano (Figura 1) [1].

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde, no Brasil, a porcentagem de pessoas que falecem devido ao câncer corresponde a 11,84% do total de óbitos, o que faz do câncer a segunda maior causa de mortes. [2]

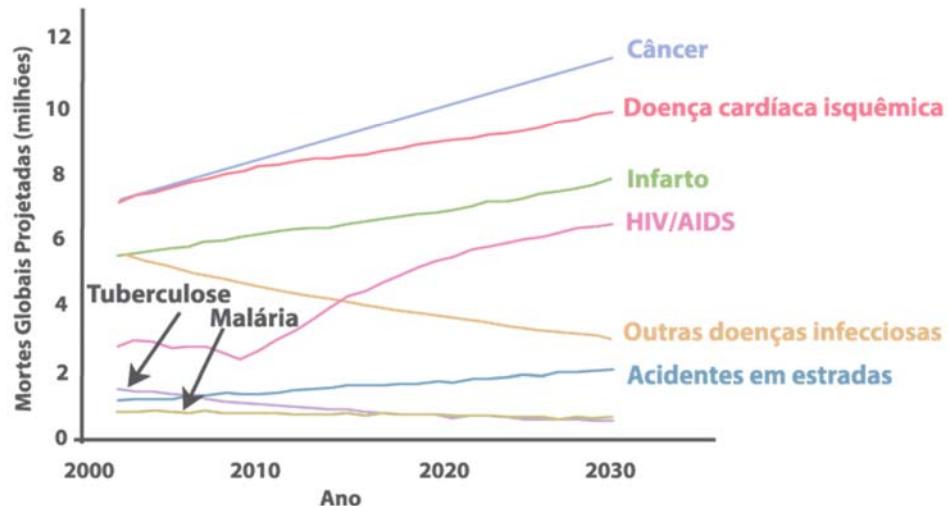


Figura 3-Mortes projetadas por causas selecionadas. Gráfico contendo a projeção do número de mortes, em milhões, das causas selecionadas mais usuais, este gráfico contempla os dados que vão do ano 2000 a 2030. Adaptado de: World Health Statistics 2007 (<http://www.who.int/healthinfo/>) in [1]

PROCESSO CARCINOGÊNICO

Câncer é um termo genérico, utilizado para definir um grande grupo de doenças que podem afetar qualquer parte do corpo. A capacidade de reprodução das células tumorais desobedecendo os limites normais da divisão celular, assim como a colonização de regiões destinadas a outros tipos celulares são as duas propriedades hereditárias utilizadas para definir uma célula carcinogênica [3]. A maioria dos cânceres origina-se de células normais que sofreram alterações gênicas que conferiram a estas células as características supracitadas. A transformação de uma célula normal em uma célula

cancerígena é um processo que requer múltiplos estágios, nos quais ocorrem diversas alterações genéticas e epigenéticas. Essas alterações celulares são favorecidas principalmente por duas causas: a interação do indivíduo com agentes carcinogênicos [4] e/ou o envelhecimento, uma vez que nos indivíduos mais velhos os mecanismos de reparação celular se tornam menos eficientes, o que leva ao aumento de alterações genéticas [5].

Outra característica das células carcinogênicas consiste no fato destas células viverem mais que as células saudáveis e muitas vezes não entram em apoptose. Este é um processo fisiológico natural, caracterizado por alterações morfológicas, que incluem perda da membrana plasmática, divisão assimétrica, condensação do citoplasma e do núcleo e a clivagem internucleossomal de DNA [3]. A falha no processo apoptótico pode conferir às células resistência aos tratamentos quimioterápicos convencionais. Estudos recentes indicam que isto ocorre principalmente devido a superexpressão da família de proteínas inibidoras de apoptose (IAPS) [6]. Estas proteínas inibem a ação das caspases e regulam os fatores-kB nucleares, e encontram-se superexpressas em diversas linhagens celulares cancerígenas. [7]. A survivina é um membro desta família, e está envolvido em várias funções essenciais, incluindo a sobrevivência celular e regulação da mitose no câncer [8]. Survivina pode antagonizar a morte celular ao promover a ativação das caspases efetoras, uma vez que foi demonstrado que inibem a caspase 9 [9]. Esse gene tem uma baixa expressão em células de adultos saudáveis. No entanto, em células tumorais a super-expressão deste está relacionada a um aumento da malignidade do tumor, bem como o desenvolvimento de resistência a quimioterapêuticos ou de radiação [10].

O processo tumorigênico é constituído por diversas etapas, que podem ser subdivididas em três fases distintas:

- 1) Estágio de iniciação: ocorre a acumulação de modificações genicas nas células saudáveis [11, 12].
- 2) Estágio de promoção: As células iniciais devem ser expostas, por um período extenso, a um segundo grupo de agentes cancerígenos intitulados oncopromotores, que promovem a transformação de células iniciais em malignas. Caso a suspensão do contato da célula com os agentes promotores ocorra neste estágio, pode haver a interrupção da formação tumoral [13, 14].
- 3) Estágio de progressão: é caracterizado pelo aumento do índice mitótico das células que estão sofrendo alterações; esta etapa é irreversível e a partir dela, há a instalação do câncer e aparecem os primeiros sinais clínicos [15].

Os fatores que contribuem para o desenvolvimento tumoral podem estar vinculados a fatores hereditários e ambientais. Os fatores hereditários são geneticamente pré-determinados e podem estar associadas à herança genética de um alelo mutado de um proto-oncogene, gene supressor de tumor ou gene relacionado ao reparo de DNA. Apesar dos fatores endógenos terem um papel no desenvolvimento de neoplasia, os principais fatores de risco são os exógenos. Segundo estimativas, estes fatores desempenham um papel preponderante em 80% a 90% dos casos. É importante salientar que a probabilidade da formação de um tumor devido a exposição individual a fatores exógenos é uma relação diretamente proporcional à intensidade e tempo de exposição

a um fator ou múltiplos fatores, que podem ser químicos, físicos ou biológicos, conforme figura 2 [16-19].

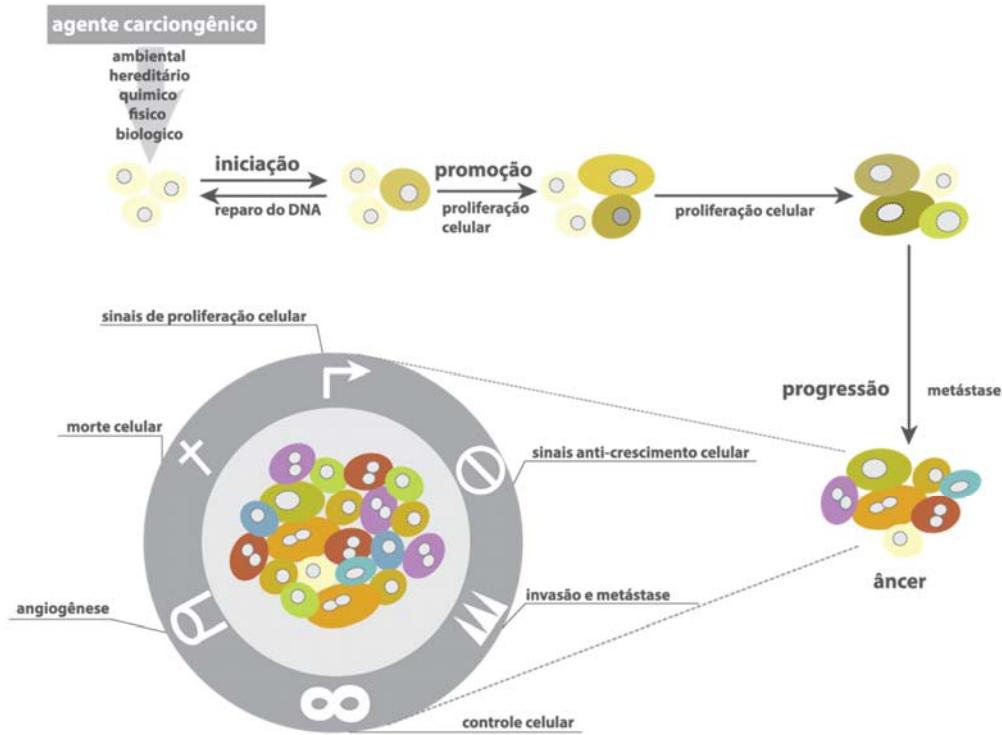


Figura 4 - Representação esquemática das etapas do processo de carcinogênese.

AMBIENTE TUMORAL

A interação entre as células cancerígenas e o seu microambiente desempenha um papel crucial no desenvolvimento tumoral, já que muitas das alterações que perturbam a homeostase celular e tecidual presentes no câncer podem ser induzidas por fatores de stress presentes neste ambiente [20], cuja composição inclui células

tumorais, vasos sanguíneos, matriz extracelular, células não malignas e moléculas de sinalização. Entre as células não tumorais presentes nesse ambiente encontram-se células do estroma, os fibroblastos, linfócitos T, linfócitos B, natural killers, macrófagos e adipócitos [21].

Os adipócitos estão amplamente presentes no microambiente tumoral e os fatores secretados por eles melhoram a mobilidade celular e promovem a expressão de genes associados com os fenótipos mais agressivos. Os lipídeos derivados dos adipócitos aparentemente impactam a progressão tumoral e metástase no câncer [22, 23]. As células estromais e fibroblastos, por sua vez, secretam fatores de crescimento, tais como o fator de crescimento de hepatócitos (HGF), fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e CXCL12 quimiocina, que não só podem promover o crescimento e sobrevivência das células malignas, mas também funcionar como um quimio-atrativo que estimula a migração de outras células para o microambiente tumoral [24].

A matriz extracelular também é um componente importante, uma vez que fornece uma estrutura de suporte físico para todas as células do microambiente e, geralmente, nas fases mais avançadas de progressão tumoral, perde seu padrão de organização normal, o que pode estimular a angiogênese. Ela possui, também, uma grande variedade de componentes bioquimicamente distintos, composta majoritariamente por proteínas, glicoproteínas, proteoglicanos e polissacáideos com diferentes propriedades físicas e bioquímicas, que são sintetizados pelas diferentes células do microambiente tumoral [21].

Quando o tumor ainda apresenta um tamanho diminuto, o acesso a nutrientes depende da difusão dos mesmos do espaço extravascular para o interior da massa

tumoral. Este fluxo de nutrientes diminui com a progressão do tamanho do tumor conforme aumenta a distância entre as células tumorais e os vasos [25]. Assim, a proliferação das células tumorais depende do desenvolvimento de um sistema vascular de apoio. Folkman foi o primeiro a descrever essa hipótese. Em seus estudos, ele encontrou indícios de uma fase inicial pré-vascular durante a qual as células tumorais poderão crescer e proliferar até que o tumor atinja 1-2 mm; o crescimento adicional desta massa tumoral deve ser precedida pelo incremento do número de micro vasos presentes no tumor [26, 27]. O desenvolvimento dessa vasculatura possui um efeito significativo sobre a taxa de crescimento do tumor, podendo passar de um crescimento lento e linear no período pré-vascular para um crescimento rápido e quase exponencial após a vascularização do tumor [28].

A vasculatura presente no tumor é estruturalmente distinta da presente nos tecidos saudáveis. Os vasos presentes no tumor possuem um diâmetro irregular e um padrão de ramificação anormal, fazendo com que eles não se encaixam bem na classificação usual das arteríolas, capilares ou vasos. Nos vasos tumorais, tanto de alto como de baixo calibre, é frequente a ausência da túnica lisa, uma túnica extremamente fina. Outras anormalidades incluem uma captação não usual, assim como uma alta ligação com lipossomos catiônicos e uma expressão de integrinas, fatores de crescimento e receptores que diferem das dos vasos normais [29]. Outro fator que distingue o vaso sanguíneo do tumor do vaso presente no tecido normal é o fato desse exibir irregularidades no lúmen e presença de extravasamento plasmático, fenômeno que pode ser explicado por defeitos na monocamada endotelial [30]. Estudos realizados por McDonald et al. [29] em carcinomas mamários implantados em ratos MCA-IV, indicam

que 14% da área da superfície dos vasos tinha uma monocamada endotelial defeituosa composta de células morfologicamente distintas das células endoteliais normais. A maior parte das células tinha uma forma anormal, desde ligeiramente irregular para multipolar com projeções citoplasmáticos de 50 mm. Estes endotélios possuem são parcialmente constituídos por células sobrepostas umas as outras e fracamente interligadas, além de aberturas entre as células de cerca de 0,3ma 4.7 mm o que causa o extravasamento de plasma, além anormalidades visíveis na superfície luminal [27] .

As descobertas supracitadas indicam que as superfícies do endotélio dos vasos do tumor são anormais. Defeitos na monocamada endotelial podem explicar o extravasamento plasmático dos vasos; a alteração morfológica que têm sido implicada neste fenômeno é a abertura entre as células que revestem vasos conhecida como fenestra. O extravasamento plasmático aumenta a pressão do fluido intersticial, levando à irregularidade do fluxo de sangue e de nutrientes [31], resultando no extravasamento de proteínas do plasma e eritrócitos, o que pode facilitar o tráfego de células tumorais para a corrente sanguínea, levando a formação de metástases [29], e compromete a distribuição de nutrientes e oxigênio ao tecido tumoral. A intermitência do fluxo sanguíneo atrelado a alta taxa metabólica das células tumorais faz com que, muitas vezes, as exigências nutricionais dessas células não possam ser cumpridas, o que contribui para o surgimento de regiões que apresentam hipoxia, restrição nutricional e acidose [32].

Os organismos multicelulares necessitam de oxigênio (O_2) para a respiração e produção de energia. Quando há diminuição da disponibilidade de O_2 , ocorrem alterações moleculares em tecidos normais e neoplásicas [33, 34]. Sendo uma das alterações mais comuns a ativação de fatores de indução hipoxia (HIF). O HIF é um fator

de transcrição heterodimérico consistindo por duas subunidades HIF-1 α (O₂ regulada) e HIF-1 β /ARNT, sendo ambas expressas de forma constitutiva, com regulação exata da subunidade α [35]. O HIF-1 conduz à transcrição de genes críticos responsáveis para a angiogênese, o metabolismo da glicose, invasão e destino celular. A expressão de um fator de transcrição pode ser determinada pelas taxas de síntese e degradação de proteínas [36, 37].

A síntese de HIF-1 α é regulada por mecanismos independentes de oxigênio enquanto que a degradação é regulada por mecanismos dependentes de oxigênio. A disponibilidade de oxigênio promove a ligação de HIF-1 α com a proteína supressora de tumor de Von Hippel-Lindau (VHL), o que por sua vez leva a ubiquitinização da HIF-1 α . Subsequentemente a subunidade HIF-1 α é hidroxilada pela enzima prolijidroxilase (PHF) facilitando a sua degradação num modo dependente do oxigénio [38, 39]. No entanto, em condições hipóxicas, a disponibilidade limitada de oxigénio inibe PHF e consequentemente a degradação da HIF-1 não ocorre. O HIF-1 acumulado liga-se a vários elementos de resposta à hipoxia (HREs), resultando na expressão de genes de resposta a hipoxia, também conhecidos como genes alvo de HIF, tais como lactato desidrogenase, anidrase carbônica, fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), etc [40].

Preservando o suprimento de O₂ e aumentando a capacidade glicosídica [41] realizaram um dos primeiros estudos sobre a consumo de glicose no tecido tumoral e observou altas taxas de produção de ácido láctico. A taxa de absorção de glicose foi diretamente proporcional à disponibilidade de glicose, isto é, o consumo de glicose era governado pelo fluxo sanguíneo do tumor assumindo concentrações constantes de glicose arterial durante a normoglicemia. Este estudo *in vivo* revelou, ainda, uma privação

de nutrientes e uma remoção insuficiente de resíduos metabólicos, predominantemente ácido láctico, causando acidose tecidual. Como regra, a quantidade de lactato liberado é linearmente relacionada com a quantidade de glicose consumida [42]. O desenvolvimento de acidose no interior do tumor ocorre quando há disponibilidade de glicose para as células cancerígenas em hipóxias. Essa condição ocorre com certa frequência, uma vez que a distância de difusão para a glicose é maior do que para o O₂, acarretando na produção excessiva de ácido láctico e ácido carbônico (HCO3-) através da ativação da glicólise, que resulta no pH ácido. Além disso, o pH das vesículas exosmóticas e lisossômicas no interior das células tumorais tendem a ser mais ácido do que o pH citosólico [43]. A acidose pode modular a cito toxicidade de certas drogas anti-cancerígenas. [44].

No ambiente hipóxico, além do HIF, é ativada a via do mTOR e UPR, diversos elementos de ambas as vias são alterados no ambiente hipóxico dependendo da duração e severidade da restrição. O mTORC1 ativa os estímulos de crescimento celular, a hiperativação do mTORC1 pode ter efeitos negativos no funcionamento celular, como o aumento do stress do reticulo endoplasmático gerado pelo incremento da síntese proteica devido à taxa elevada de transcrição de mRNA [45]. Na via da mTOR, a ausência de O₂ causa a inibição desta quinase e transcrição, por diversas vias, de mRNA, causando a alteração da progressão e tolerância à restrição de O₂ da célula cancerígena em favor de desenvolvimento do tumor [46].

A UPR (resposta à proteína mal dobrada) é ativada em resposta ao stress do reticulo endoplasmático e à perturbação do balanço da homeostase celular. Esse stress promove o acúmulo de proteínas mal formadas (estrutura quaternária não

completamente formada ou com erros no dobramento), desencadeando a ativação da UPR, o que compromete a produção proteica, metabolismo celular e morte celular. Esta ativação ocorre quando o tecido encontra-se em hipóxia severa, promovendo a tolerância celular a essa condição e auxiliando na adaptação celular e sobrevivência tumoral. Esta via também pode afetar a morte celular por apoptose [47].

Recentemente foram realizados estudos em células MEF⁻ (células fibroblásticas de camundongos) cultivadas sob restrição sérica e O₂, e encontrou-se células altamente proliferativas que apresentavam mTORC1 desregulado (TSC2^{-/-}, p53^{-/-}) a sofrer morte celular programada gerada pela deficiência de lípido insaturado [48]. A demanda por estes lipídios ocorre em várias linhagens cancerígenas distintas [49]. Nesse caso, a morte celular ocorreu porque a dessaturação *de novo* de lipídios sintetizados por dessaturases esteoril-CoA redutase, requer O₂ e a ausência de O₂ inibe a reação enzimática necessária. As células MEFs-, altamente proliferativas, com uma desregulação do mTORC1 (Tsc2^{-/-}, p53^{-/-}), quando cultivados em condições de restrição sérica e de O₂ semelhantes às encontradas no microambiente tumoral, iniciavam o processo de morte celular programada devido a uma deficiência específica de lipídeos não saturados [48].

Esta demanda por lipídeos não saturados apresenta-se em múltiplas linhagens tumorais e já foi demonstrada em experimentos *in vivo* realizados em camundongos Tsc2^{-/-} com adenomas renais císticos [49]. A restrição lipídica para as células hipóxicas causa uma deficiência crítica desse componente, gerando stress do retículo endoplasmático e a ativação da morte celular mediada pela UPR, que nas condições de restrição nas quais a célula está inserida é dependente de mTORC1, sendo provavelmente causada pelo aumento que esta quinase gera na síntese proteica [48].

O HRE1 α é necessário para que ocorra o processo apoptótico perante a privação lipídica em Tsc2^{-/-} MEFs, indicando que o menor índice de sobrevivência é consequência da sinalização terminal da UPR. Essas descobertas sugerem que as células em processo proliferativo precisam balancear seu índice de crescimento com disponibilidade de lipídeos não saturados, afim de prevenir o stress do reticulo endoplasmático, já que este acarretaria a ativação da UPR terminal, culminando, por fim, na morte celular [49].

O aumento do metabolismo celular, assim como da taxa de duplicação celular, repercutem no incremento na demanda de colesterol, que é incorporado em membranas de fosfolípidos, armazenado em gotículas lípicas e usado para a produção de lípidos de sinalização. [50]. O colesterol e lipídeos podem ser produzidos pela própria célula ou adquiridos por vias exógenas. Há ampla evidência de que o aumento da produção de lípidos é fundamental para a sobrevivência da célula cancerigena [51, 52] Embora a demanda celular por ácidos graxos possa ser quase que inteiramente suprida pela síntese a partir de carbono derivado de glucose, a absorção de ácidos graxos pelas vias exógenas também é uma importante fonte de lípidos. Em animais multicelulares, as células também podem obter o colesterol e ácidos graxos livres do sangue e triglicérides das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) presentes no plasma, através de endocitose mediada por receptor e o processamento lisossomal [53]. A LDL é um dos cinco grupos principais de lipoproteínas e o principal transportador sanguíneo de colesterol. A LDL é uma partícula quase esférica composta por moléculas de colesterol esterificado e não-esterificado, triglicéridos e fosfolípidos [54].

O controle celular de importação e biossíntese de colesterol ocorre por regulação por *feedback* de receptores de LDL e de 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase, a enzima limitante da velocidade da via do mevalonato. Quando os níveis de LDL são elevados, a HMG-CoA redutase em células normais é reduzida em até 90%, e a síntese de colesterol é bloqueada. [55] Contudo quando os níveis celulares de esterol estão elevados, ou quando a proliferação e a necessidade de colesterol são baixos, a transcrição do receptor de LDL. [56].

Os efeitos da razão entre os fosfolipídios saturados e insaturados no metabolismo celular têm sido extensamente estudados. O estresse do retículo endoplasmático é alterado de acordo com a composição lipídica da célula. Por exemplo, o acúmulo de colesterol livre no retículo endoplasmático [57] e a internalização de ácidos graxos saturados induzem o estresse do retículo endoplasmático além de ativarem a via da UPR [58]; Para prevenir a instauração do quadro de estresse do retículo endoplasmático, aparentemente, é necessário que haja o balanço entre estes dois tipos lipídicos, o que se deve ao fato dos efeitos lipotóxicos dos lipídeos saturados poderem, muitas vezes, ser revertidos através da adição de lipídeos não saturados. Quando ocorre a modificação do perfil lipídico para um cenário onde haja uma maior proporção de lipídeos saturados, em decorrência da administração de lipídeos saturados ou a perda da atividade de enzimas responsáveis pela desnaturação lipídica , ocorre a indução do estresse do retículo endoplasmático que culmina na ativação das vias de morte celular [59, 60].

Apesar da relação entre a razão entre lipídeos saturados e insaturados com o estresse do retículo endoplasmático ter sido estabelecida, as espécies lipídicas e compartimentos celulares que são críticos para este efeito ainda não foram

completamente elucidados. Há indícios de que o stress do retículo endoplasmático lipo induzido é causado pela alteração da estrutura do retículo endoplasmático através da incorporação de fosfolípides saturados à sua membrana [61]. A composição dos fosfolípides dessa membrana afeta a fluidez da mesma e consequentemente a configuração de seus subdomínios [62]. A saturação do gradiente de fosfolípides pode ser influenciada por diversos fatores, como por exemplo, o índice de saturação dos ácidos graxos celulares. Um outro fator capaz de alterar este gradiente é o ciclo de Lands (figura 3). No qual ocorre a regulação do tamanho da gotícula lipídica formada, através do controle da quantidade de superfície disponível e influenciando a percentagem de superfície em relação ao volume, a modificação do tamanho lipídico influênciaria na dinâmica e processamento deste dentro da célula [63] através da desacilação e reacilação de ácidos graxos. A LPCAT3, uma enzima capaz de alterar a composição plasmática do retículo endoplasmático, contribui para o incremento da fração de lípidos insaturados na membrana por meio da incorporação preferencial de ácidos araquidônico e linoleicos nos fosfolipídeos. O aumento da captação de lipídeos insaturados é necessário para a manutenção da viabilidade celular, especialmente em células com altos índices de síntese proteica, o que se deve ao papel essencial dos lipídeos na manutenção da homeostase do retículo endoplasmático através do contrabalanceamento dos efeitos dos lipídeos saturados [61].

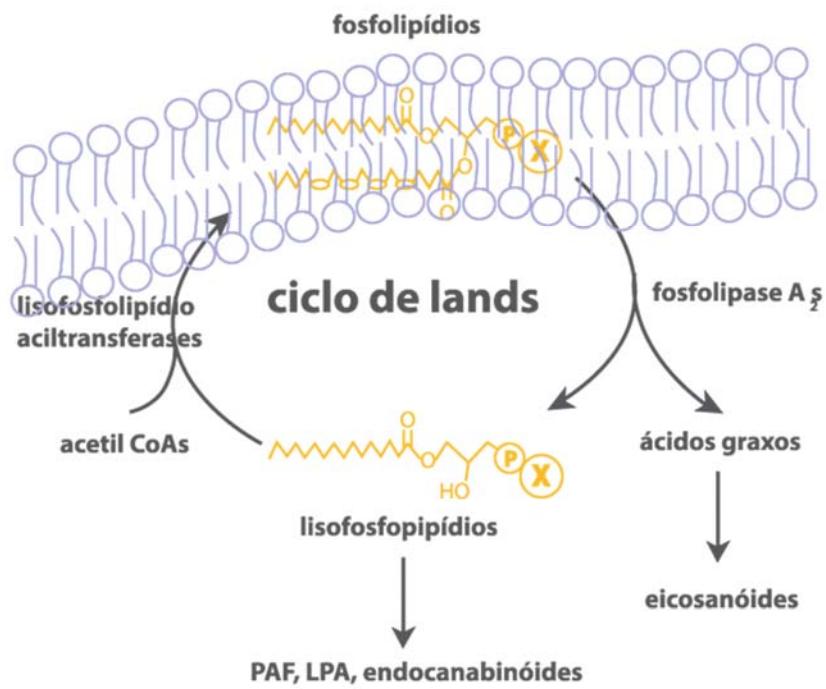


Figura 5- Diagrama do ciclo de lands.

Um outro efeito do aumento da concentração celular de lipídeos saturados é a elevação nos níveis de espécies óxido reativas (ROS), o que também pode promover a morte celular. Os mecanismos de síntese das ROS no quadro de stress lipídico induzido ainda não foi inteiramente elucidado; a privação de lipídios insaturados pode causar uma disfunção mitocondrial, que pode elevar a concentração de ROS e gerar estresse do retículo endoplasmático, causando a liberação de ROS que gera dano oxidativo [64].

A importância da existência de uma fonte lipídica exógena para o crescimento tumoral sugere que a dieta do indivíduo pode vir a afetar o metabolismo celular, uma vez que esta influencia diretamente a quantidade de lipídeos que podem vir a ser

internalizados pela célula cancerígena. A obesidade tem sido conhecida por aumentar o risco de alguns tipos de câncer, com até 5% de incidência de câncer atribuíveis ao excesso de peso [65]. Esse aumento no risco de câncer pode ser parcialmente explicado pelo fato da dieta poder estar associada a alterações hormonais, a liberação de citocinas e inflamação [22]. As células hipóxicas exibem aumento da absorção de lipídio insaturado [19] e em estudos *in vitro*, há uma expressão elevada dos receptores de LDL [66, 67]. Em tumores cerebrais, a internalização de LDL é de 2 a 3 vezes maior que em células normais [68], enquanto que em células de leucemia, o aumento da atividade do receptor de LDL pode ser de até 100 vezes a expressão de células normais. Esse aumento na captação de colesterol está diretamente relacionado com a agressividade do tumor [69].

Leucemia mielóide crônica

A leucemia mielóide crônica (LMC) é uma mieloproliferação maligna que corresponde a 15% dos casos globais de leucemia, com maior incidência em indivíduos do sexo masculino com mais de 55 anos. As células neoplásicas mantém a capacidade de diferenciação celular e, em 90% dos casos, possuem como característica distintiva a translocação recíproca entre o gene ABL presente no cromossomo 9 e o gene BCR presente no cromossomo 22, o que resulta na formação de um cromossomo Filadélfia (ph) que codifica a proteína quimérica BCR-ABL [70].

Tanto a proteína ABL como a BCR atuam na sinalização celular. A ABL é uma tirosina quinase (non-receptor) expressa na maioria dos tecidos. Nas células, esta

proteína encontra-se tanto no citoplasma como no núcleo, e realiza sinalização para aumento de fatores de crescimento da superfície celular e receptores de adesão responsáveis pela regulação do citoesqueleto. A BCR é uma serina-treonina quinase que atua como regulador negativo da proliferação celular e transformação neoplásica [71].

Estudos bioquímicos clássicos sugerem que o proto-oncogene BCL-ABL é uma tirosina quinase constitutivamente ativa, cujos efeitos biológicos incluem o aumento da proliferação celular, ativação de fatores de transcrição, evasão de apoptose, crescimento celular descontrolado e diferenciação [72]. A maioria destes efeitos biológicos são regulados através de uma rede central de sete proteínas intimamente associadas. Eles compreendem proteínas adaptadoras, fosfatases e a subunidade p85 reguladora de PI3K . A maioria dos efeitos biológicos são regulados através de múltiplas vias, por exemplo, a polimerização de actina é regulada através da proteína do factor de crescimento ligado ao receptor 2 (GRB2) [73].

A proteína BCR-ABL interage com uma proteína adaptadora ligada ao receptor GRB2 pela homologia com SRC proximal 2 (SH2), que se desenvolve ligando-se ao local quando a tirosina 177 (Y177) resíduo de BCR-ABL é autofosforilado. GRB2, quando ligado à BCR-ABL, interage com a proteína SOS, formando o complexo de proteína BCR-ABL-GRB2-SOS que ativa Ras [74]. As proteínas adaptadoras CRKL (CRK-like) e SHC (SH2 contendo proteínas) também podem mediar a ativação BCR-ABL de Ras [75, 76], que juntamente com a proteína quinase ativada via mitogéno (MAPK) que são acoplados por Raf (uma serina / treonina quinase). Raf catalisa a fosforilação da ativadas por meio da mitogenese e por sinais extracelulares regula as quinases MEK1 e MEK2; isto resulta na sua ativação. Através da estimulação da via de Ras-Raf, BCR-ABL aumenta o crescimento

celular independente de fator de crescimento. BCR-ABL também associa e ativa a via fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K), suprimindo a morte programada de células e aumenta a sobrevivência celular. BCR-ABL é associado a componentes da adesão focal (isto é, a atina, a paxilina e quinase de adesão focal, ou FAK); a ativação de CRKL-FAK-PYK2 leva a uma redução na adesão celular [77, 78]. A BCR-ABL ativa também as vias que levam a respostas atípicas para fatores quimiotáticos, o que leva a um aumento na migração celular, além de se associar com as proteínas de sobrevivência [79].

A LMC tem como tratamento padrão segundo a National Comprehensive Cancer Network e LeukemiaNet Europeia (ELN) [80], o imatinib, um inibidor tirosina-quinase projetada *in vitro* (TKI), que bloqueia o sitio de ligação do BCR-ABL com o ATP. Contudo a eficácia do imatinib diminui durante as fases aguda e blástica, fazendo com que a progressão da doença afete a taxa de resposta dos pacientes a esse inibidor [81]. As alterações na biologia celular das células de LMC na crise blástica CB podem explicar esta redução na eficácia do TKI, o que ocorre devido ao surgimento de mutações pontuais especialmente no sítio de ligação da droga [81-83]. Atualmente, inibidores de segunda geração, como nilotinib (Tasigna, AMN107; Novartis), são usados no tratamento dos pacientes resistentes. Mas nem sempre são eficientes [84] já que promovem o desenvolvimento de resistência [85]. Outros mecanismos de resistência não relacionados à estrutura de BCR-ABL podem estar envolvidos, como, por exemplo, a presença de células tronco quiescentes, inibição do influxo e mecanismos de efluxo de drogas, alterações decorrentes do grande acúmulo de instabilidade gênica como consequência da fisiologia da doença [86-89].

Há cada vez mais evidências suportando a ideia de que o microambiente da medula óssea desempenhe um papel crucial na iniciação, propagação das leucemias e desenvolvimento dos mecanismos de resistência supracitados [21]. Apesar da maior síntese de colesterol a restrição lipídica e sérica presentes no microambiente são um fatores de estresse celular e pode contribuir para a progressão do quadro em muitos tumores malignos, incluindo leucemias mielóides aguda (LMA) e crônica. As células de leucemia mielóide possuem uma taxa de processamento de LDL mais elevado que as células sanguíneas saudáveis. Os níveis elevados de colesterol celular pode também melhorar a sobrevivência de células de leucemia e conferir resistência em relação à terapia [90].

A compreensão de como as células cancerígenas superam estas adversidades, pode ser adquirido através do entendimento das redes de proteínas e genes centradas nas proteínas reguladoras supressoras de tumor [91, 92]. A proteômica é uma ferramenta com a qual é possível caracterizar a estrutura das proteínas, função, as interações proteína- proteína e modificações de peptidos. Isso proporciona uma visão sobre as perturbações de vias de sinalização dentro das células tumorais e tem contribuído para a descoberta de novos alvos terapêuticos e possíveis indicadores de resposta e duração da terapia, assim como a identificação de e possíveis alterações celulares causadas pelo estresse causados pelas restrições nutricionais presente no microambiente tumoral [93].

Apesar de nos últimos anos ter havido o incremento de estudos sobre as restrições nutricionais presentes no microambiente tumoral e de muitos desenhos experimentais utilizarem a restrição sérica como modelo, pouco se sabe sobre os efeitos das restrições lipídica e sérica nas células tumorais e seus possíveis efeitos no

desenvolvimento da carcinogêneas tumoral. Neste trabalho nos avaliamos o efeito de ambas as restrição na viabilidade celular da linhagem K562, além de investigar os mecanismos biológicos desencadeados pela restrição sérica ou lipídica através de uma abordagem proteômica comprehensiva.

OBJETIVO

OBJETIVO GERAL:

Estudar a influência da restrição sérica e lipídica em um modelo de leucemia mielóide crônica (K562) *in vitro*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Avaliar o efeito da restrição sérica ou lipídica na viabilidade celular da linhagem K562

Investigar os mecanismos biológicos desencadeados pela restrição sérica ou lipídica através de uma abordagem proteômica comprehensiva

METODOLOGIA

Para os experimentos realizados neste trabalho foram utilizados reagentes P.A e meio R.M.I da marca Sigma, St Louis, MO.

FRACIONAMENTO DO PLASMA

O LPDS foi isolado a partir de um *pool* de quatro bolsas de plasma humano de baixo volume, doadas pela Santa Casa de Misericórdia, fracionadas através da metodologia de Havel [94]. Foi adicionado ao *pool* Benzamidina (2mM), PMSF (1mM), e EDTA (1mg/ml). Posteriormente, foi ajustada a densidade do pool para 1,063 g/ml, com brometo de potassio (KBr), cuja quantidade foi calculada a partir da fórmula de Radding-Steinberg [95], e separadas por ultracentrifugação (Beckman, modelo OPTIMA XPN 100) a 49.000 por 24 horas a 4°C em um rotor 90 Ti.

C ultracentrifugação, o plasma foi separado em três frações: Fração A de cor alaranjada e menor densidade (> 1,063 g/ml) na qual estará contida a LDL, Fração B transparente com densidade intermediária em relação às outras duas frações, Fração C de cor esverdeada e maior densidade na qual estará contida o LPDS.

A fração A foi aspirada com uma pipeta Pasteur e teve sua densidade ajustada com água Milli Q para 1,006 g/ml. A segunda fração foi desprezada, e a fração C teve sua densidade ajustada com KBr para 1,215 g/ml. Uma vez ajustadas as densidades, as frações A e C foram ultra centrifugadas nas condições supracitadas. Ao término da segunda ultracentrifugação, foi separada a porção mais densa da fração A (LDL) e na

fração C foi separada a porção mais densa (LPDS) e a menos densa (HDL). Todas as frações foram dialisadas por 48H a 4°C contra 6 litros de tampão de diálise composto por cloreto de sódio (NaCl) 150 mM em 3 trocas.

Após a dialise, foi adicionada 10 µ/ml de trombina ao LPDS e percorrido um período de incubação de 24H a 4°C, o LPDS foi ultracentrifugado a 30K. As concentrações protéicas de todas as frações purificadas foram determinadas pelo método de Lowry (1951), que será descrito na sessão posterior. O LPDS teve sua concentração ajustada para 40mg/ml com a solução de Ringer. Todas as frações foram esterilizadas por passagem em filtro (Millex-Millipore) de 0,22 µL, o LPDS foi mantido a -80°C por até 6 meses (Havel et alii. 1955)[94].

DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS

Os ensaios para determinação da concentração de proteínas totais foram realizados em triplicatas, através da técnica descrita por Lowry (1951). Foi preparada uma curva de BSA (soro albumina bovina), nas concentrações de 0, 1,5, 3, 5 e 10 mg/mL em tampão de PBS (10 mM de Na₂HPO₄; 2 mM de KH₂PO₄; 137 mM de NaCl; 2,7 mM de KCl) para a elaboração de uma curva-padrão.

Foi adicionado 1 mL do reativo cupro-alcalino em 20 µl padrão de reação em cada amostra, que foram incubadas por 15 minutos no escuro à temperatura ambiente. Após este período, se adicionou 200 µl de Folin-Ciocalteau a cada reação, que foram incubadas por 30 minutos nas mesmas condições que a incubação anterior. Transferiu-se 100 µl de cada amostra para uma placa de 96 poços. As absorbâncias foram determinadas em

comprimento de onda de 750nm, e as medições foram feitas na Spectra Max, Multi-Mode Detection Platforme,Paradigm.

CULTURA DE CÉLULAS DE LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA.

Células de leucemia mieloide crônica K562 (ATCC CCL- 243) foram cultivadas em meio RPMI contendo SFB 10%, 100U/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomicina.

A fim de avaliar os efeitos da restrição nutricional as células foram cultivadas em meio RPMI não suplementado ou suplementado com soro deficiente em lipoproteínas (LPDS) 10% e plasma completo 10% pelos períodos de 24 e 72 horas.

CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE PROTEÍNAS TOTAIS ATRAVÉS DE ESPECTROMETRIA DE MASSA

PARA AVALIAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO PROTEICO DIFERENCIAL, A LINHAGEM CELULAR DE K562 FOI INCUBADA PELOS PERÍODOS DE 24, 48 E 72H EM MEIO DE CULTURA RPMI SUPLEMENTADO COM 10% DE PLASMA, MEIO RPMII 10% LPDS (RESTRIÇÃO LIPÍDICA) E MEIO RPMI (RESTRIÇÃO SÉRICA). Após a retirada do meio de cultura, as células foram coletadas e congeladas em nitrogênio líquido seguida de lise em solução de ureia 8 m combinado a inibidores de proteases e fosfatasse. As proteínas extraídas foram quantificadas por fluorimetria utilizando o sistema qubittm (THERMO SCIENTIFIC). As proteínas foram digeridas usando tripsina após a redução de ligações dissulfeto e alquilação dos grupamentos tiol. Os peptídeos resultantes foram dessalinizados com colunas montadas com discos de extração c18 3m emporetm.

PEPTÍDEOS GERADOS FORAM MARCADOS COM TMT10PLEX™ MASS TAG LABELING KITS (THERMO SCIENTIFIC) DE ACORDO COM AS INSTRUÇÕES DO FABRICANTE. DEPOIS DA MARCACÃO OS PEPTIDEOS DE CADA CONDIÇÃO BIOLÓGICA FORAM COMBINADOS E FRACIONADOS POR CROMATOGRAFIA DE FASE REVERSA EM CONDIÇÕES BÁSICAS (PH 10). EM PARTICULAR, OS PEPTIDEOS FORAM COLOCADOS EM UMA SOLUÇÃO DE 0.1% AMONIA E FRACIONADOS EM MICROCOLUMNAS COM DISCOS DE EXTRACAO C18 3m empore™ UTILIZANDO UM GRADIENTE EM STEPS DE ACETONITRILA (5,10, 15, 20 E 50%).

ANÁLISE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA COM ESPECTROMETRIA DE MASSA EM TANDEM (LC-MS/MS)

As diferentes fracões foram analisadas por nano-LC-MS/MS em coluna Reprosil-Pur C18-AQ (3µm) usando sistema Easy-LC nano-HPLC (Thermo Scientific) conectados através de uma fonte de íons nanospray (Thermo Scientific) ao espectrometro de massa Orbitrap Fusion Tribrid™ (Thermo Scientific) para realização da análise de massas.

O gradiente de HPLC foi de 0 à 34% em solvente B (A= 0.1% de ácido fórmico, B= 90% ACN, 0,1% de ácido fórmico) por 50 minutos em um fluxo de 250 nL/min. Uma varredura da espectrometria de massa (400-1400 m/z) foi registrada no Orbitrap numa resolução de 120K a 200 m/z para um AGC target de 5e10⁵ íons e um maximum injection time de 60ms. Os espectros MS/MS foram obtidos na modalidade top speed e através de dissociação high-energy C-trap (HCD, high energy C-trap dissociation) com aquisição no Orbitrap a uma resolução de 60K. Os parâmetros para a aquisição de HCD foram: janela de isolamento: 1.2 Da; energia de normalização: 40; exclusão dinâmica: ativado com

repetição de contagem 1; duração da exclusão: 30s; limiar de intensidade: 100000 e íons alvo = 5e⁴.

ANÁLISE DOS DADOS E BIOINFORMÁTICA

Os arquivos obtidos foram analisados usando o software Proteome Discoverer™ v2.1 (Thermo Scientific). O espectro MS/MS foi convertido para o formato .mgf e pesquisado no banco de dados “SwissProt Human database” usando software Sequest Search Engine, com MS/MS massa de tolerância 0.6 Da (CID data). Taxas de detecção falsa (FDR) foram realizadas utilizando o algoritmo de Percolator com q menor igual a 0,01 no nível de PSMs e proteínas. Oxidação na metionina e TMT10plex na lisina e N-terminal de peptídeos foram consideradas modificações dinâmicas enquanto carboamidometilação foi considerada uma modificação fixa.

A quantificação relativa foi realizada utilizando software Proteome Discoverer™ v2.1 usando os íons repórteres do TMT10plex. A análise quantitativa foi realizada utilizando valores log2 das intensidades avaliadas e os dados foram normalizados em relação a proporção mediana do peptídeo. Cada amostra foi analisada em triplicata biológica. Proteínas ou peptídeos significativamente regulados nas triplicatas biológicas foram determinados e a razão entre amostra tratada e controle foi calculada.

A análise inicial das amostras foi realizada utilizando o software Perseus 1.5.3.2. Através dessa plataforma foi empregada a análise de componentes principais como método de redução de dimensões para perceber o comportamento das proteínas identificadas. A significância estatística da regulacão das proteínas quantificadas foi

avaliada com Teste t seguido de correcão de Benjamini-Hochberg para determinação das proteínas reguladas ($p<0,05$) e produção da lista final de proteínas que está expressa como média da razão entre condição e controle de cada replicata biológica. O agrupamento hierárquico não supervisionado das proteínas diferencialmente reguladas entre as condições foi analisado utilizando distâncias euclidianas após normalização através de z-score. A análise das proteínas reguladas em função da variação da sua expressão foi estudada utilizando gráfico de dispersão volcano.

Para melhor compreensão das diferenças entre os grupos estudados, diagrama de Venn indicando as proteínas exclusivas ou compartilhadas entre as diferentes condições foi construído utilizando o software Venny 2.1 (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>).

Para o entendimento mais aprofundado das implicações biológicas das proteínas reguladas, a lista das proteínas diferencialmente reguladas foi analizada com Ingenuity Pathway Analysis de acordo com funções celulares e vias de regulação das proteínas presente no banco de conhecimento (knowledge base) do software.

Interações proteína-proteína, redes de interação e classificação em ontologias gênicas entre as proteínas diferencialmente reguladas foram construídas utilizando software String (<http://string-db.org/>) utilizando parâmetros de alta confiança (0.700).

VIABILIDADE CELULAR

A avaliação da viabilidade celular foi realizada pelo método colorimétrico de MTT.

Em células metabolicamente ativas, o reativo de MTT (Brometo de metil-tiazolil-difeniltetrazolio) é reduzido a formazan (tiazolil azul de formazan) pela enzima mitocondrial succinato desidrogenase, permitindo a medida indireta da viabilidade celular por espectrofotometria.

Neste ensaio, células K562 foram contadas no contador de células (Invitrogen) e semeadas em placas de 96 poços a uma concentração de 1×10^4 cel/poço de células, e cultivadas em restrição sérica (RPMI), restrição lipídica (RPMI 10% LPDS) e em condições normais de cultivo (RPMI 10% SFB) nos períodos de 24, 48 e 72h. O ensaio foi realizado em triplicata.

Posteriormente aos determinados períodos de incubação, foi adicionado 1.2 mM de reativo de MTT e após 4 h em estufa a 37°C com atmosfera de 5,0%CO₂, os cristais formados foram solubilizados com a adição de isopropanol (50% v/v). A porcentagem de viabilidade celular foi determinada por meio da comparação do acúmulo de formazan entre células tratadas e não tratadas, utilizando espectrofotômetro com filtro de 570 nm.

O método colorimétrico de MTT também foi empregado para o estudo do efeito da exposição a agentes de estresse ambiental e farmacológico da linhagem de K562 cultivadas nas condições anteriores por 24 e 72h. Após este período as células foram lavadas com PBS e plaqueadas conforme o experimento anterior em meio RPMI 10% SFB com diferentes PHs (7,5 a 6) e em meio RPMI 10% SFB suplementado com diferentes

concentrações de vincristina (10 a 40 μ M) e doxorrubicina (25 a 0,1 μ M), H₂O₂ (25 a 100 μ M) e AAS (4,5 a 18 μ M) por vinte quatro horas, após este período foi analisado a viabilidade das células.

CICLO CELULAR

A análise do ciclo celular foi realizada com células semeadas em garrafas de 25 cm² (1×10^6 células / poço), em meio suplementado com 10% SFB, 10% LPDS e sem suplementação e incubadas durante 24, 48, e 72 h. As células recolhidas foram em seguida lavadas em PBS e fixadas em 75 % de etanol e incubadas por 12 h a -20 °C . As células foram coradas com 50 ug / mL de iodeto de propídio contendo 10 μ g / ml de RNase A e , em seguida, analisadas em citômetro de fluxo FACS Calibur (BD Biosciences , CA , EUA) . As percentagens de células nas fases G1 , S , e G2 - M foram determinadas.

EXTRUSAO E INTRUSÃO

Para averiguar a atividade das bombas transmembrana de células de K562 cultivadas por 72H em RPMI 10% PLASMA e sobre restrição lipídica e sérica, realizou-se um ensaio para averiguar a intrusão e extrusão celular. Após o termino da incubação de 72H, foram transferidas 2×10^5 células para um tudo falcom e adicionou-se Rodamina 123 a concentração de 1mg / ml de meio por 1 hora a 37 °C. Após este período, o pellet de células de cada tubo foi lavado com 2 vezes com PBS e fracionado em dois tubos distintos A, ensaio de intrusão, B ensaio de extrusão.

As células dos tubos A foram ressustensas em 2 ml PBS e adquiridas em um citometro de fluxo, a uma velocidade constante. As células do segundo grupo foram

ressuspensas em 3 ml RPMI 10% SFB e incubadas por 1 H a 37°C, percorrido este período, o pellet de células de cada tubo foi lavado com 2 vezes com PBS, ressuspenso em 2 ml de PBS e adquiridas nas mesmas condições que a variável anterior.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Diferenças entre os grupos controle, restrição lipídica e sérica foram analisadas utilizando o teste de two-way ANOVA e pelo método Bonferroni Multiple Comparisons Test e através do teste t-student.

As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad- PrismStat 4.0 e GraphPadInstat.

RESULTADOS

Os efeitos *in vitro* da restrição nutricional foram estudados através de ensaio de MTT. A linhagem celular K-562 cultivada suplementadas com RESTRIÇÃO LIPÍDICA não apresentaram uma variação estatisticamente significativa na viabilidade celular nos períodos avaliados. Enquanto as células cultivadas em restrição sérica apresentaram uma redução de 50% na viabilidade no período de 48h e de 30% em 72h. Conforme pode ser observado na figura 4.

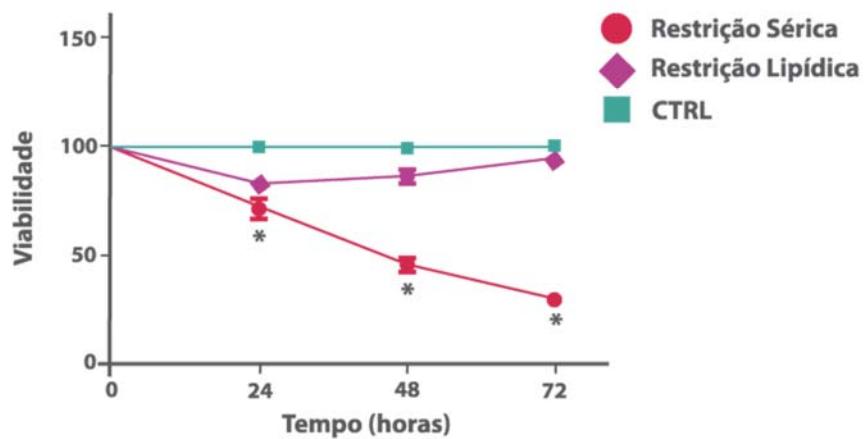


Figura 6 - A avaliação da viabilidade celular da linhagem K-562 expostas a restrição nutricional e restrição lipídica. As células foram cultivadas em meios com diferentes suplementações pelos períodos de 24h, 48h e 72h e o efeito na viabilidade celular foi avaliado do ensaio de MTT. O ensaio foi realizado em triplicatas independentes. Os dados são a porcentagem média de células em relação aos controles \pm SEM.

CICLO CELULAR

A análise do ciclo celular, nas condições descritas permitiu observar as células incubadas pelo período de 24h não tiveram alteração estatisticamente significativa na porcentagem de células presentes em cada etapa do ciclo celular (figura 5). Nas células tratadas por um período de 72h foi possível observar uma alteração destas da porcentagem células em cada fase do ciclo celular somente no grupo no qual as células foram submetidas a restrição sérica (figura 5-B). Neste grupo ouve a diminuição da porcentagem de células na fase G1 e o incremento da quantidade de células na fase G2/M.

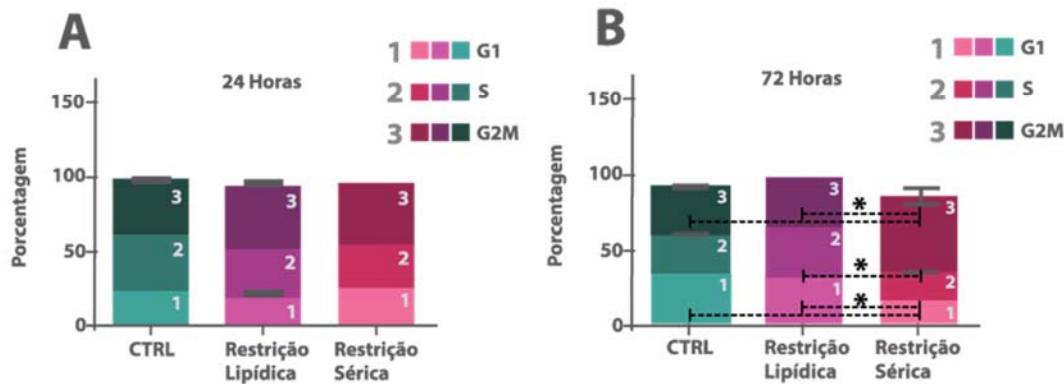


Figura 7 - Quantificação (% de eventos) das células K562 nas fases do ciclo celular cultivadas em condições normais, restrição sérica e lipídica pelos períodos de A) 24H e B) 72H com marcação com iodeto de propídio; two-way anova, P<0,05.

RESISTÊNCIA ADQUIRIDA

Os efeitos *in vitro* do efeito da exposição, das células que passaram por um período de recuperação de 24h após terem passado por 72 horas de restrição sérica, a diferentes pH e concentrações de H₂O₂, vincristina, doxorrubicina e AAS foram estudados através de ensaio de MTT. A viabilidade e proliferação celular foi avaliada após um período de 24h de reação, verificando-se os efeitos, *in vitro* de exposição a diferentes

pHs, agentes reativos de oxigênio e drogas por 72h. A linhagem celular K562 tratada com as variáveis supracitadas apresentaram o desenvolvimento de resistência .

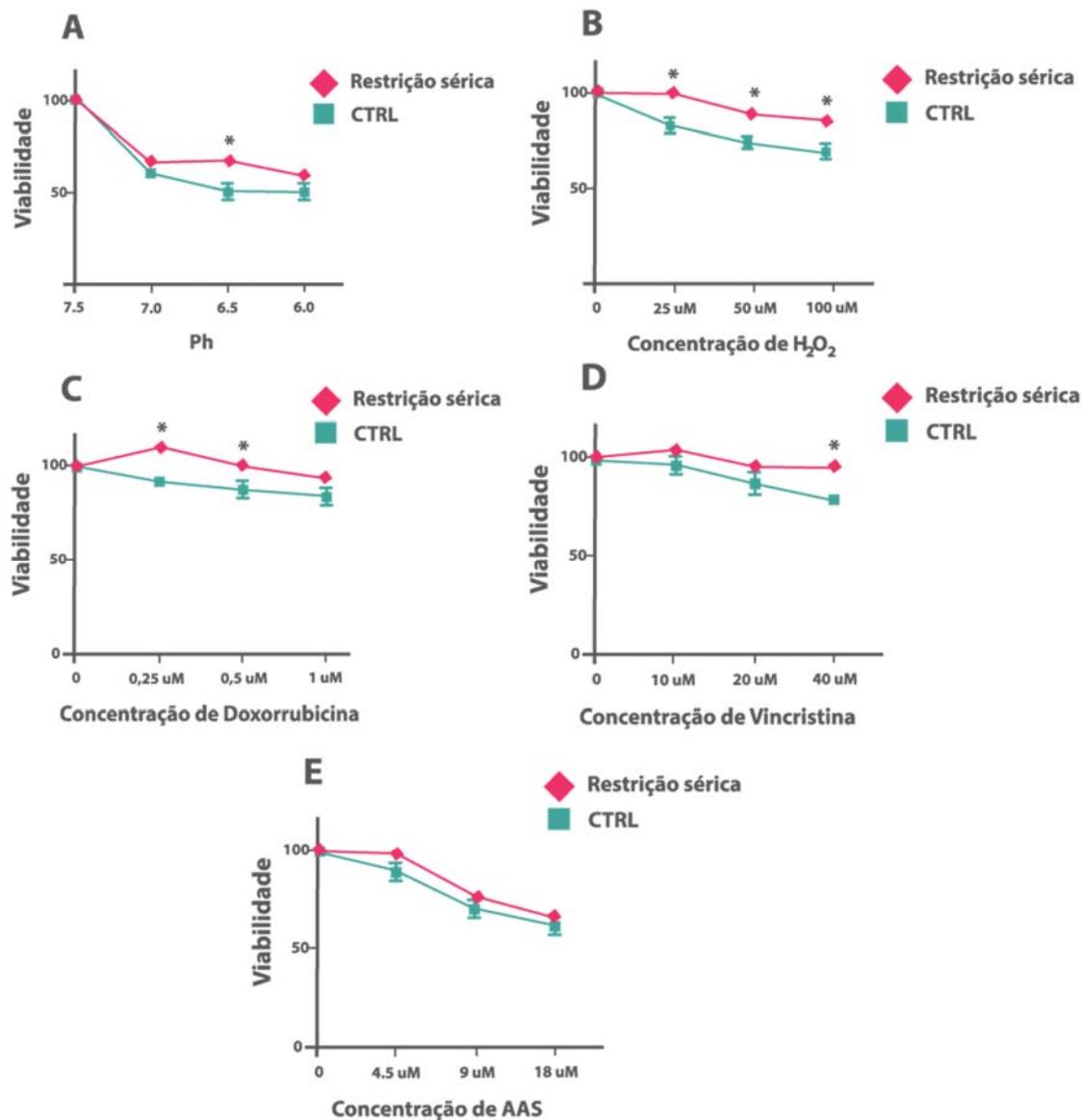


Figura 8- Quantificação (% de eventos) das células K562 nas fases do ciclo celular cultivadas em condições normais, restrição sérica e lipídica pelos períodos de A) Ph-- O grupo matido em restrição sérica teve um índice de mortalidade menor do que o controle quando exposto ao Ph 6,5 B)H₂O₂- - O grupo matido em restrição sérica,

quando tratado com diferentes concentrações de H₂O₂ teve um índice de mortalidade menor do que o controle . C) Doxorrubicina- O grupo matido em restrição sérica, quando tratado com doxorrubicina teve um índice de mortalidade menor do que o controle quando exposto as concentrações de 0,25 e 0,5uM D) Vincristina O grupo matido em restrição sérica, quando tratado com vincristina teve um índice de mortalidade menor do que o controle quando exposto as concentrações de 40uM E) Aas- não houve alteração na resposta entre ambos os grupos ao tratamento com AAS; teste Tow-way anova , P<0,05.

EXTRUSÃO E INTRUSÃO

A fim de averiguar se as células cultivadas sob privação sérica apresentavam uma alterações de permeabilidade na membrana plasmática a agentes anticancer realizou-se os ensaios de intrusão e extrusão celular. Em ambos os ensaios não foi possível observar alteração das células analisadas em relação as células controle.

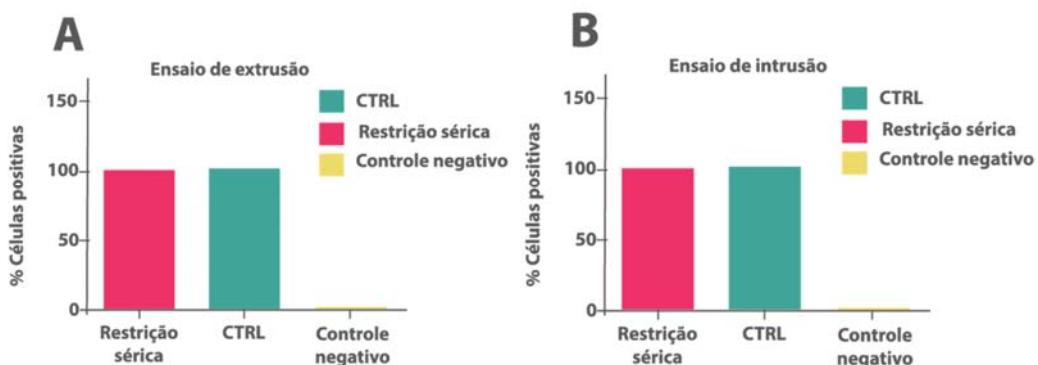


Figura 9- Quantificação (% de eventos) das células K562 cultivadas em condições normais e em restrição sérica pelos períodos 72H a fim a permeabilidade de membrana e capacidade de realizar a extrusão de compostos A) ensaio de extrusão, no qual não houve diferença entre os dois grupos celulares B) ensaio de intrusão no qual não houve diferença entre os grupos experimentais. A marcação foi realizada com Rodamina 123; t-student, P<0,05.

ESTUDO DO EFEITO DA RESTRIÇÃO SÉRICA E LIPÍDICA

Para compreender o efeito do restrição sérical e lipídico na linhagem K562, a expressão proteica diferencial das células após os diversos esquemas de tratamento foi avaliada empregando proteômica baseada em espectrometria de massas. K562 foi submetida a restrição lipídica e sérica por 24 ou 72 h e o precipitado celular foi analisado utilizando uma estratégia de marcação com TMT10plex (Figura 4, desenho experimental). Foi possível identificar um total de 3286 e 3038 proteínas com 1% FDR após 24 e 72h de exposição, respectivamente. A análise de componentes principais das proteínas identificadas evidenciou que a linhagem celular estudada se comportou de forma diferente em função do tratamento, tanto após 24 h quanto 72 h (Figura 8).

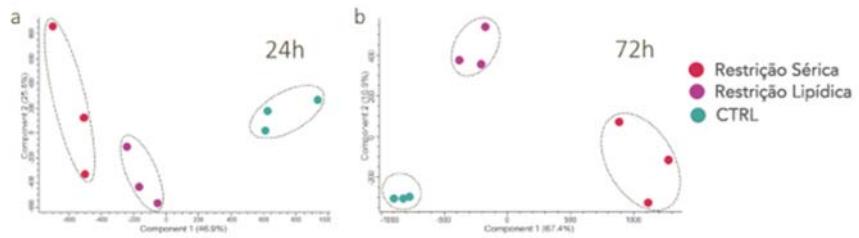


Figura 10 - Análise de componentes principais (PCA) de K562 (CTRL), K562 em LPDS 10% (restrição lipídica) e K562 em restrição sérica por 24 h (a) e 72 h (b). As áreas pontilhadas dividem o gráfico em setores de acordo com PCA realizada de todas as proteínas quantificadas por Análise de componentes principais (PCA) de K562 (CTRL), K562 em restrição lipídica e K562 em restrição sérica por 24 h (a) e 72 h (b). As áreas pontilhadas dividem o gráfico em setores de acordo com PCA realizada de todas as proteínas quantificadas.

De todas as condições avaliadas, a exposição das células a restrição sérica por 72 h resultou em um maior número de proteínas diferencialmente expressas, um total de 1508. Enquanto restrição sérica por 24 h e somente restrição lipídica (10% LPDS) por 24 e 72 h apresentaram uma expressão diferencial de 55, 37 e 20 proteínas,

respectivamente. Proteínas foram consideradas reguladas com $p<0,05$ em teste t seguido de correção de Benjamini-Hochberg, independente da razão entre experimento e controle (Anexo 3-6). O agrupamento hierárquico não supervisionado das proteínas reguladas foi utilizado para evidenciar a distribuição de proteínas mais ou menos expressas entre as condições.

De todas as condições avaliadas, a exposição das células a restrição sérica por 72 h resultou em um maior número de proteínas diferencialmente expressas, um total de 1508. Enquanto restrição sérica por 24 h e somente restrição lipídica (10% LPDS) por 24 e 72 h apresentaram uma expressão diferencial de 55, 37 e 20 proteínas, respectivamente. Proteínas foram consideradas reguladas com $p<0,05$ em teste t seguido de correção de Benjamini-Hochberg, independente da razão entre experimento e controle (Anexo 6). O agrupamento hierárquico não supervisionado das proteínas reguladas foi utilizado para evidenciar a distribuição de proteínas mais ou menos expressas entre as condições (Figura 9).

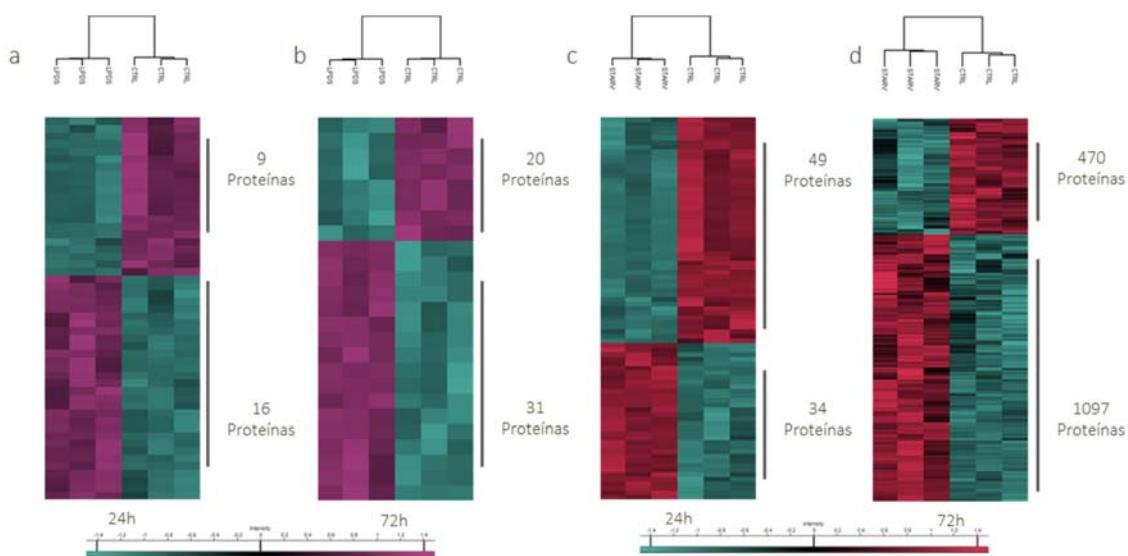


Figura 11- Diagrama de intensidade (heatmap) do agrupamento hierárquico de proteínas reguladas ($p<0,05$) após restrição lipídica (a e b) ou em restrição sérica (c e d) por 24 e 72 h.

O estudo das proteínas reguladas utilizando gráficos volcano (Figura 10) evidenciou a presença de proteínas menos expressas em todas as condições. Dentro desse grupo, as proteínas que foram classificadas por *Anderson 2* [96] como presentes no plasma em seu estado de homeostase foram retiradas da lista de proteínas reguladas para evitar a análise destorcida dos dados. O gráfico de Venn (Figura 10) evidencia o número de proteínas compartilhadas entre as condições testadas, sendo 17 presentes tanto em restrição sérica quanto após restrição lipídica por 72 h.

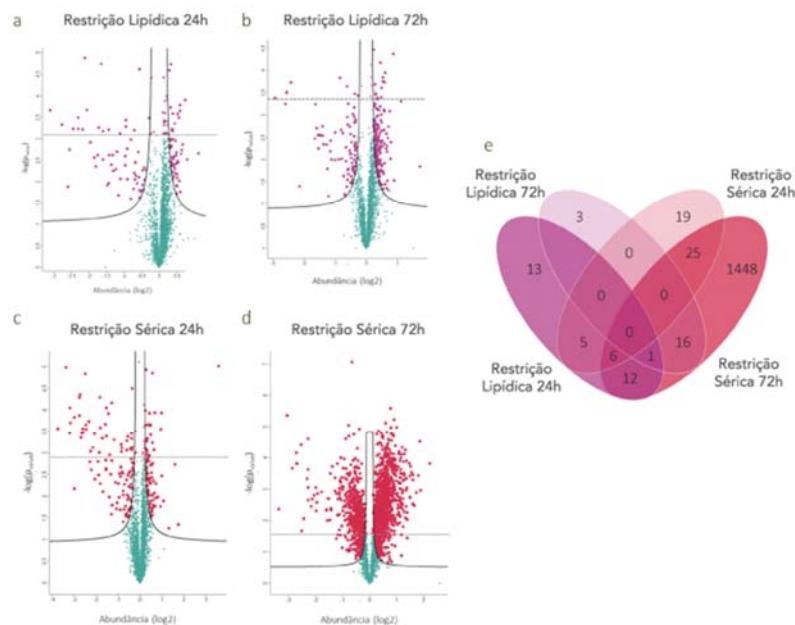


Figura 12- Gráfico volcano das proteínas diferencialmente reguladas em uma comparação par a par da linhagem K562 controle e K562 em restrição lipídica por 24 h (a) e 72 h (b), restrição sérica 24h (c) e 72 (d), utilizando test-t com FDR de 0,05% (proteínas indicadas em rosa). A reta delimitada pela linha pontilhada indica as proteínas diferencialmente expressas após test-t com correção de Benjamini-Hochberg. O gráfico de Venn das proteínas diferencialmente reguladas entre as condições avaliadas (e).

Com a finalidade de estudar as principais funções celulares envolvidas na expressão diferencial das proteínas quantificadas foi utilizanda a análise de vias de sinalização e as proteínas reguladas foram agrupadas em redes de função. Após 24h de incubação com LPDS 10% ou em restrição sérico as principais funções observadas foram “desenvolvimento celular”, “crescimento e proliferação celular”, “morte e sobrevivência celular” e “ciclo celular” (tabelas 1 e 2). Enquanto a incubação com LPDS 10% por 72 h resultou na regulacão de proteínas envolvidas “morte celular e sobrevivência”, “síntese proteica”, “ciclo celular” e “cancer” (Figura , tabela 3)

Tabela 1 - Principais funções moleculares das proteínas reguladas após incubação com 10 % LPDS por 24 h. Lista obtida utilizando software ingenuity pathway.

Funções	Moléculas
Desenvolvimento celular, crescimento e proliferação celular, morte e sobrevivência celular.	CDK1,CDKN2A,CLU,CyclinA,DDX5,FOSL1,JUN,KMT2E,le7,MMP2,MMP3,OGT,PPP2CA,PPP2R1A,PRKAA,SERpine1,Smad2/3,SNAI1,TP53,TP73,TRIM28,VTN,XRCC6
Crescimento e proliferação celular, esquelético e muscular de Desenvolvimento de Sistemas e função, desenvolvimento celular	ALDH1A1,CTNNB1
Organização celular, Transporte Molecular, metabolismo de ácidos nucleicos	EEF1A1,EEF1B2
Morfologia celular, Organização celular e morfologia tecidual	MAP7,YWHAG
Sintese Proteica, Cancer	MIF,NFE2L2,PRDX1
Manutenção e função celular, sobrevivência e morte celular, Doenças Hereditárias	DNM2,PDE6G,SNX33,TP63

Tabela 2 Principais funções moleculares das proteínas reguladas após incubacão sob restrição sérica por 24 h. Lista obtida utilizando software ingenuity pathway.

Funções	Moléculas
Sobrevivência e morte celular, desenvolvimento e adesão celular.	ACTL6A,AKT1,APP,ARRB1,AXL,BAX,BBC3,BCL2, BLM,BMI1,BRCA1,BSG,CASP3,CASP9,CAV1,CBX3,CCND1,CCND2,CD82,CDH1,CDH2,CDKN1A, CDKN2A,CEBPB,CFLAR,CHEK1,CLRN1,CLU,CTNNB1,CXCL8,DDX5,DICER1,E2F1,E2F6,EGFR,EP300,ESR1,F11R,FAS,FBXW7,FOSL1,GADD45A,HIF1A,HIPK2,Hsp70,HSP90AA1,ID2,IGFBP7,IL6,ITCH,ITGB1,JAK1,JUN,let-7,LYN,MDM2,MMP2,MMP3,MYC,NFKB2, NFKB,NOTCH1,NRAS,NUPR1,PARK7,PLAU,PLAUR,PML,POU5F1,PRKCB,PRNP,PTEN,PTHLH,RASSF5,RBL1,RELA,S100A2,SCAMP3,SERPINE1,SFN,SLC9A3R1,SMAD4,Smad2/3,SNAI1,SRC,STAT1,STAT3,STAT5A,TERT,TFRC,TGFBI,TGFBR2,TNFRSF10B,TP53,TP63,TP73,TRIM28,VDR,VTN,WRN,YAP1,ZEB1
Metabolismo de carboidratos, metabolismo de ácidos nucleicos bioquímica celular.	NUPR1,UAP1
Crescimento e proliferação, desenvolvimento do Sistema muscular e esquelético, desenvolvimento celular.	ALDH1A1,CTNNB1
Reparação de alterações no RNA, Doenças infecciosas e inflamatórias	FBL,G3BP2
Morfologia celular, adesão tecidual, ciclo celular, Adesão Tecidual	AURKA,GATA2,miR-124-3p (and other miRNAs w/seed AAGGCAC),ROCK1,SMARCA4

Tabela 3 Principais funções moleculares das proteínas reguladas após incubação com LPDS 10 % 72 h. Lista obtida utilizando software ingenuity pathway

Funcões	Moléculas
Modificação Do RNA Post-Transcriptional Modification, Sobrevida e Morte Celular	FAM103A1,RNMT
Metabolism De Lipedes, Molecular, Bioquímica Molecular, Metabolismo, Transporte Molecular	ORMDL3,SPTLC1,SPTLC2
Sobrevida e Morte Celular, Cancer, Abnormalidades e Injúrias Do Organismo	CASP1,DNMT3B,SERPINB9
Sobrevida e Morte Celular, Função e Desenvolvimento do Sistema Auditivo e Vascular,	CLRN1, HK1, PLG, VDAC1
Síntese Proteica, Ciclo Celular,	ANAPC5, BRCA1, FBL, GAPDH, JUND, KMT2E, LAR P1, LARP4B, PABPC1, RACK1, STAU1, TOP1, UBE3 A, YWHAG

A restrição sérica por 72 h foi o estímulo que produziu o maior número de proteínas com expressão diferencial na linhagem K562. Essas proteínas foram em 8 redes funcionais (tabela 4), que também foram estudadas de acordo com suas interações (Figuras 11-14), com destaque para via de morte celular e sobrevida.

Tabela 4 Principais funções moleculares das proteínas reguladas após incubacão restrição sérica por 72 h. Lista obtida utilizando software ingenuity pathway.

Funções	Moléculas
Morte celular e sobrevivência, crescimento e proliferação celular, Doenças Infecciosas	ACAT1,ACTR2,AKAP8L,AKT1S1,AP1G1,ATXN3, AURKB,BAG3,BAG6,C8orf44- SGK3/SGK3,CASP10, CDC37,CDC42,CDC73,CDC37L1,CDK2,CEBPZ, CNOT7,Creb,CTDP1,CTNND1,CUL1,CyclinA, CYP51A1,DAP3,DCAF7,DDX21,DDX50,DDX3X, DHFR,DHX9,DHX30,DNAJC3,DPY30, DRAP1,DYNC1H1,EED,EIF2AK2,ERK1/2,EWSR1, EZH2,FBL,FKBP4,G3BP2,GAPDH,GBAS,GDF15, GNl3,HDAC1,HDAC2,histone deacetylase,Histone h3, HMGB1, HNRNPU, Hsp70,Hsp90,HSP90AA1, HSP90AB1,HSP90B1,HSPA8,HSPA9,HSPA1A/H SPA1B,HSPA4L,HSPD1,HTATIP2,ICAM1,IFNL1,I GK,IL20,IQGAP1,KIF2A,KPNA3,LARP1,LARP4B,L BR,LYN,MCM7,MTA1,MTOR,NBN,NCKAP1,NE DD8,NFKB1,NFkB,NOP58,NOX5,NPC1,ORAI1,P A2G4,PABPC1,PARK7,PCNA,PKM,PLK1,PPID,PP P6R3,PRDX6,PRKCI,PSMA2,PSMA7,PTGES3,PT PN11,RACGAP1,RALB,RAPGEF6,RBM39,RELA,R EV1,RHOA,RNA polymerase II, RRM2, RSL1D1, SFPQ, SIN3A, SKP1,SLC25A3,SMARCA4,SMARCB1,SOD1,SOD 2,SP1,SQSTM1,SRPK1,ST13,STAT1,STAU1,STIP 1, SUPT16H, TOP1,TRIAP1,TRIM24,TUBA1A,TU BB3,UBE2I,UBL4A,VASP,VCAM1,VCP,VIMP,YW HAG
	20s proteasome,ABL1,ACACA,AGO1, AGO2,AKT1, ANKRD27,ANXA2,ARF4,ARHGDIA,ARRB1,ATG7 ,ATP1A1,ATP2B1,BBC3,BCAR1,BCAT2,BMI1,BR CA1,BSG,BTG2,CACYBP,CANX,CASP3,CAT,CAV

	1,CCND1,CCND2,CCNE1,CD82,CDH2,CDK4,CEBPB,CLIC4,CLRN1,CS,CSRP1,DGKZ,DICER1,EGFR,EGR1,EIF5A,EPHA2,ERP29,ESR1,FUBP1,GADD45A, Gamma tubulin,GFPT1,GRB2,HDAC2,HK1,HMGB3,Hsp90,IGF1R,IGF2R,IGFBP6,ITCH,ITGA5,ITGA6,ITGAV,ITGB1,ITGB8,JAK1,KLF6,KRT17,LETM1,LYN,MAD2L1,MAPRE1,MDM2,MFGE8,mir-25,mir-122,mir-223, MLH1,MT-ND5,MTHFD2, NCL,NUDC,OLA1,PDGFRB,PLK1,POMP,POR,PSMC4,PTHLH,PTPN1,RAB14,RAC2,RAN,RB1,RBM3,RL5,S100A4,S100A8,SDCBP,SFN,SKIL,SLC12A2,SLC20A1,SLC9A3R1,SMAD4,SMAD7,SNAI2,SNA P23,SNX9,SP1,SP3,SRC,SRSF1,SSRP1,STAT1,STAT5A,STMN1,STX4,TCF7L2,TERT,TFAP2A,TFRC,TGM2,TIA1,TP63,TP73,TRIM28,TRIM33,UBXN1,USF2,USP48,VAMP3,VAMP7,VAPB,VDAC1,VEGFA,WT1,XRCC5,XRCC6,YAP1,YBX1
Ciclo celular, morte celular e sobrevivência, desenvolvimento celular	ACTL6A,AGPAT1,AKAP12,AKT2,API5,ARF3,ATM,ATR,BRCA1,CALD1,CAMK2N1,CAV1,CCNA2,CCNB2,CCND2,CDC37,CDH1,CDK1,CDK2,CDKN1A,CDKN1B,CDKN2A,CEBPB,CELF2,CHEK1,CHP1,CHUK,CTGF,CTNNB1,CXCL8,CYB5B,Cyclin A,DIDO1,DNMT3B,DSTN,E2F1,EIF4H,EP300,ET S1,EXOSC3,EXTL2,EZH2,FANCD2,FHOD1,FKBP5,FOS,FOXM1,FOXO3,G3BP1,GADD45A,GTF3C2,H2AFX,HDAC2,HDGF,HIF1A,HINT1,HIST1H2AB,HIST1H4A,HK2,HNF1A,HNRNPM,Hsp70,IL6,ILF3,IRS2,KIAA0196,KLF4,KLF6,KMT2E,LIMS1,MAP3K7,MAPK8,MAT2A,MGST1,miR-200b-3p (and other miRNAs w/seed AAUACUG),MLH1,MMP9,MSH6,MTOR,MYC,MYH9,MYH10,NFKB1,NFKB2,NFKB (complex),NKRF,NMNAT1,NPM1,NR3C1,NUPR1,OPA3,PARP1,PFKFB3,PHB2,PLAUR,PLK1,PMPCA,POU5F1,PPM1F,PRC1,PRKAA2,PRKA B1,PRKACA,PRKAG1,PRKCB,PRKDC,PRRC2C,RA

	CK1,RBM14,RELA,RUVBL1,SERPINB9,SHMT2,SI RT1,SKP2,SLC2A1,SMAD4,SMARCA4,SP1,SRF,S TAT1,STK11,TARDBP,TELO2,TIP60,TNF,TNFRSF 10B,TP53,TP63,TRIM28,TTI1,UROD,USP36,WR N,XRCC5,XRCC6,YOD1,ZC3HAV1,ZNF512
Morte e sobrevivência celular, ciclo celular, crescimento e proliferação celular	ACTB,ADAM10,ADGRG1,AIFM1,ANXA1,APP,A QP1,ASAP1,ATAD3B,ATF4,ATM,ATP2A2,ATP5A 1,ATP6VOA1,BACE1,BRCA1,CALM1 (includes others),CASP3,Caveolin,CCT3,CCT4,CCT5,CD9, CD46,CD63,CD81,CD82,CD151,CDC25A,CDK1, CDKN1A,CHCHD4,CHMP4B,CHUK,CLRN1,COPS 5,CTNND1,CTTN,DAXX,DDOST,E2F1,E2F3,F Actin,FHL2,FLT1,G-protein beta,GNA11,GNAQ,GOLGA2,GTF2I,HSD17B8,H SPA1A/HSPA1B,IGSF8,IKBKB,IKBKG,Integrin,Int egrin alpha 3 beta 1,ITGA3,ITGA5,ITGA6,ITGB1,ITGB1BP1,KDM5A ,KDM5B,KIAA0101,KMT2E,KPNB1,MAP3K5,MC M3,MLH1,MYBL2,MYC,NAPA,NAPG,NDC80,NF KB1,NFKB2,NFKBIA,NFKBIB,PARK2,PCNA,PD_CD 6,PD_CD10,PD_CD6IP,PFN1,PI4KA,POLA1,PPP2C A,PPP2CB,PPP2R1A,PPP2R1B,PPP2R2A,PRKDC, PSAT1,PSEN1,PSEN2,PSMD1,PTGFRN,RAB5A,R AB5C,RB1,RBL1,RELA,RNASET2,RPL30,RRM2,R TN3,RTN4,SCAMP3,SEC16A,SLC3A2,SMC5,SRC ,STIM1,STK25,STRN,STRN3,Syntaxin,TANK,TCP 1,TERT,TFG,TK1,TM9SF2,TMED10,TNIP1,TOP2 A,TP53,TP53BP2,TRIM13,TSG101,TUBB,TXN,U BAP2L,UQCRC1,UQCRC2,VAMP3,VPS28,ZFYVE 27,ZNF622
morte celular e sobrevivência, desenvolvimento celular, crescimento e proliferação celular	ACTN4,ADD1,ALDH1A1,ATM,BAG1,BBC3,BIRC 2,BIRC3,BIRC6,BLM,BRAF,BTF3,BTG2,Bvr,CASP 9,CCAR2,CD40,CDK5,CDK5R1,CHEK1,CLU,CNB P,COPS5,CSNK2B,CTBP1,CTNNB1,CXCL1,DAB2I P,DDX20,DFFA,DHX9,DIABLO,DNAJB6,DUT,ETS

	1,ETS2,FANCE,FAS,FASLG,FGFR3,GCLC,GPN1,GTBP,TF2H1,HERC5,HIF1A,HRAS,HSP90AA1,HSP90AB1,HSPA1A/HSPA1B,HTT,HUWE1,IKBKB,ITGA1,KRT8,KRT18,LDHB,let7,LMNA,MAP2K1,MAPK1,MAPK3,ME2,MED17,,MUC1,NAA10,NDC80,NELFA,NELFCD,NELFE,NME1,NME2,NOB1,NRAS,PDLIM1,PDX1,PHB,PHGDH,PKM,PLIN2,POLR2C,POLR2D,POLR2G,POU5F1,PP2A,PPARG,PRKCD,PSMC3,PTPN6,RAD23B,RAF1,RANBP9,RASSF5,RB1,RECQL5,RIF1,ROMO1,RPLP2,RPS6KA1,RPS6KA2,RPS6KA3,SERPINE1,SFN,SMC1A,SNRPD1,SRSF7,STAT3,STMN1,TAOK3,TDP2,TNFRSF1A,TNFRSF1B,TP53,TP73,TRADD,TRAF2,TRAP1,TWIST1,TXNIP,UBE2D3,UBE2L3,UBE2V1,UBR5,USP9X,VHL,XPC
Replicação de DNA, recombinação e Reparação, doenças do tecido conjuntivo, Disorder Developmental	ORC1,ORC2,ORC3,ORC4,ORC5
Câncer, morte celular e sobrevivência, Assembléia Celular e Organização	CASP2,EIF4B
Cancer, ciclo celular, morte celular e sobrevivência	HRAS,TTC1

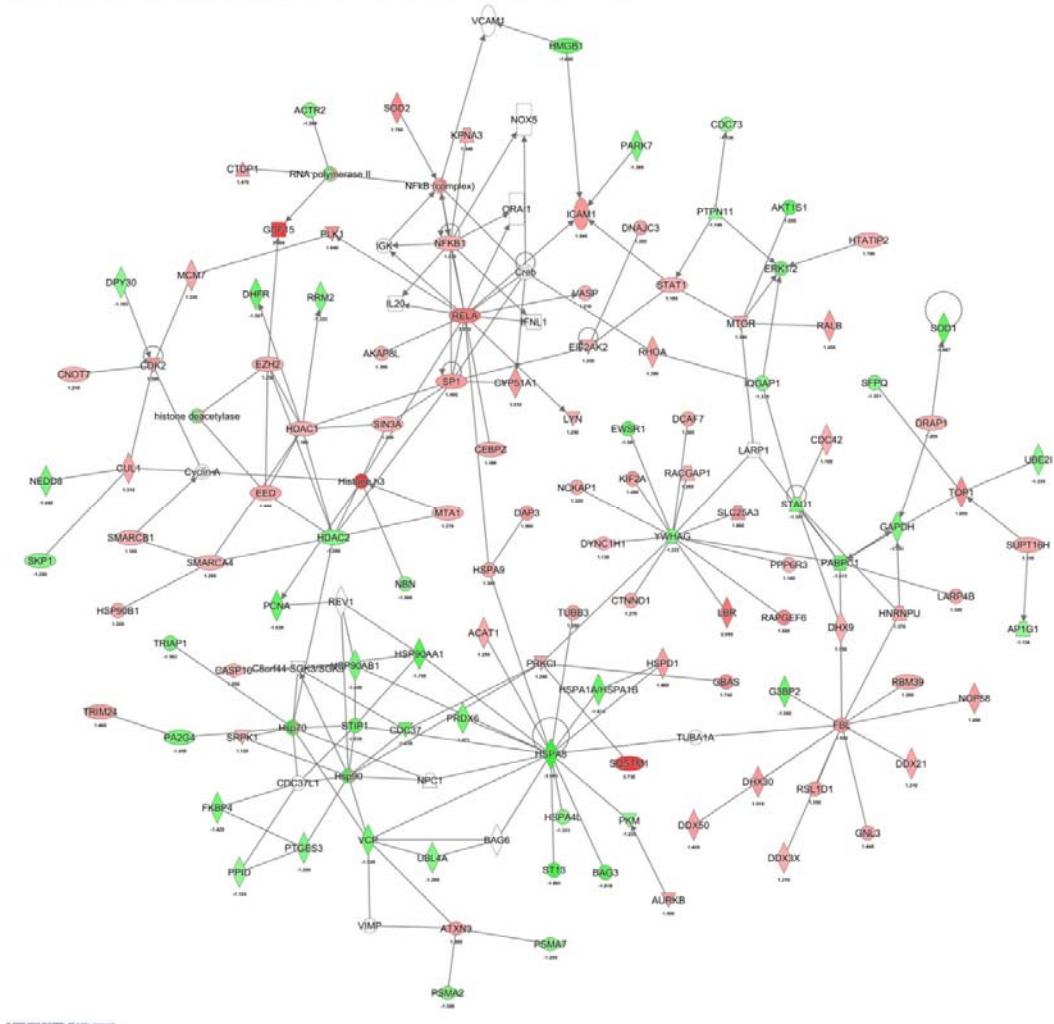


Figura 13 - Network 1:Proteínas que possuem as seguintes funções: sobrevivência e morte celular, crescimento e proliferação celular, doenças infecciosas

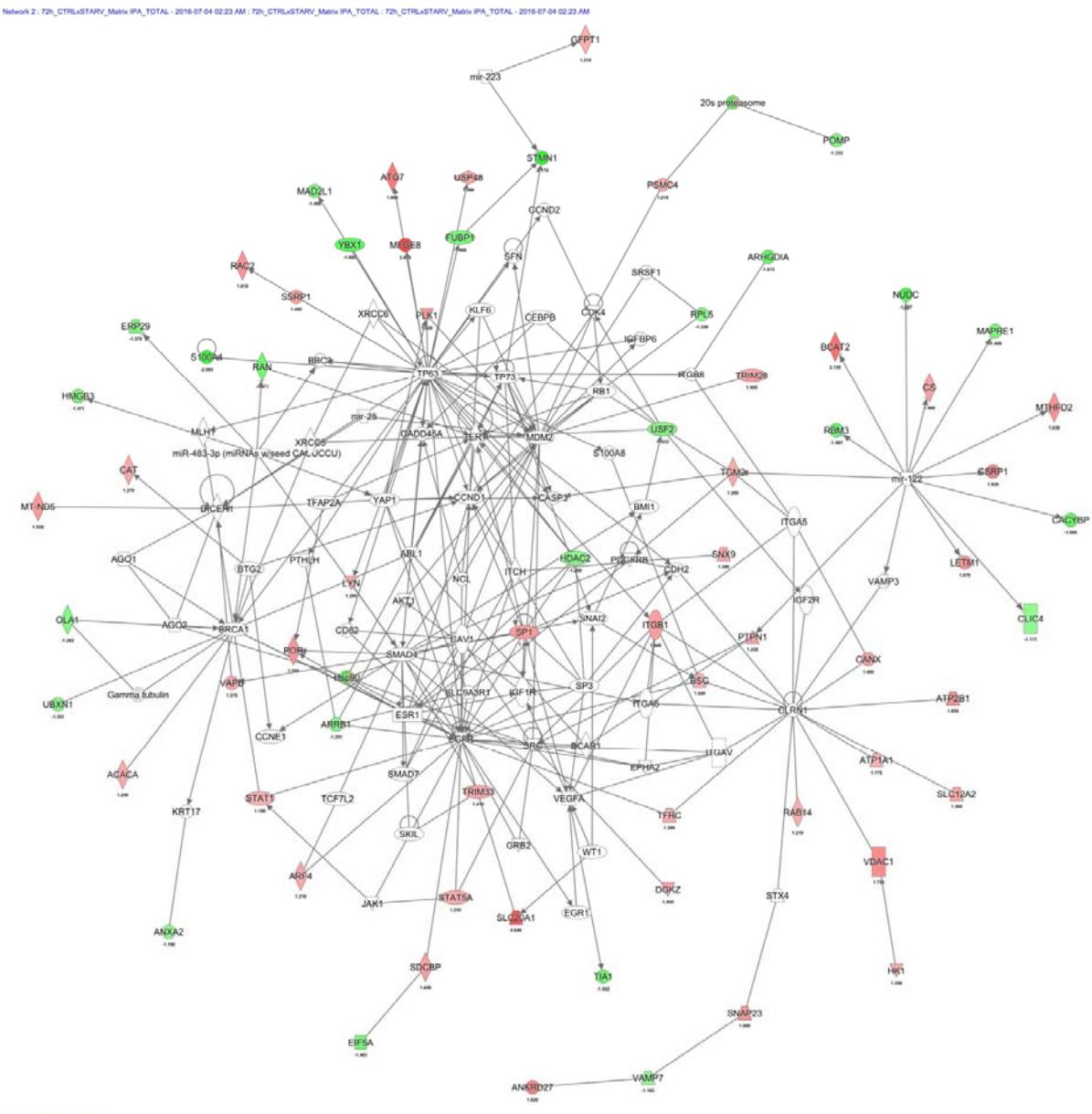


Figura 14– Network 2- :Proteínas que possuem as seguintes funções: ciclo celular, sobrevivência e more celular, desenvolvimento celular.

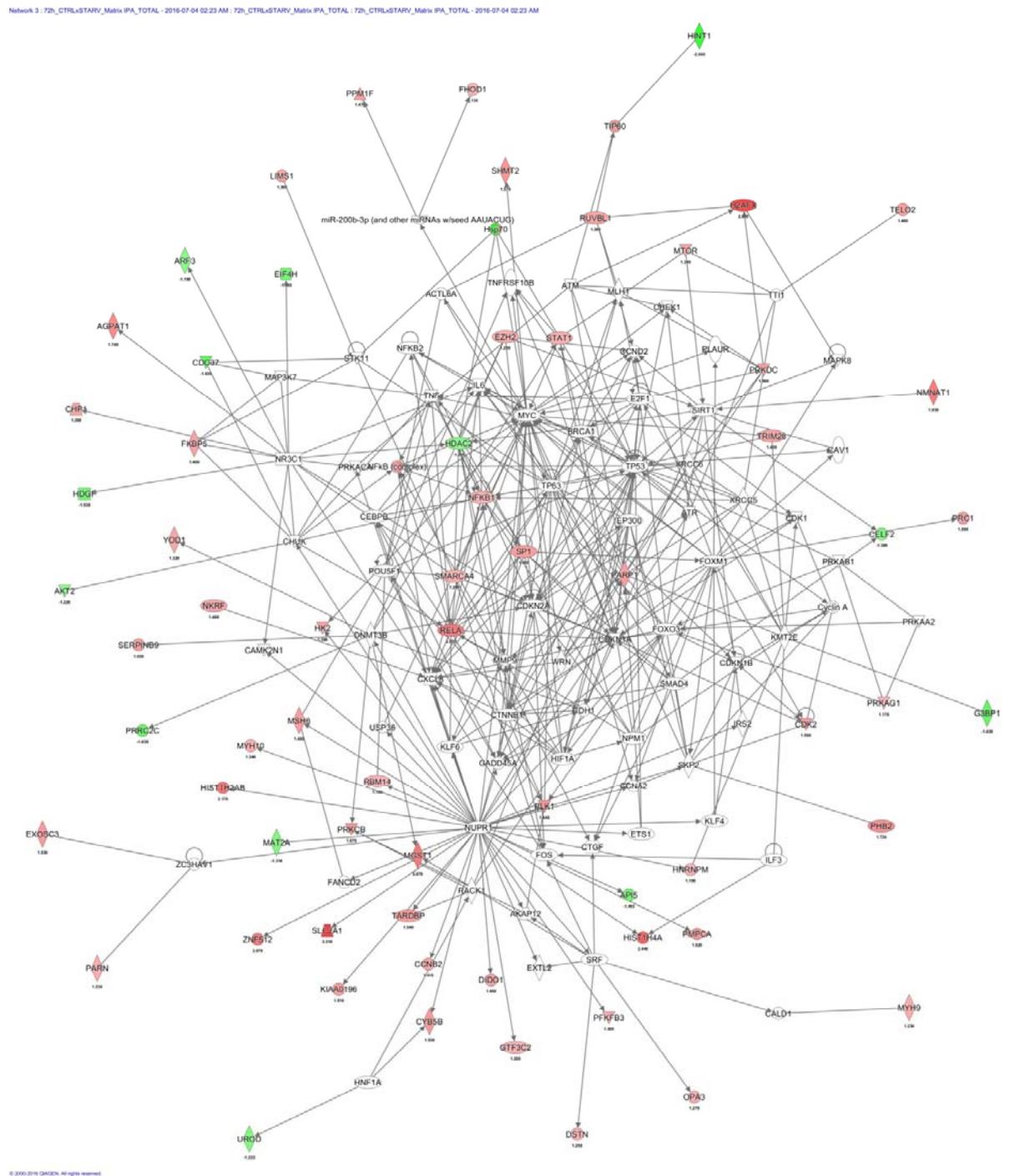


Figura 15 network 3 :Proteínas que possuem as seguintes funções: morte celular, ciclo celular, crescimento e proliferação celular

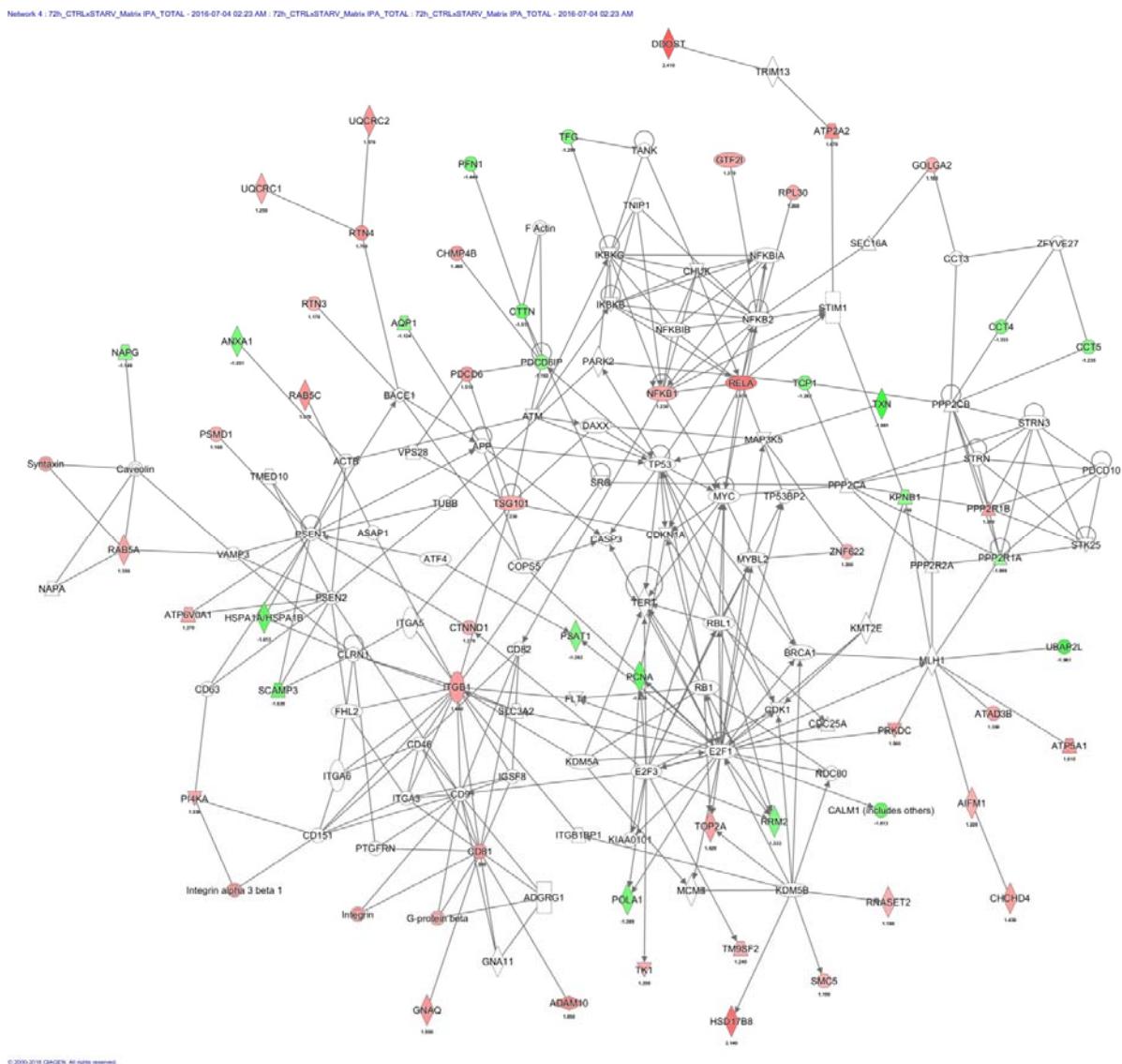


Figura 16 – network 4: Proteínas que possuem as seguintes funções: sobrevivência e morte celular, ciclo celular, crescimento e proliferação celular.

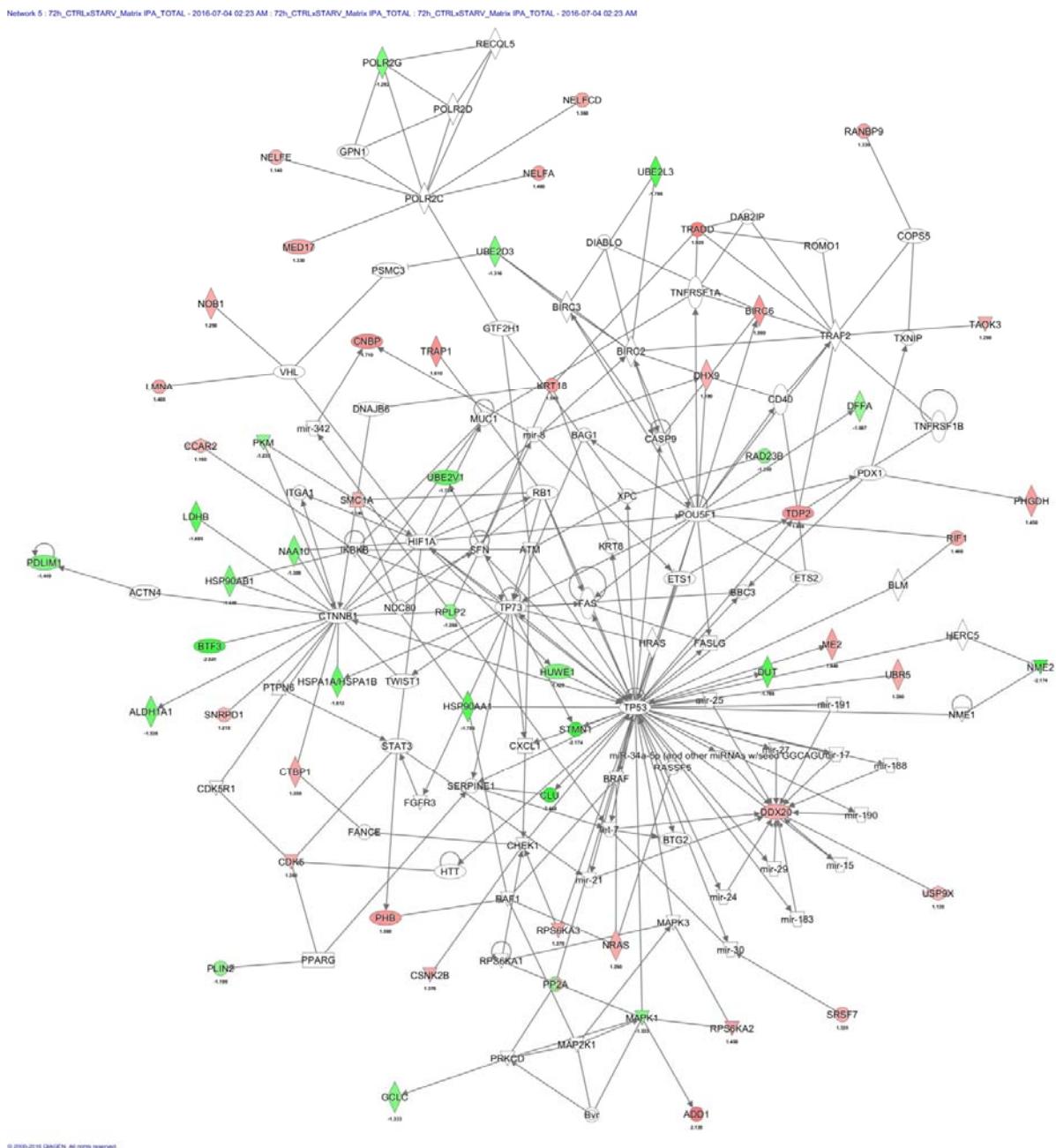


Figura 17-network :Proteínas que possuem as seguintes funções: replicação e reparação do DNA , desordens do tecido conjuntivo

DISCUSSÃO

Os estresses aos quais as células cancerígenas são submetidas no microambiente tumoral podem causar a seleção de linhagens celulares mais resistentes aos tratamentos convencionais, e aos fatores adversos encontrados neste microambiente; e/ou causar a ativação de vias que conferem uma maior resistência a estes fatores. As lipoproteínas e componentes presentes no plasma são nutrientes importantes na manutenção da homeostasia celular e estão envolvidos na regulação de diversas vias tais como o ciclo celular, regulação da síntese de proteica, mecanismos de morte [42,44,45].

A linhagem celular K562 é um modelo utilizado no estudo da leucemia mielóide crônica, apresenta cromossomo Filadélfia característico e foi caracterizada como uma linhagem eritro-leucêmica, indiferenciada e que apresenta aneuploidia [97-99]. Esta linhagem celular possui características genéticas e morfológicas típicas da doença em sua fase crônica, não apresentando mecanismos de resistência a fatores adversos e a quimioterápicos presentes em linhagens resistentes desta mesma patologia [70].

Apesar da utilização de linhagens celulares como amostras representativas das células tumorais ser alvo de opiniões controversas [100], podem ser considerados apropriados para o estudo e melhor entendimento de diversos aspectos da biologia tumoral.

Com o intuito de melhor compreender o efeito de possíveis alternativas terapêuticas, e ampliar o conhecimento sobre a biologia relacionada ao efeito da restrição lipídica e sérica presentes no microambiente tumoral, o enfoque do estudo aqui apresentado pode ser dividido em duas etapas que são: 1) A análise de alterações

metabólicas e 2) Estudar o desenvolvimento de resistência celular a fatores de estresse ambientais e/ou quimioterápicos.

ALTERAÇÕES METABÓLICAS.

Para avaliar a existência de alterações metabólicas ocasionadas pela restrição sérica e lipídica, primeiramente foram realizados ensaios de viabilidade, pelos períodos de 24, 48 e 72h, sendo possível observar alteração significativa na curva de viabilidade celular somente no grupo cultivado sob restrição sérica. Este grupo apresentou um declínio da viabilidade celular durante o período analisado, chegando a apresentar 30% de viabilidade celular quando em restrição sérica por um período de 72h. A fim de analisar as alterações presentes na população remanescente de células K562 após a restrição sérica e identificar alterações na expressão proteica que poderiam estar contribuindo para sua sobrevivência, realizou-se a análise da proteômica global e demais experimentos apresentados nesta tese.

Nos estudos proteicos realizados, as células cultivadas sob restrição lipídica não tiveram um grande número de proteínas significativamente alteradas. Já na população cultivada sob restrição sérica foi possível observar o aumento da quantidade de proteínas alteradas, que foi de 55 proteínas nas primeiras 24h para 1508 nas últimas 72h de incubação. A alteração da expressão proteica pode estar relacionado com a ativação de vias de resistência e aumento da carcinogenicidade [101].

CICLO CELULAR

Na análise do ciclo celular, não foi possível observar nenhuma alteração significativa entre o grupo controle e o grupo cultivado em restrição lipídica nos períodos de 24 e 72h. Nos estudos proteômicos realizados, o número de proteínas alterados nestes grupos também foram baixos. O grupo submetido a restrição sérica, por sua vez, apresentou um aumento no número de células na fase G2 e diminuição das que se encontravam na fase G1.

As ciclinas estão usualmente associadas com alterações no ciclo celular. A homologia entre as ciclinas é muitas vezes limitada a uma região de cerca de 100 aminoácidos, e possui um domínio estrutural conservado, e esta região é necessária para a ligação e a activação de CDK [102]. As quinases dependentes de ciclina (CDKs) são uma família de proteínas quinases, e são relativamente pequenas com pesos moleculares que variam de 34 a 40 kDa. Elas foram descobertas pela primeira vez por seu papel na regulação do ciclo celular. Eles também estão envolvidos na regulação da transcrição, processamento de RNAm, e a diferenciação das células nervosas [103] .

Cada CDK se associa com um subconjunto específico de ciclinas que, por sua vez, podem interagir com várias CDKs. Diferentes complexos de CDK-ciclina são necessários para catalisar a fosforilação dos substratos proteicos que são importantes para dirigir eventos do ciclo celular, tais como a passagem através do START (a iniciação da replicação do DNA) ou o início da mitose [104]. Para garantir a coordenação dos eventos relacionados ao ciclo celular a atividade CDK-ciclina é amplamente regulada por vários mecanismos de transcrição e pós-transcricionais[103].

A activação de CDK é composta por duas etapas, primeiramente uma ciclina se liga a CDK, após esta ligação, ocorre a fosforilação complexo ciclina-CKD pela CAK no resíduo treonina 160, localizado no segmento de ativação de CDK. Contudo para que isto ocorra CDKs precisam de estar livres de proteínas inibidoras de CDK (CKIs) [103]. A fosforilação é geralmente considerada uma modificação reversível utilizado para alterar a atividade da enzima em diferentes condições. No entanto, a fosforilação de CDK por CAK parece ser uma exceção a esta tendência. A atividade CDK permanece elevada durante todo o ciclo celular e não é regulada por qualquer mecanismo conhecido de controle do ciclo celular. No entanto em comparação com células normais, a atividade CDK é reduzida em células quiescentes G0 e ligeiramente elevada em células tumorais [104].

Na análise da proteômica, no grupo submetido a restrição sérica por 72h, foi possível observar a alteração da expressão de ciclinas e de CDKs, entre as quais se destacam a ciclina CCNB2 e a CDKs CDK5. As CDKs estão desreguladas em células cancerígenas. Esta alteração podem levar à interrupção do ciclo celular nas fases G1 e G2 [105], além de poderem contribuir para o desenvolvimento de resistência do tumor aos agentes citotóxicos, incluindo radiação e agentes quimioterápicos. Estudos *in vitro* mostram que a utilização inibidores destas CDKs podem aumentar a eficácia dos quimioterápicos e do tratamentos por radiação em diversas linhagens de células tumorais, como por exemplo A549, HCT116 e HeLa [106].

CCNB2

A ciclina CCNB2 é um membro da família da ciclina e pode ser categorizada como sendo do tipo B. As ciclinas do tipo B, B1 e B2, associado com P34CDC2 e são componentes essenciais do mecanismo de regulação do ciclo celular. Ciclinas B1 e B2 diferem na sua localização subcelular. Ciclina B1 co-localiza com os microtúbulos, enquanto que a ciclina B2 está principalmente associada com a região de Golgi [107].

O complexo p53-p21-DREAM-CDE/CHR é ativado mediante o estresse oxidativo gerado em decorrência da exposição celular à restrição nutricional. Um dos alvos deste complexo proteico é a ciclina CCNB2, e uma vez associado a ela causa a inibição da expressão desta ciclina. Esta ciclina é predominantemente expressa na fase G₂ da divisão mitótica sendo sua expressão essencial para a progressão através do ciclo celular e finalização do processo. Assim, a regulação negativa desses genes através da via da p53-p21-DREAM-CDE/CHR parece ser o mecanismo principal na parada celular na fase G2/M do ciclo celular [108].

A ciclina CCNB2 encontra-se menos expressa no grupo esperimental cultivado sob restrição sérica por 72h. A inibição da expressão desta proteína pode contribuir com o maior índice de células na fase G2. Os danos ao DNA induzidos por uma variedade de agentes genotóxicos provoca atrasos na progressão do ciclo na fase G2 da mitose celular. A degradação dos controles que normalmente atuam para inibir a proliferação celular é um passo precoce na carcinogênese [109]. Esta alteração dá origem a clones iniciais que exibem uma vantagem de crescimento seletivo sobre as células normais quando sujeita à influência de factores de crescimento apropriados. Estes atrasos na progressão através

o ciclo celular proporcionam mais tempo para os processos de reparação do DNA, removendo os danos do DNA antes da sua replicação e da mitose. As células em proliferação têm diversos mecanismos de reparação DNA danificado para reduzir o número de alterações genéticas produzido espontaneamente ou pela exposição a agentes cancerígenos [110].

CDK5

A ciclina quinase dependente da 5 (CDK5) foi descoberto no início de 1990 e ao contrário de outros membros da família, esta ciclina não controla diretamente a regulação do ciclo celular. Em vez disso esta ciclina fosforila uma ampla lista de substratos, o que faz com que diversos processos celulares como, por exemplo, adesão e organização do citoesqueleto, a endocitose e a exocitose, apoptose e mobilidade celular [111]. A CDK5 é uma quinase prolina-dirigida que fosforila serinas e treoninas. Cerca de vinte proteínas com funções diversas foram identificadas como substratos de CDK5 [112]. Na literatura, a função primordial desta CDK em células neuronais e normais é a de promover a migração celular através de sua ação nos microtúbulos. Contudo, já foi descrito que em LMC esta ciclina promove a parada do ciclo celular na fase G1 [111].

A ciclina CDK5 apresentou uma expressão estatisticamente significante superior as células controle. A promoção da migração celular está relacionada com o aumento da metástase tumoral que na LMC é característico da crise blástica [70]. Na leucemia mieloide crônica a CDK5 pode estar relacionada com a diferenciação celular e regulação do ciclo celular

O processo de diferenciação celular foi demonstrado pela primeira vez em estudos sobre o incremento da carcinogênese de leucemia mielóide crônica para nos quais houve a parada de proliferação celular de monócitos maduros com o aparecimento de macrófagos. Esta diferenciação foi induzida por proteínas relacionadas com o ciclo celular e CDK5. Contudo, as vias exatas através das quais os sinais de diferenciação são ativados não foram totalmente esclarecidos nas células estudadas [113]. A ativação de genes que promovem a parada nesta fase do ciclo celular pode explicar o fato de nos experimentos de análise do ciclo celular (figura 5 B) ainda existir um grupo de células na fase G1, onde também existem mecanismos de reparo do DNA. Presumivelmente, estas e outras alterações nas vias de controle do crescimento celular são responsáveis por atrasos na progressão do ciclo que contribuem para a ocorrência da carcinogênese [110, 114].

DESENVOLVIMENTO DE RESISTÊNCIA A FATORES AMBIENTAS.

Os mecanismos de resistência representam diversas formas de proteção celular do organismo, esses mecanismos estão presentes tanto nas células normais como nas tumorais, contudo neste segundo grupo podem encontrar-se superexpressos. O aumento da expressão destes mecanismos podem ser definidos como a habilidade das células neoplásicas de sobreviverem à exposição a agentes tóxicos em concentrações maiores que as máximas toleradas por tecidos normais [112]. A exposição das células tumorais a restrição nutricional presente no microambiente tumoral pode promover a seleção de células com mecanismos de resistência aos diferentes fatores de estresse ambiental [15].

Foi possível avaliar o incremento da resistência celular a fatores de estresse ambiental presentes no microambiente tumoral como diminuição do pH e ao estresse oxidativo através da incubação de células, cultivadas sob restrição sérica pelo período de 72h que passaram por um período de recuperação de 24h em meio de cultura suplementado com SFB 10%, em diferentes pHs e concentrações de H₂O₂ por um período de 24h. Nestes ensaios foi possível observar que houve um ligeiro aumento resistência à acidose e a resistência ao estresse oxidativo (FIGURA 6 A E B) . A Síntese de lipídeos produz espécies oxidativas e aumenta a expressão de vias de proteção celular que podem conferir a resistência às células aos fatores de estresse exógenos. O aumento da resistência das células a estes fatores pode estar associado a superexpressão de proteínas vinculadas a proteção celular contra o estresse causado pela restrição sérica, em especial a mTOR [113]. A proteína (mTOR) é uma serina/treonina quinase atípica que está presente em dois complexos distintos. O primeiro, um complexo mTOR (mTORC1), é composto de mTOR, rapina, gβ1, e DEPTOR e é inibida por rapamicina. Este complexo é um regulador de crescimento e divisão celular, e tem sua regulação influenciada por alterações na disponibilidade nutricional e das condições ambientais, nas quais a célula esta inserida, estando potencialmente envolvida com os processos de proliferação, migração, sobrevivência e diferenciação [115]. Quando ocorre a exposição celular ao estresse oxidativo ocorre o incremento da mTOR que induz o aumento dos sinais para a promoção do crescimento celular por fosforilação de substratos que potencializam processos anabólicos [116] .

A mTOR mostrou uma expressão aumentada no grupo submetido à restrição sérica. Esta proteína faz a regulação de múltiplas vias de sinalização intracelular, e é

essencial para a regulação normal de transcrição celular, a tradução, o crescimento, a proliferação e a sobrevivência. A desregulação ou ativação aberrante de tais cascatas podem levar a sobrevivência celular inadequada e a proliferação anormal de células da leucemia e influenciar no tratamento da LMC.

O sucesso do tratamento da leucemia mielóide crônica (LMC), com inibidores da tirosina quinase como alvo o gene de fusão BCR-ABL é um excelente exemplo de inibir efetivamente cascatas de sinalização intracelular. Contudo, mesmo nestes pacientes podem desenvolver resistência através do aparecimento de mutações de ativação ou de retroalimentação de outras vias que causam a doença refratária. A maior expressão do complexo fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K)/proteína quinase B (AKT) que promove a ativação do mTOR tem sido descrita em vários tipos de leucemia, incluindo LMC, leucemia mielóide aguda, leucemia linfoblástica aguda. A atividade da mTOR anormal pode contribuir para o desenvolvimento da resistência à quimioterapia, embora possa também ser eficazmente alvo através de estresse ambientais e/ou o desenvolvimento de inibidores moleculares farmacológicos específicos [117].

A ação dos complexos proteicos formados pela mTor interagem com diversas vias como por exemplo o metabolismo celular e a homeostase de energia. A alteração da expressão desta proteína contribui o desenvolvimento cancerígeno [118].

DESENVOLVIMENTO DE RESISTÊNCIA A MULTIPLAS DROGAS

A resistência das células cancerosas para quimioterapia e drogas é um desafio multifacetado enfrentados pelos oncologistas. Inicialmente, os pacientes são suscetíveis ao tratamento padrão e após o primeiro ciclo de tratamento há uma melhora do quadro clínico do paciente. No entanto, no prazo de um ano, 50% a 70% dos pacientes apresentam uma recaída, que está associada ao fato de algumas células tumorais resistirem ao tratamento, levando à formação de um outro tumor com fenótipo de resistência ao tratamento [119, 120]. Na LMC o desenvolvimento da resistência ao tratamento convencionais e a quimioterápicos muitas vezes está associada com a progressão da neoplasia e pior prognóstico da doença [121].

Afim de averiguar se as células cultivadas sob privação sérica desenvolviam mecanismos de resistência a quimioterápicos incubou-se as células com diferentes concentrações de vincristina e doxorrubicina, no qual pode-se observar um aumento da resistência das células a doxorrubicina além de um incremento de 20% da viabilidade das células cultivadas com 40 µM de vincristina. Os mecanismos, ligado ao incremento da resistência celular, mais descritos pela literatura são aqueles relacionados à diminuição no acúmulo drogas no interior das células [122]. Sendo o aumento resistência a múltiplas drogas (MDR), em muitos casos, o principal mecanismo de defesa dessas células, como é o caso da célula imortalizada lucena[101]. As drogas relacionadas ao fenótipo MDR geralmente são alcaloides ou antibióticos originados de plantas ou fungos, e compostos citotóxicos como a vincristina e doxorrubicina [123] (gottesman e pasta, 1993 n).

O fenótipo de resistência a múltiplas drogas, observados em células tumorais, é uma resposta adaptativa, frequentemente associada com alterações de permeabilidade na membrana plasmática a agentes anticâncer [121]. O conhecimento biológico da quimiorresistência é complexo. O primeiro obstáculo para um composto alcançar o compartimento intracelular é a membrana plasmática. Essas substâncias podem entrar na célula por difusão passiva ou transporte ativo [124].

O grupo de proteínas ABC são uma superfamília de proteínas de membrana com 48 membros divididos em sete famílias, que tem como característica comum a presença do grupo de transportadores ABC, que apresentam domínios transmembrana ligados ao influxo e efluxo de substâncias, contra o gradiente de concentração, movidas a partir da hidrólise de ATP [revisado em [125]. Em condições fisiológicas, as bombas ATPases são fundamentais na defesa tecidual, excretando compostos tóxicos e metabólicos além de transportarem inúmeros substratos como íons, peptídeos, aminoácidos, açucares, lipídios, fosfolipídeos, colesterol e outros compostos hidrofóbicos, através da membrana plasmática [126, 127].

Diferentes mecanismos fazem parte do fenótipo de resistência a múltiplas drogas e vários deles estão associados com a alta expressão de MDR (ABCB1 ou P-gP) e proteínas associadas à resistência a múltiplas drogas (MRPs). A correlação estreita a superexpressão de MRPs e o grau de malignidade do tumor tem sido extensivamente estudada, observa-se em muitos casos uma alta expressão dessas proteínas em tumores altamente malignos, exibindo resistência a maioria dos quimioterápicos conhecidos [128].

Contudo, apesar do fenótipo de resistência a múltiplas drogas ser um dos mecanismos de resistência mais descritos na literatura não foi possível observar a

alteração do influxo e efluxo nos diferentes grupos experimentais o que, acompanhado ao fato de não ter sido detectado a alteração da expressão de proteínas da superfamília ABC, sinaliza que o incremento da resistência a vincristina e doxorrubicina ocorreu exclusivamente devido a alteração do metabolismo celular.

Uma vez no compartimento intracelular, as enzimas de metabolismo de drogas são a primeira alternativa para o desenvolvimento de resistência celular através da alteração química da droga. Esse processo envolve enzimas de fase I e fase II. A fase I compreende um conjunto de reações de oxidação, redução e hidrólise que transforma a molécula tóxica para ser eliminada ou submetida a ação de enzimas de fase II. É realizada principalmente pelas enzimas citocromo P450 (CYPs) e epóxido hidrolases. As CYPs podem estar localizadas na mitocôndria e no retículo endoplasmático, convertem moléculas xenobióticas em epóxidos (metabólitos aromáticos) que têm sua toxicidade reduzida através da ação das epóxido hidrolases, podendo ser processados por enzimas de fase II e expulsos da célula por transportadores de membrana [129].

A superfamília GST (Glutationa S – transferase), que são enzimas metabólicas da fase II. GSTs catalisam a conjugação de glutationa reduzida (GSH^-) a uma vasta variedade de compostos eletrofílicos, a fim de os tornar mais solúveis permitindo a sua eliminação [130]. Como um resultado desta actividade de desintoxicação, GSTs protegem a célula contra os danos do DNA, a instabilidade genômica e o desenvolvimento do câncer. Além disso, como as proteínas não-enzimáticas, as GSTs são capazes de modular vias que controlam a proliferação celular, diferenciação celular e apoptose, entre outros processos de sinalização [130]. Diferenças na atividade GSTs podem modificar o risco de desenvolvimento de câncer e também pode ter impacto sobre as respostas heterogêneas

para substâncias tóxicas ou de terapias específicas . Além disso, os polimorfismo, presentes em todas as classes das enzimas GST, são conhecidos por contribuir para a variabilidade interindividual e étnica na suscetibilidade a fatores de risco ambientais, predisposição ao câncer e capacidade de resposta de drogas [131].

Em humanos esta superfamília é composta por, seis classes, α ([GSTA](#)), μ ([GSTM](#)), ω ([GSTO](#)) π ([GSTP](#)), θ ([GSTT](#)), e ζ ([GSTZ](#)); e que podem se associar a membrana microsomal ou citosólica. As GSTs microsomais contém três isoformas (mGST 1, 2, e 3) e está envolvida no metabolismo endógeno de prostaglandinas e leucotrienos [131] .

Em nosso estudo as GSTs, GSTT, MGST1, MGST2 e MGST3 apresentaram um padrão de expressão alterado. Apesar de existirem estudos investigando a relação entre polimorfismos de GST com a leucemia aguda entre outros tipos tumorais existe pouca informação sobre o papel de enzimas GSTs no desenvolvimento de LMC . Na leucemia mielóide crônica o polimorfismo GSTt1 pode estar associado com o oncogene BCR-ABL1 e pode influir com sucesso do tratamento destes com inibidores da tirosina Kinase (TKI).

Estudos sobre a importância do polimorfismo GSTs em LMC ainda são escassos e permanecem inconclusivo. O efeito conjunto de genótipos variantes GST encontrado em várias outras populações, sugere que genótipos GST combinado deve ser uma forma de avaliação mais apropriado para o risco LMC, em vez de considerar apenas genes individuais [131].

Nos estudos de proteômica, também, foi possível observar a super-expressão da proteína estearoil-CoA desnaturase 1 (SCD1) no grupo que estava em restrição sérica por 72h. A SCD1 encontra-se localizada predominantemente no reticulo endoplasmático

e é uma enzima chave no metabolismo dos ácidos graxos. A alteração do metabolismo lipídico, caracterizado pelo aumento da produção endogena de ácidos graxos (FA), tem sido associada com a patogênese de LMC e de vários outros tumores malignos humanos incluindo o de mama, o de próstata, o do cólon, e câncer de pulmão [132]. O aumento da síntese endógena de colesterol ocorre devido ao fato da SCD1 formar uma ligação dupla na estearoil-Coa, uma enzima que catalisa um passo limitante da taxa na síntese dos ácidos graxos insaturados. Este processo transforma o ácido graxo esteárico saturado no ácido graxo oleico mono-insaturado, que é o principal produto formado pela SCD1. A proporção de ácido esteárico transformado em ácido oleico tem sido implicada na regulação do crescimento e diferenciação celulares através de efeitos sobre a fluidez da membrana celular e a transdução de sinais. Ao fazer isso, SCD1 pode ter um papel diferente na sobrevivência celular, protegendo contra lipotoxicidade induzida FA e ao mesmo tempo promovendo o crescimento e proliferação celular através de efeitos sobre a fluidez da membrana celular e a transdução de sinais [124].

A SCD1 também está envolvida na regulação da inflamação e estresse em tipos celulares distintos, incluindo as células B, adipócitos, macrófagos, células endoteliais e miócitos. Além disso, a perda completa de expressão de SCD1 tem sido implicada na disfunção do fígado e várias doenças inflamatórias tais como a dermatite, a aterosclerose, a colite intestinal. Assim, a função celular normal requer uma expressão de SCD1 rigorosamente controlada. A alteração dos níveis elevados de SCD1 são correlacionados com uma maior malignidade tumoral e ao desenvolvimento de resistência a apoptose induzida por quimioterápicos [124].

CONCLUSÃO

Nossos dados indicam que somente a restrição lipídica não é suficiente para causar alteração na viabilidade e ciclo celular nas células K562. Já a restrição sérica diminui a viabilidade celular e nas células remanescentes causou a alteração do ciclo celular (diminuição da fase G1 e aumento da fase G2/M) além de causar um pequeno incremento da resistência celular a fatores ambientais e quimioterápicos.

Estas alterações foram corroboradas ao se empregar análise proteômica global na qual pode-se observar mudança de expressão relacionadas a resistência como de diversas proteínas SCD1 (o que cada uma é), MGST2, MGST1, GSTT1 e MGT3 e do ciclo celular.

ANEXOS

ANEXO 1:

**Carta de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa - Protocolo de
Pesquisa Nº 416/15**



APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 07/10/2015, APROVOU o Protocolo de Pesquisa nº 416/15 intitulado: "ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DA RESTRIÇÃO NUTRICIONAL NA MODULAÇÃO PROTEICA DE CÉLULAS DE LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA(K562)." apresentado pelo Departamento de CLÍNICA MÉDICA

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 466/12, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: Sergio Paulo Bydlowski

Pesquisador (a) Executante: Ana Carolina Bassi Stern

CEP-FMUSP, 07 de Outubro de 2015.

Profa. Dra. Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina
e-mail: cep.fm@usp.br

ANEXO 2

Carta de doação das bolsas de plasma de baixo volume



*Irmandade da Santa Casa de
Misericórdia de São Paulo
Hemocentro*



São Paulo, 09 de junho de 2015.

Ilmo. Sr.

Prof. Dr. Sergio Paulo Bydlowski

Chefe do Laboratório de Genética Molecular e Biotecnologia

FMUSP (LIM31)

Prezado Professor

Conforme nossos entendimentos, vimos confirmar o compromisso de fornecimento de unidades de plasma humano, com baixo volume, provenientes de doações de sangue incompletas que constituem produtos de descarte do hemocentro, a serem utilizadas na obtenção de lipoproteínas (LDL e HDL), para uso exclusivo em projeto de pesquisa intitulado 'Análise da influência da restrição nutricional na modulação proteica de células de leucemia mielóide crônica (k562)' sob vossa responsabilidade.

Tais lipoproteínas, extraídas por método de ultracentrifugação, devem provir de plasma não congelado e não podem ser obtidas a partir de *pool* de pequenos volumes de plasmas. As bolsas com baixo volume constituem, assim, material adequado para esta obtenção.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Dante Mario Langhi Junior

Coordenador do Setor de Hemoterapia

Hemocentro da Santa Casa de São Paulo

1

ANEXO 3

Lista das proteínas diferencialmente reguladas após 24h em restrição lipídica

Descrição	Gene	Rest. lipídica/CTR	SD
Arginase-2, mitochondrial	AR G2	0,60	0,03
F-related antigen 1	FOS L1	0,66	0,04
Protein NipSNAP homolog 1	NIPSNAP1	0,66	0,02
Enconsin	MAP7	0,68	0,05
Lysine-specific demethylase 3B	KDMBB	0,70	0,05
Alde-1-epimerase	GALM	0,74	0,03
Serpin B6	SERPINB6	0,76	0,04
C oactin-like protein	COTL1	0,77	0,05
Telomeric repeat-binding factor 2-interacting protein 1	TERF2IP	0,77	0,04
Transferrin receptor protein 1	TFRC	0,77	0,04
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10, mitochondrial	NDUFA10	0,79	0,02
Dynamin-2	DNM2	0,80	0,01
Coronin-7	CORO7	0,82	0,01
General transcription factor IIIE subunit 1	GTF2E1	0,85	0,00
Translational activator of cytochrome c oxidase 1	TACO1	0,85	0,01
Echinoderm microtubule-associated protein-like 4	EML4	0,86	0,02
UBX domain-containing protein 7	UBXN7	0,86	0,02
UDP-N-acetylglucamine--peptide N-acetylglucaminylyltransferase 110 kDa subunit	OGT	0,87	0,01
Exome complex component CS L4	EXOSC1	0,88	0,02
S taphylococcal nucleic acid domain-containing protein 1	SND1	0,88	0,03
Pre-mRNA-processing factor 40 homolog A	PRPF40A	0,89	0,02
WD repeat-containing protein 3	WDR3	0,89	0,01
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5	DDX5	0,90	0,01
Basic leucine zipper and W2 domain-containing protein 2	BZW2	0,91	0,01
Nucleosome assembly protein 1-like 4	NAP1L4	0,91	0,02
U4/U6.U5 tri-snRNP-associated protein 2	USP39	0,91	0,02
3-mercaptopropionate sulfurtransferase	MPS1	0,92	0,02
GMP synthase [glutamine-hydrolyzing]	GMP1	0,92	0,02
NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3, mitochondrial	NDUFS3	0,92	0,00
S erine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha isoform	PPP2R1A	0,93	0,01
E longation factor 1-beta	EFT1B2	1,11	0,03
R etinal dehydrogenase 1	ALDH1A1	1,17	0,02
Peroxiredoxin-1	PRDX1	1,18	0,02
MIP18 family protein FAM96A	FAM96A	1,22	0,02
Tubulin-specific chaperone C	TBC1C	1,47	0,01
Proteasome assembly chaperone 3	PSMG3	1,64	0,11
Clusterin	CLU	4,61	0,79

ANEXO 4

Lista das proteínas diferencialmente reguladas após 72h em restrição lipídica

Descrição	Gene	Rest. lipídica/CTRL	SD
Arginase-2, mitochondrial	ARG2	0,55	0,03
Multiple myeloma tumor-associated protein 2	MMTAG2	0,66	0,03
Serine palmitoyltransferase 2	SPTLC2	0,67	0,04
Branched-chain-amino-acid aminotransferase, mitochondrial	BCAT2	0,69	0,03
Myo light chain 4	MYL4	0,69	0,04
Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member	SLC2A1	0,71	0,02
Serpin B9	SERPINA9	0,72	0,04
39S ribosomal protein L48, mitochondrial	MRPL48	0,73	0,03
Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	VDAC2	0,78	0,01
Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase	ALDH18A1	0,81	0,03
Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	VDAC1	0,81	0,01
mRNA cap guanine-N7 methyltransferase	RNMT	0,82	0,02
Protein FAM98B	FAM98B	0,84	0,02
Nuclear pore complex protein Nup155	NUP155	0,89	0,01
Nuclear cap-binding protein subunit 1	NCBP1	0,90	0,02
Sepiapterin reductase	SPR	0,90	0,01
Thymidylate kinase	DTYMK	0,91	0,02
Polyadenylate-binding protein 1	PABPC1	1,11	0,02
Protein syndesm	NUDT16L1	1,20	0,04
Adenine 3'-phosphate 5'-phosphate transporter 1	SLC35B2	1,29	0,06

ANEXO 5

Lista das proteínas diferencialmente reguladas após 24h em restrição sérica

Descrição	Gene	Rest. sérica/CTRL	SD
Clusterin	CLU	0,11	0,01
Lumican	LUM	0,15	0,01
Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase, mitochondrial	GPX4	0,35	0,04
Proteasome assembly chaperone 3	PSMG3	0,55	0,04
Junctional adhesion molecule A	F11R	0,56	0,07
Mitochondrial intermediate peptidase	MIP	0,56	0,05
Rho-associated protein kinase 1	ROCK1	0,66	0,04
Tubulin-specific chaperone C	TBC1C	0,66	0,06
Aldo-keto reductase family 1 member C1	AKR1C1	0,68	0,04
40S ribosomal protein S23	RPS23	0,73	0,04
Lysosomal Pro-X carboxypeptidase	PRCP	0,76	0,04
Retinal dehydrogenase 1	ALDH1A1	0,76	0,04
Secretory carrier-associated membrane protein 3	SCAMP3	0,77	0,02
Peroxiredoxin-1	PRDX1	0,78	0,02
Rab9 effector protein with kelch motifs	RABEPK	0,78	0,03
Dipeptidyl peptidase 1	CTSC	0,85	0,03
Aconitate hydratase, mitochondrial	ACO2	0,86	0,03
Glutaredoxin-3	GLRX3	0,86	0,04
Probable lysosomal cobalamin transporter	LMBRD1	0,88	0,02
Glucidase 2 subunit beta	PRKCSH	0,91	0,02
Actin-related protein 2/3 complex subunit 5-like protein	ARP25L	0,97	0,00
General transcription factor II-I	GTF2I	1,07	0,00
Splicing factor 3B subunit 1	SF3B1	1,08	0,02
RNA-binding protein 27	RBM27	1,11	0,01
Ras GTPase-activating protein-binding protein 2	G3BP2	1,12	0,03
116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein component	EFTUD2	1,13	0,01
4-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase	ALDH9A1	1,13	0,02
Splicing factor 3B subunit 3	SF3B3	1,13	0,03
Tetratricopeptide repeat protein 4	TTC4	1,15	0,03
Basic leucine zipper and W2 domain-containing protein 1	BZW1	1,17	0,03
Diphosphoinositol polyphosphate phosphohydrolase 2	NUDT4	1,18	0,04
Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1	SND1	1,18	0,04
Coronin-7	CORO7	1,19	0,03
Cytochrome c oxidase subunit NDUF A4	NDUFA4	1,19	0,01
DNA-directed RNA polymerase I subunit RPA2	POLR1B	1,21	0,05
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5	DDX5	1,21	0,02
RNA-binding protein 4	RBM4	1,22	0,06
28S ribosomal protein S5, mitochondrial	MRPS5	1,24	0,05
Chromobox protein homolog 3	CBX3	1,26	0,06
UDP-N-acetylhexamine pyrophosphorylase	UAP1	1,26	0,08
60S ribosomal protein L15	RPL15	1,27	0,03
Signal transducer and activator of transcription 5A	STAT5A	1,29	0,05
Beta-arrestin-1	ARRB1	1,31	0,02
Protein kinase C beta type	PRKCB	1,34	0,10
GTPase NRAs	NRAS	1,35	0,02
Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, cytoplasmic	HMGCS1	1,38	0,08
Carboxymethylenebutenolidase homolog	CMBL	1,39	0,08
Alde-1-epimerase	GALM	1,40	0,09
Ribosome biogenesis protein WDR12	WDR12	1,48	0,13
Transferrin receptor protein 1	TFRC	1,49	0,04
Vasodilator-stimulated phosphoprotein	VASP	1,56	0,18
Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim8 B	TIMM8B	1,60	0,05
Gamete-specific factor 1	GTSF1	1,94	0,14
F-related antigen 1	FOSL1	1,98	0,21
Metallothionein-1G	MT1G	11,98	2,68

ANEXO 6

Lista das proteínas diferencialmente reguladas após 72h em restrição lipídica

Descrição	Gene	Rest. sérica/CTRL	SD
Clusterin	CLU	0,29	0,05
Aldo-keto reductase family 1 member C2	AKR1C2	0,34	0,10
Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 15	MED15	0,35	0,05
SAP30-binding protein	SAP30BP	0,37	0,13
Golgi integral membrane protein 4	GOLIM4	0,41	0,05
Polyadenylate-binding protein-interacting protein 2	PAIP2	0,43	0,06
Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase, mitochondrial	GPX4	0,44	0,05
Tubulin-specific chaperone A	TBCA	0,45	0,09
Stathmin	STMN1	0,46	0,09
Protein phosphatase 1 regulatory subunit 14B	PPP1R14B	0,46	0,06
Nucleotide diphosphate kinase B	NME2	0,46	0,08
Short stature homeobox protein 2	SHOX2	0,46	0,12
Eukaryotic translation initiation factor 4B	EIF4B	0,46	0,06
Elongation factor 1-delta	EEF1D	0,47	0,06
Protein S100-A4	S100A4	0,48	0,04
Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha, muscle-specific for	NACA	0,48	0,04
Heat shock cognate 71 kDa protein	HSPA8	0,48	0,10
Transcription factor BTF3	BTF3	0,49	0,01
Prothymin alpha	PTMA	0,49	0,11
Elongation factor 1-beta	EEF1B2	0,49	0,09
Histidine triad nucleotide-binding protein 1	HINT1	0,50	0,06
28 kDa heat- and acid-stable phosphoprotein	PDAP1	0,50	0,05
Lumican	LUM	0,50	0,10
Thioredoxin	TXN	0,51	0,09
Ubiquitin-associated protein 2-like	UBAP2L	0,51	0,03
Hsc70-interacting protein	ST13	0,51	0,05
Ubiquitin domain-containing protein UBFD1	UBFD1	0,52	0,13
Signal recognition particle 14 kDa protein	SRP14	0,52	0,02
Thioredoxin-related transmembrane protein 2	TMX2	0,52	0,11
Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	BP1	0,53	0,12
Nuclear migration protein nudC	NUDC	0,53	0,09
Splicing factor 1	SF1	0,53	0,07
Ran-specific GTPase-activating protein	RANBP1	0,54	0,04
Radixin	RDX	0,55	0,10
Caprin-1	CAPRIN1	0,55	0,06
Protein CDV3 homolog	CDV3	0,55	0,12
BAG family molecular chaperone regulator 3	BAG3	0,55	0,03
Uncharacterized protein C9orf78	C9orf78	0,56	0,02
Heat shock protein HSP_90-alpha	HSP90AA1	0,56	0,04
Eukaryotic translation initiation factor 1b	EIF1B	0,56	0,07
Ubiquitin-conjugating enzyme E2 L3	UBE2L3	0,56	0,05
Deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase, mitochondrial	DUT	0,56	0,02
Ester hydrolase C11orf54	C11orf54	0,57	0,03
PIH1 domain-containing protein 1	PIH1D1	0,57	0,09
PHD finger protein 3	PHF3	0,58	0,17
Tight junction protein ZO-2	TJP2	0,58	0,17
Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1	UBE2V1	0,58	0,12
Cofilin-1	CFL1	0,58	0,13
YTH domain-containing family protein 2	YTHDF2	0,58	0,02
Nucleic acid-sensing element-binding protein 1	YBX1	0,59	0,03
Prefoldin subunit 2	PFDN2	0,59	0,06
Calcyclin-binding protein	CACYBP	0,59	0,07
40S ribosomal protein S28	RPS28	0,59	0,06
Porphobilinogen deaminase	HMB5	0,59	0,05
L-lactate dehydrogenase B chain	LDHB	0,59	0,12
Proline-rich AKT1 substrate 1	AKT1S1	0,59	0,06
Proteasome activator complex subunit 3	PSME3	0,59	0,05
Multifunctional protein ADE2	PAICS	0,59	0,06
High mobility group protein B1	HMG B1	0,59	0,11
dCTP pyrophosphatase 1	DCTPP1	0,60	0,09
40S ribosomal protein S21	RPS21	0,60	0,08
Superoxide dismutase [Cu-Zn]	SOD1	0,60	0,13
Adenylylucinate lyase	ADS L	0,60	0,05
Stress-induced-phosphoprotein 1	STIP1	0,61	0,07
Proliferating cell nuclear antigen	PCNA	0,61	0,07
Ras GTPase-activating protein-binding protein 1	G3BP1	0,61	0,08
Secretory carrier-associated membrane protein 3	SCAMP3	0,61	0,06

Nitric oxide synthase-interacting protein	NOS IP	0,61	0,12
Hsp90 co-chaperone Cdc37	CDC37	0,61	0,05
Protein PRRC2C	PRRC2C	0,61	0,04
Translationally-controlled tumor protein	TPT1	0,61	0,06
Proteasome subunit beta type-7	PSMB7	0,61	0,06
Ataxin-2-like protein	ATXN2L	0,61	0,06
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit J	EIF3J	0,62	0,13
Heat shock 70 kDa protein 1B	HSPA1B	0,62	0,10
Myotrophin	MTPN	0,62	0,04
Calmodulin	CALM1	0,62	0,11
Cysteine and histidine-rich domain-containing protein 1	CHORDC1	0,62	0,06
Polyadenylate-binding protein 1	PABPC1	0,62	0,04
Endothelial differentiation-related factor 1	EDF1	0,62	0,04
Rho GDP-dissociation inhibitor 1	ARHGDI1	0,62	0,08
Phosphatidylinositol transfer protein beta isoform	PITPNB	0,62	0,07
Ubiquitin-conjugating enzyme E2 D2	UBE2D2	0,62	0,07
Proteasome assembly chaperone 3	PSMG3	0,63	0,13
RNA-binding protein EWS	EWSR1	0,63	0,12
Proteasome subunit beta type-4	PSMB4	0,63	0,14
Protein Hikeshi	C11orf73	0,63	0,02
Microtubule-associated protein 4	MAP4	0,63	0,04
RNA-binding protein 3	RBMB3	0,63	0,01
Nuclear transport factor 2	NUTF2	0,63	0,13
Myelin light polypeptide 6	MLY6	0,63	0,04
Dihydrofolate reductase	DHFR	0,63	0,12
Fumarylacetoacetate	FAH	0,64	0,07
Ras GTPase-activating protein-binding protein 2	G3BP2	0,64	0,00
Melanoma inhibitory activity protein 3	MIA3	0,64	0,14
Programmed cell death protein 5	PDCD5	0,64	0,13
Nucleolysin TIA-1 isoform p40	TIA1	0,64	0,00
Rab GDP dissociation inhibitor beta	GDI2	0,64	0,10
Coiled-coil domain-containing protein 86	CCDC86	0,64	0,09
RNA-binding protein FUS	FUS	0,64	0,07
TP53-regulated inhibitor of apoptosis 1	TRIAP1	0,64	0,12
Prfoldin subunit 6	PFDN6	0,65	0,11
Retinal dehydrogenase 1	ALDH1A1	0,65	0,05
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like	HNRNPDL	0,65	0,06
Multiple coagulation factor deficiency protein 2	MCFD2	0,65	0,03
Hepatoma-derived growth factor	HDGF	0,65	0,14
Small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein alpha	SGTA	0,65	0,03
Transitional endoplasmic reticulum ATPase	VCPP	0,65	0,07
Heat shock 70 kDa protein 4	HSPA4	0,65	0,08
Alpha-endulfine	ENSA	0,65	0,11
Rab-like protein 6	RABL6	0,66	0,09
Protein FAM192A	FAM192A	0,66	0,04
STAM-binding protein	STAMBP	0,66	0,03
Src substrate cortactin	CTTN	0,66	0,06
Eukaryotic translation initiation factor 5	EIF5	0,66	0,02
Elongation factor 1-gamma	EEF1G	0,66	0,13
WD repeat-containing protein 18	WDR18	0,66	0,06
Gamma-glutamylcyclotransferase	GGCT	0,67	0,09
Golgi resident protein GC P60	ACBD3	0,67	0,08
Transketolase	TKT	0,67	0,12
Importin-5	IP05	0,67	0,02
Peroxisomal biogenesis factor 19	X19	0,67	0,01
Eukaryotic translation initiation factor 1A, Y-chromosomal	EIF1AY	0,67	0,06
MARC KS-related protein	MARCKS L1	0,67	0,05
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX6	DDX6	0,67	0,03
Bleomycin hydrolase	BLMH	0,67	0,07
Alpha-actinin-1	ACTN1	0,67	0,11
Apoptosis inhibitor 5	AP15	0,67	0,08
Moesin	MSN	0,67	0,10
EF-hand domain-containing protein D2	EFHSD2	0,67	0,07
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit G	EIF3G	0,67	0,07
Alpha-centractin	ACTR1A	0,67	0,02
Prapin	PSAP	0,67	0,01
Ran-binding protein 3	RANBP3	0,67	0,09
Eukaryotic translation initiation factor 5A-1	EIF5A	0,67	0,09
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1	PIN1	0,68	0,10
Transmembrane protein 165	TMEM165	0,68	0,06

GTP-binding nuclear protein Ran	RAN	0,68	0,09
Protein LS M14 homolog A	LS M14A	0,68	0,08
High mobility group protein B3	HMG B3	0,68	0,03
Peroxiredoxin-6	PRDX6	0,68	0,04
Inorganic pyrophosphatase	PPA1	0,68	0,05
Farnesyl pyrophosphate synthase	FDPS	0,68	0,01
60S ribosomal protein L39	RPL39	0,69	0,10
Actin-related protein 2/3 complex subunit 5-like protein	ARP C5L	0,69	0,10
Profilin-1	PFN1	0,69	0,12
V-type proton ATPase subunit G 1	ATP6V1G1	0,69	0,03
NEDD8	NEDD8	0,69	0,04
Eukaryotic translation initiation factor 4H	EIF4H	0,69	0,04
Phosphoglycerate mutase 1	PGAM1	0,69	0,06
Proliferation-associated protein 2G4	PA2G4	0,69	0,08
Heat shock protein HSP 90-beta	HSP90AB1	0,69	0,10
Septin-8	42621,00	0,69	0,03
Anamorsin	CIAPI N1	0,69	0,04
Calponin-2	CNN2	0,69	0,08
CDKN2A-interacting protein	CDKN2AIP	0,69	0,09
PDZ and LIM domain protein 1	PDLIM1	0,69	0,14
Translation initiation factor eIF-2B subunit alpha	EIF2B1	0,69	0,07
6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	PGD	0,69	0,12
Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1	EIF4G1	0,69	0,04
Copper transport protein ATOX1	ATOX1	0,69	0,09
Isocorin-matase domain-containing protein 1	ISOC1	0,69	0,05
Synaptosomal-associated protein 29	SNAP29	0,70	0,04
Hemogen	HEMGN	0,70	0,11
Proteasome activator complex subunit 1	PSME1	0,70	0,09
D-dopachrome decarboxylase	DDT	0,70	0,11
Transcription initiation factor IIA subunit 1	GTF2A1	0,70	0,11
Zinc finger matrin-type protein 2	ZMAT2	0,70	0,08
E3 ubiquitin-protein ligase HUWE1	HUWE1	0,70	0,13
Tubulin-specific chaperone C	TBCC	0,70	0,12
Interferon-induced 35 kDa protein	IFI35	0,70	0,07
CD2-associated protein	CD2AP	0,70	0,10
40S ribosomal protein S17	RPS17	0,70	0,05
Bola-like protein 2	BOLA2	0,70	0,04
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP4	FKBP4	0,70	0,12
Peroxiredoxin-2	PRDX2	0,70	0,03
Lactoylglutathione lyase	GLO1	0,70	0,07
Ubiquitin-conjugating enzyme E2 K	UBE2K	0,70	0,12
Protein O-GlcNAcase	MGEA5	0,71	0,13
Microtubule-associated protein RP/EB family member 1	MAPRE1	0,71	0,09
Aldo-keto reductase family 1 member C1	AKR1C1	0,71	0,07
Adenylylhomocysteinase	AHCY	0,71	0,11
Elongation factor 2	EFF2	0,71	0,05
Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N	UBE2N	0,71	0,12
Far upstream element-binding protein 1	FUBP1	0,71	0,07
Mitotic spindle assembly checkpoint protein MAD2A	MAD2L1	0,71	0,02
Small acidic protein	SMAP	0,71	0,14
DNA primase small subunit	PRIM1	0,71	0,05
DNA polymerase alpha catalytic subunit	POL A1	0,72	0,13
SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein	SH3BGR1	0,72	0,12
Acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic	ACAT2	0,72	0,08
Eukaryotic peptide chain release factor subunit 1	ETF1	0,72	0,06
Cotamer subunit delta	ARC N1	0,72	0,03
N-alpha-acetyltransferase 10	NAA10	0,72	0,06
Proteasome subunit alpha type-2	PSMA2	0,72	0,06
40S ribosomal protein S12	RPS12	0,72	0,04
Protein deglycase DJ-1	PARK7	0,72	0,11
Huntingtin-interacting protein K	HYPK	0,72	0,09
CUGBP E lav-like family member 2	CELF2	0,72	0,05
Cytochrome c oxidase assembly factor 6 homolog	COA6	0,72	0,09
Targeting protein for Xklp2	TPX2	0,72	0,06
Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, cytoplasmic	HMGCS1	0,73	0,07
Proteasome subunit alpha type-4	PSMA4	0,73	0,06
Prefoldin subunit 5	PFDN5	0,73	0,08
Partner of Y14 and mago	WIBG	0,73	0,08
40S ribosomal protein S13	RPS13	0,73	0,05
Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	HPRT1	0,73	0,07

Endoplasmic reticulum resident protein 29	ERP29	0,73	0,10
Signal recognition particle 9 kDa protein	SRP9	0,73	0,02
UV excision repair protein RAD23 homolog A	RAD23A	0,73	0,02
Splicing factor, proline- and glutamine-rich	SFPQ	0,74	0,05
BUB3-interacting and GLEBS motif-containing protein ZNF207	ZNF207	0,74	0,09
Coiled-coil domain-containing protein 6	CCDC6	0,74	0,08
NSFL1 cofactor p47	NSFL1C	0,74	0,12
Ubiquitin-like-conjugating enzyme ATG3	ATG3	0,74	0,09
Beta-arrestin-1	ARRB1	0,74	0,06
Proteasome subunit alpha type-1	PSMA1	0,74	0,05
Nuclear autoantigenic sperm protein	NASP	0,74	0,08
Protein farnesyltransferase/geranylgeranyltransferase type-1 subunit alpha	FNTA	0,74	0,02
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	0,74	0,10
UBX domain-containing protein 1	UBXN1	0,74	0,02
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0	HNRNP D	0,74	0,05
Annexin A1	ANXA1	0,74	0,11
Nuclear pore complex protein Nup50	NUP50	0,74	0,05
AP-2 complex subunit mu	APM1	0,74	0,04
Double-stranded RNA-binding protein Staufen homolog 1	STAU1	0,74	0,06
DnaJ homolog subfamily C member 8	DNAJC8	0,75	0,03
Ribosome maturation protein SBDS	SBDS	0,75	0,04
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP3	FKBP3	0,75	0,05
Upstream stimulatory factor 2	USF2	0,75	0,11
U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein Prp3	PRPF3	0,75	0,09
Heat shock 70 kDa protein 4L	HSPA4L	0,75	0,02
Serine/threonine-protein kinase PAK 2	PAK2	0,75	0,09
Uroporphyrinogen decarboxylase	UROD	0,75	0,07
Mitogen-activated protein kinase 1	MAPK1	0,75	0,00
U2 small nuclear ribonucleoprotein B''	SNRPB2	0,75	0,13
CCR4-NOT transcription complex subunit 3	CNOT3	0,75	0,10
T-complex protein 1 subunit delta	CCT4	0,75	0,06
14-3-3 protein gamma	YWHAG	0,75	0,13
Glutamate-cysteine ligase catalytic subunit	GCLC	0,75	0,10
Glutaredoxin-3	GLRX3	0,75	0,02
Proteasome subunit alpha type-5	PSMA5	0,75	0,05
High mobility group nucleosome-binding domain-containing protein 5	HMGN5	0,75	0,05
Ubiquitin-like domain-containing CTD phosphatase 1	UBLCP1	0,75	0,02
Ribonucleotide-diphosphate reductase subunit M2	RRM2	0,75	0,05
Proteasome maturation protein	POMP	0,75	0,10
AP-1 complex subunit sigma-1A	AP1S1	0,75	0,06
BRO1 domain-containing protein BROX	BROX	0,76	0,11
Polypyrimidine tract-binding protein 1	PTBP1	0,76	0,08
Aspartate aminotransferase, cytosolic	GOT1	0,76	0,12
CLIP-associated protein 2	CLASP2	0,76	0,04
Adaptin ear-binding coat-associated protein 2	NECAP2	0,76	0,05
Nucleobindin-2	NUCB2	0,76	0,04
T-complex protein 1 subunit theta	CCT8	0,76	0,07
m7GpppX diphosphatase	DCPS	0,76	0,08
Ubiquitin-conjugating enzyme E2 D3	UBE2D3	0,76	0,08
THUMP domain-containing protein 1	THUMPD1	0,76	0,09
N-alpha-acetyltransferase 25, NatB auxiliary subunit	NAA25	0,76	0,03
Calcium-binding protein 39	CAB39	0,76	0,12
Transcription elongation factor A protein 1	TCEA1	0,76	0,09
Protein canopy homolog 2	CNPY2	0,76	0,02
60S ribosomal protein L37	RPL37	0,76	0,06
V-type proton ATPase subunit C 1	ATP6V1C1	0,76	0,10
Tripeptidyl-peptidase 2	TPP2	0,76	0,09
DNA-directed RNA polymerase I subunit RPA34	CD3EAP	0,76	0,05
Proteasome subunit alpha type-3	PSMA3	0,76	0,14
Protein SG10 homolog	SUGT1	0,76	0,07
DNA damage-binding protein 1	DDB1	0,76	0,02
Regulator of nonsense transcripts 3B	UPF3B	0,76	0,07
S-adenylmethionine synthase isozyme type-2	MAT2A	0,76	0,06
Regulator complex protein LAMTOR1	LAMTOR1	0,77	0,02
Nardilysin	NRD1	0,77	0,03
Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member A	ANP32A	0,77	0,09
Protein TFG	TFG	0,77	0,14
Plastin-1	PLS1	0,77	0,09
Actin-related protein 2	ACTR2	0,77	0,08
BUD13 homolog	BUD13	0,77	0,04

DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase	AX1	0,77	0,08
T-complex protein 1 subunit beta	CCT2	0,77	0,04
Transcription elongation regulator 1	TCERG1	0,77	0,01
Intraflagellar transport protein 25 homolog	HSPB11	0,77	0,07
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A	EIF3A	0,77	0,06
Coiled-coil domain-containing protein 50	CCDC50	0,77	0,07
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B	EIF3B	0,77	0,01
Prstaglandin E synthase 3	PTGES3	0,77	0,00
Palmitoyl-protein thioesterase 1	PTT1	0,77	0,10
Macrophage-capping protein	CAPG	0,77	0,12
Poly(ADP-ribose) glycohydrolase ARH3	ADPRHL2	0,77	0,10
Ubiquitin-like protein 4A	UBL4A	0,77	0,07
OTU domain-containing protein 6B	OTUD6B	0,77	0,03
Oxysterol-binding protein-related protein 9	OSBPL9	0,77	0,05
Proteasome subunit alpha type-7	PSMA7	0,77	0,12
Protein PRRC2A	PRRC2A	0,78	0,02
DnaJ homolog subfamily C member 9	DNAJC9	0,78	0,07
Histone-binding protein RBBP4	RBBP4	0,78	0,06
Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase	PSAT1	0,78	0,08
T-complex protein 1 subunit alpha	TCP1	0,78	0,07
Proteasome subunit beta type-3	PSMB3	0,78	0,08
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit H	EIF3H	0,78	0,08
PEST proteolytic signal-containing nuclear protein	PCNP	0,78	0,05
Leucine-rich repeat-containing protein 40	LRRK40	0,78	0,08
Annexin A5	ANXA5	0,78	0,05
Obg-like ATPase 1	OLA1	0,78	0,03
40S ribosomal protein S30	FAU	0,78	0,06
DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB7	POLR2G	0,78	0,04
NAD(P)H-hydrate epimerase	APOA1BP	0,78	0,05
Crk-like protein	CRKL	0,78	0,01
Glyoxalase domain-containing protein 4	GLOD4	0,79	0,07
Uncharacterized protein C19orf43	C19orf43	0,79	0,08
Histone deacetylase 2	HDAC2	0,79	0,03
Nibrin	NBN	0,79	0,05
Adenylylucinate synthetase isozyme 2	ADSS	0,79	0,04
Malate dehydrogenase, cytoplasmic	MDH1	0,79	0,11
COP9 signalosome complex subunit 1	GPS1	0,79	0,05
Leukalbin	SPN	0,79	0,04
Actin-related protein 2/3 complex subunit 3	ARP C3	0,79	0,02
40S ribosomal protein S4	RPSA	0,79	0,08
60S acidic ribosomal protein P2	RPLP2	0,79	0,07
Replication protein A 32 kDa subunit	RPA2	0,79	0,05
Refoldin subunit 1	PFDN1	0,79	0,05
Tetratricopeptide repeat protein 1	TTC1	0,79	0,06
Adenylate kinase isoenzyme 6	AK6	0,80	0,06
Nucleolar protein 14	NOP14	0,80	0,08
THO complex subunit 4	ALYREF	0,80	0,04
S-phase kinase-associated protein 1	SKP1	0,80	0,08
Nuclear pore complex protein Nup214	NUP214	0,80	0,06
COP9 signalosome complex subunit 2	COPS2	0,80	0,07
60S ribosomal protein L5	RPL5	0,80	0,05
Far upstream element-binding protein 2	KHSRP	0,80	0,12
Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	IDH1	0,80	0,09
Spectrin alpha chain, erythrocytic 1	SPTA1	0,80	0,05
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C-like protein	EIF3CL	0,80	0,03
Phosphorylformylglycinamide synthase	PFAS	0,80	0,03
UV excision repair protein RAD23 homolog B	RAD23B	0,80	0,05
Poly(U)-binding-splicing factor PUF60	PUF60	0,81	0,11
SAM domain-containing protein SAM N-1	SAMSN1	0,81	0,06
Coronin-1C	CORO1C	0,81	0,05
Protein phosphatase 1G	PPM1G	0,81	0,02
T-complex protein 1 subunit epsilon	CCT5	0,81	0,08
Ankyrin repeat domain-containing protein 17	ANKRD17	0,81	0,04
Polyglutamine-binding protein 1	PQBP1	0,81	0,06
SUMO-conjugating enzyme UBC9	UBE2I	0,81	0,07
CLIP-associating protein 1	CLASP1	0,81	0,06
ATP-dependent RNA helicase DDX42	DDX42	0,81	0,04
Protein phosphatase methylesterase 1	PPME1	0,81	0,06
Heat shock protein 105 kDa	HSPH1	0,81	0,01
Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1	IQGAP1	0,81	0,04

Pyruvate kinase M	PKM	0,81	0,07
Adenine kinase	ADK	0,82	0,03
T-complex protein 1 subunit eta	CCT7	0,82	0,06
Nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1	NOLC1	0,82	0,08
Serine/threonine-protein phosphatase 5	PPP5C	0,82	0,02
Zinc finger C C C H domain-containing protein 15	ZC3H15	0,82	0,03
Splicing factor 3A subunit 3	SF3A3	0,82	0,02
RAC-beta serine/threonine-protein kinase	AKT2	0,82	0,08
Protein Ls M14 homolog B	LSM14B	0,83	0,05
TATA-binding protein-associated factor 2N	TAF15	0,83	0,06
Early endosome antigen 1	EEA1	0,83	0,06
Inositol-degrading enzyme	IDE	0,83	0,08
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit K	EIF3K	0,83	0,04
Ribosome-binding protein 1	RIBBP1	0,83	0,05
Thioredoxin-like protein 1	TXNL1	0,83	0,05
Exome complex component RRP45	EXOSC9	0,83	0,05
Lysine-tRNA ligase	KARS	0,83	0,02
Splicing factor 3A subunit 1	SF3A1	0,84	0,08
Ribonuclease H2 subunit A	RNASEH2A	0,84	0,07
Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11	PTPN11	0,84	0,07
15 kDa selenoprotein	42628	0,84	0,01
Valine-tRNA ligase	VARS	0,84	0,09
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	HNRNPA1	0,84	0,06
ADP-ribosylation factor 3	ARF3	0,84	0,04
Vigilin	HDLBP	0,84	0,07
Perilipin-2	PLIN2	0,84	0,06
Thioredoxin reductase 1, cytoplasmic	TXNRD1	0,84	0,05
Annexin A2	ANXA2	0,84	0,03
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 14	USP14	0,84	0,08
Spindle and kinetochore-associated protein 1	SKA1	0,85	0,04
Signal recognition particle 19 kDa protein	SRP19	0,85	0,06
Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1	EIF2S1	0,85	0,02
Developmentally-regulated GTP-binding protein 1	DRG1	0,85	0,01
Proteasome subunit beta type-2	PSMB2	0,85	0,02
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 9	PSMD9	0,86	0,06
Nucleosome assembly protein 1-like 4	NAP1L4	0,86	0,02
40S ribosomal protein S5	RPS5	0,86	0,01
Vesicle-associated membrane protein 7	VAMP7	0,86	0,05
Protein dyo-30 homolog	DYD30	0,86	0,06
Dynactin subunit 2	DCTN2	0,86	0,03
Programmed cell death 6-interacting protein	PDCD6IP	0,86	0,07
Cytoplasmic FMR1-interacting protein 1	CYFIP1	0,86	0,09
Myeloid-derived growth factor	MYDGF	0,86	0,04
Splicing factor, arginine/serine-rich 19	SCAF1	0,86	0,07
Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	HNRNPA2B1	0,87	0,01
Trafficking protein particle complex subunit 2-like protein	TRAPPCL	0,87	0,03
Gamma-soluble NSF attachment protein	NAPG	0,87	0,05
Glycogen debranching enzyme	AGL	0,87	0,05
N-alpha-acetyltransferase 50	NAA50	0,87	0,04
Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 2	EIF2S2	0,87	0,05
40S ribosomal protein S10	RPS10	0,87	0,07
Parafibromin	CDC73	0,88	0,05
RNA-binding motif protein, X chromosome	RBMX	0,88	0,06
Coatomer subunit zeta-1	COPZ1	0,88	0,01
UMP-CMP kinase	CMPK1	0,88	0,03
Paraspeckle component 1	PSPC1	0,88	0,07
RNA-binding protein 8A	RBM8A	0,88	0,06
AP-1 complex subunit gamma-1	APG1	0,88	0,04
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase D	PPID	0,89	0,05
Coatomer subunit epsilon	CO	0,89	0,04
Amidophosphoryltransferase	PPAT	0,89	0,01
U2 small nuclear ribonucleoprotein A'	SNRPA1	0,90	0,03
Glucidase 2 subunit beta	PRKCSH	0,90	0,04
Chloride intracellular channel protein 4	CLIC4	0,90	0,02
Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha isoform	PPP2R1A	0,91	0,03
(E3-independent) E2 ubiquitin-conjugating enzyme	UBE2O	0,91	0,04
Poly(rC)-binding protein 1	PCBP1	0,91	0,05
Importin subunit beta-1	KPNB1	0,91	0,02
DNA fragmentation factor subunit alpha	DFFA	0,92	0,02
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	HNRNPA3	0,93	0,02

Mitochondrial import receptor subunit TOM34	TOMM34	0,94	0,02
S TE 20-like serine/threonine-protein kinase	SLK	0,94	0,01
UP F0568 protein C 14orf166	C14orf166	1,06	0,02
Ankyrin-1	ANK1	1,06	0,04
E 3 UF M1-protein ligase 1	UFL1	1,08	0,02
ATP-dependent RNA helicase DHX36	DHX36	1,08	0,03
Phosphoinositide 3-kinase regulatory subunit 4	PIK3R4	1,09	0,00
Translation initiation factor eIF-2B subunit beta	EIF2B2	1,09	0,05
Glia maturation factor beta	GMFB	1,09	0,04
Surfeit locus protein 6	SURF6	1,09	0,05
Annexin A7	ANXA7	1,09	0,02
Importin-8	IPO8	1,10	0,02
Serine/threonine-protein phosphatase 2A 56 kDa regulatory subunit delta isoform	PPP2RD5D	1,10	0,04
ATP-binding cassette sub-family F member 3	ABC F3	1,10	0,07
RNA-binding protein 42	RBM42	1,10	0,05
Leucine-tRNA ligase, cytoplasmic	LARS	1,11	0,04
DNA-directed RNA polymerase I subunit RPA49	POLR1E	1,11	0,07
Translation initiation factor eIF-2B subunit delta	EIF2B4	1,11	0,06
Uridine 5'-monophosphate synthase	UMPS	1,12	0,06
Fragile X mental retardation syndrome-related protein 2	FXR2	1,12	0,04
Enhancer of mRNA-decapping protein 3	EDC3	1,12	0,04
Rho GTPase-activating protein 17	ARHGAP17	1,12	0,04
SRSF protein kinase 1	SRPK1	1,12	0,04
Elongator complex protein 4	ELP4	1,12	0,06
Phenylalanine-tRNA ligase alpha subunit	FARS A	1,13	0,07
Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1	DYNC1H1	1,13	0,06
Ribome biogenesis regulatory protein homolog	RRS1	1,13	0,03
FH1/FH2 domain-containing protein 1	FHOD1	1,13	0,08
E3 SUMO-protein ligase RanBP2	RANBP2	1,13	0,06
Adipocyte plasma membrane-associated protein	APMAP	1,13	0,03
RNA polymerase II-associated factor 1 homolog	PAF1	1,13	0,08
Probable ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase FAF-X	USP9X	1,13	0,09
Serine/threonine-protein phosphatase 6 regulatory subunit 3	PPP6R3	1,14	0,06
Structural maintenance of chromosomes protein 1A	SMC1A	1,14	0,08
Probable dimethyladenine transferase	DIMT1	1,14	0,05
WD repeat-containing protein 43	WDR43	1,14	0,06
U4/U6.U5 tri-snRNP-associated protein 2	USP39	1,14	0,04
Negative elongation factor E	NELE	1,14	0,05
Anaphase-promoting complex subunit 7	ANAPC7	1,14	0,05
Translational activator GCN1	GCN1L1	1,15	0,06
Proteasome activator complex subunit 2	PSME2	1,15	0,08
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 13	PSMD13	1,15	0,08
60 kDa S-A/R ribonucleoprotein	TR OVE2	1,15	0,09
Vesicle-fusing ATPase	NSF	1,15	0,05
Structural maintenance of chromosomes protein 5	SMC5	1,15	0,09
Isoleucine-tRNA ligase, cytoplasmic	IARS	1,15	0,05
Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 6	UBA6	1,15	0,02
Transmembrane protein 11, mitochondrial	TME11	1,15	0,08
Pyruvate kinase P KLR	PKLR	1,16	0,04
cTAGE family member 5	CTAGE5	1,16	0,07
Histone deacetylase 1	HDAC1	1,16	0,10
E3 ubiquitin/LG15 ligase TRIM25	TRIM25	1,16	0,05
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1	PSMD1	1,16	0,03
Acyl-protein thioesterase 2	LYPLA2	1,16	0,08
Protein disulfide-isomerase A6	PDI A6	1,16	0,10
Cell cycle and apoptosis regulator protein 2	CCAR2	1,16	0,10
Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim10	TIMM10	1,16	0,09
Nuclear cap-binding protein subunit 1	NCBP1	1,16	0,06
Protein virilizer homolog	KIAA1429	1,16	0,04
WD repeat and HMG-box DNA-binding protein 1	WDHD1	1,16	0,07
RNA-binding protein 14	RBM14	1,16	0,07
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX46	DDX46	1,16	0,10
Protein flightless-1 homolog	FLII	1,16	0,03
Splicing factor 45	RBM17	1,16	0,06
Guanine nucleotide-binding protein-like 1	GNL1	1,16	0,05
116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein component	EFTUD2	1,16	0,08
Inine-5'-monophosphate dehydrogenase 1	IMPDH1	1,17	0,04
Nuclear mitotic apparatus protein 1	NUMA1	1,17	0,05
26S protease regulatory subunit 8	PSMC5	1,17	0,05
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 5	USP5	1,17	0,05

IS T1 homolog	IS T1	1,17	0,07
Mitochondrial carrier homolog 2	MTC H2	1,17	0,03
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 10	USP10	1,17	0,03
DNA replication licensing factor MCM6	MCM6	1,17	0,07
Serine/threonine-protein phosphatase PP1-gamma catalytic subunit	PPP1CC	1,17	0,08
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 1	HNRNPUL1	1,17	0,04
RING finger protein 113A	RNF113A	1,17	0,08
Sodium/potassium-translocating ATPase subunit alpha-1	ATP1A1	1,17	0,09
tRNA (cytidine(34)-C(5))-methyltransferase	NSUN2	1,17	0,05
NEDD8-activating enzyme E1 catalytic subunit	UBA3	1,17	0,07
Reticulon-3	RTN3	1,17	0,11
Caspase-6	CASP6	1,17	0,06
5'-AMP-activated protein kinase subunit gamma-1	PRKAG1	1,17	0,06
Nuclear pore complex protein Nup88	NUP88	1,17	0,11
Signal transducer and activator of transcription 1-alpha/beta	STAT1	1,18	0,08
Aspartate-tRNA ligase, cytoplasmic	DARS	1,18	0,06
Phosphoacetylglucamine mutase	PGM3	1,18	0,09
Elongator complex protein 1	IKB KAP	1,18	0,04
RNA-binding protein 4	RBM4	1,18	0,10
SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A member 1	SMARCB1	1,18	0,12
Cell division control protein 42 homolog	CDC42	1,18	0,07
Golgin subfamily A member 2	GOLGA2	1,18	0,02
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 7	USP7	1,18	0,07
60S ribosomal export protein NMD3	NMD3	1,18	0,04
Structural maintenance of chromosomes protein 4	SMC4	1,18	0,05
Oxidoreductase HTATIP 2	HTATIP2	1,19	0,03
DnaJ homolog subfamily C member 2	DNAJC2	1,19	0,04
THO complex subunit 5 homolog	THOC5	1,19	0,08
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M	HNRNPM	1,19	0,08
Replication factor C subunit 3	RFC3	1,19	0,13
Dynein light chain roadblock-type 1	DYNLRB1	1,19	0,06
Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 1	CPSF1	1,19	0,05
Poly(A) RNA polymerase, mitochondrial	MTPAP	1,19	0,07
Drebrin	DBN1	1,19	0,06
ATP-dependent RNA helicase A	DHX9	1,19	0,02
Protein SDA1 homolog	SDAD1	1,19	0,10
Methylcrotonoyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial	MCC2	1,19	0,09
DnaJ homolog subfamily C member 21	DNAJC21	1,19	0,11
Unconventional myrin-XVIIa	MYO18A	1,19	0,08
Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-2	GNB2	1,19	0,10
U3 small nucleolar ribonucleoprotein protein MPP10	MPHOSPH10	1,19	0,03
Caspainolytic peptidase B protein homolog	CLPB	1,19	0,06
Ribonuclease T2	RNASET2	1,19	0,10
Zinc finger protein 622	ZNF622	1,20	0,06
Drl-associated corepressor	DRAP1	1,20	0,11
Cateye syndrome critical region protein 5	CERC5	1,20	0,07
Copine-3	CPNE3	1,20	0,05
U5 small nuclear ribonucleoprotein 40 kDa protein	SNRNP40	1,20	0,07
Glutaryl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	GCDH	1,20	0,07
Tubulin-specific chaperone D	TBCD	1,20	0,07
Paired amphipathic helix protein SIN3A	SIN3A	1,20	0,07
Transcription activator BRG1	SMARCA4	1,20	0,13
Caspase-10	CASP10	1,20	0,02
Rho guanine nucleotide exchange factor 2	ARHGEF2	1,20	0,04
Monofunctional C1-tetrahydrofolate synthase, mitochondrial	MTHFD1L	1,20	0,01
Ras-related protein Rab-14	RAB14	1,21	0,09
Nuclear pore complex protein Nup98-Nup96	NUP98	1,21	0,06
Polypyrimidine tract-binding protein 3	PTBP3	1,21	0,06
Cytoplasmic dynein 1 light intermediate chain 1	DYNC1LI1	1,21	0,02
Small nuclear ribonucleoprotein Sm D1	SNRPD1	1,21	0,02
U6 snRNA-associated Sm-like protein LS m3	LSM3	1,21	0,05
Vasodilator-stimulated phosphoprotein	VASP	1,21	0,09
Nuclear pore complex protein Nup107	NUP107	1,21	0,09
Probable 28S rRNA (cytidine(4447)-C(5))-methyltransferase	NOP2	1,21	0,07
Cyclin-dependent kinase 13	CDK13	1,21	0,14
mRNA turnover protein LSPN	MRTO4	1,21	0,06
Thymidylate kinase	DTYMK	1,21	0,07
Glutamine-fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing] 1	GFP1	1,21	0,05
26S protease regulatory subunit 6B	PSMC4	1,21	0,06
Dihydropteridine reductase	QDPR	1,21	0,05

CCR4-NOT transcription complex subunit 7	CNOT7	1,21	0,08
ATP-dependent RNA helicase DDX3X	DDX3X	1,21	0,07
Integrator complex subunit 9	INTS9	1,21	0,04
Neurolysin, mitochondrial	NLN	1,21	0,11
Apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial	AIFM1	1,22	0,13
Activating signal cointegrator 1 complex subunit 3	ASCC3	1,22	0,02
UBX domain-containing protein 4	UBXN4	1,22	0,11
Uncharacterized protein C1orf50	C1orf50	1,22	0,08
Erythroid transcription factor	GATA1	1,22	0,03
Splicing factor 3B subunit 3	SF3B3	1,22	0,08
DNA mismatch repair protein Msh2	MSH2	1,22	0,10
Pyridoxal kinase	PDKK	1,22	0,05
General transcription factor 3C polypeptide 2	GTF3C2	1,22	0,13
RNA exonuclease 4	REXO4	1,22	0,04
Polycomb protein SUZ12	SUZ12	1,22	0,07
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 3	PSMD3	1,22	0,06
Succinyl-CoA ligase [ADP/GDP-forming] subunit alpha, mitochondrial	SUCLG1	1,22	0,07
Activating signal cointegrator 1	TRIP4	1,22	0,11
Basigin	BSG	1,22	0,12
DNA-directed RNA polymerase III subunit RPC4	POLR3D	1,22	0,08
Glutaminase kidney isozyme, mitochondrial	GLS	1,22	0,05
Protein arginine N-methyltransferase 3	PRMT3	1,22	0,03
Tetratricopeptide repeat protein 4	TTC4	1,22	0,11
Glutamate-rich protein 1	ERIC1H1	1,22	0,00
Micromal glutathione S-transferase 3	MGST3	1,22	0,08
Syntaxin-binding protein 3	STXBP3	1,22	0,07
Ras-related protein Rab-2A	RAB2A	1,22	0,12
Alpha-globin transcription factor CP2	TFCP2	1,22	0,09
MAGUK p55 subfamily member 6	MPP6	1,23	0,11
Nucleolar protein 16	NOP16	1,23	0,09
Nuclear factor NF-kappa-B p105 subunit	NFKB1	1,23	0,05
Kynurene--oxoglutarate transaminase 3	CCBL2	1,23	0,05
TBC1 domain family member 15	TBC1D15	1,23	0,06
Myo-in-9	MYH9	1,23	0,10
F-box only protein 30	FBXO30	1,23	0,11
Poly(A)-specific ribonuclease PARN	PARN	1,23	0,13
Glutamate-cysteine ligase regulatory subunit	GCLM	1,23	0,02
Tumor susceptibility gene 101 protein	TSG101	1,23	0,10
Protein timeless homolog	TIMELESS	1,23	0,03
ATP-binding cassette sub-family B member 6, mitochondrial	ABC B6	1,23	0,02
Ras-related protein Rab-18	RAB18	1,23	0,05
RNA-binding protein Raly	RALY	1,23	0,11
AMP deaminase 2	AMPD2	1,23	0,09
Cytochrome c oxidase subunit 6B1	COX6B1	1,23	0,07
Leucine-rich repeat-containing protein 57	LRRK57	1,24	0,01
HAUS augmin-like complex subunit 4	HAUS4	1,24	0,05
Nucleoporin Nup37	NUP37	1,24	0,05
Leucine-rich repeat-containing protein 47	LRRK47	1,24	0,04
U5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa helicase	SNRNP200	1,24	0,08
RNA-binding protein 12B	RBM12B	1,24	0,07
Small subunit processome component 20 homolog	UTP20	1,24	0,12
Replication protein A 70 kDa DNA-binding subunit	RPA1	1,24	0,10
H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 4	DKC1	1,24	0,05
Prolactin regulatory element-binding protein	PREB	1,24	0,16
Myo-in-10	MYH10	1,24	0,10
N-terminal Xaa-Pro-Lys N-methyltransferase 1	NTMT1	1,24	0,11
UPF0600 protein C5orf51	C5orf51	1,24	0,04
Transmembrane 9 superfamily member 2	TM9SF2	1,24	0,06
REST corepressor 1	RCOR1	1,24	0,14
U6 snRNA-associated Sm-like protein LS m8	LSM8	1,24	0,07
Arginine and glutamate-rich protein 1	ARGLU1	1,24	0,18
Dual specificity protein phosphatase 9	DUSP9	1,24	0,13
Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	UQCRC1	1,25	0,08
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex assembly factor 3	NDUFAF3	1,25	0,13
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit M	EIF3M	1,25	0,13
Arf-GAP with coiled-coil, ANK repeat and PH domain-containing protein 2	ACAP2	1,25	0,12
Signal transducer and activator of transcription 5A	STAT5A	1,25	0,06
Mevalonate kinase	MVK	1,25	0,19
Bromodomain-containing protein 4	BRD4	1,25	0,12
Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 1	ACOX1	1,25	0,11

RNA-binding protein 26	RBM26	1,25	0,00
26S protease regulatory subunit 10B	PSMC6	1,25	0,07
HBS 1-like protein	HBS1L	1,25	0,08
Ras-related protein Rab-23	RAB23	1,25	0,08
NADH-cytochrome b5 reductase 1	CYB5R1	1,25	0,08
Histone-lysine N-methyltransferase EZH2	EZH2	1,25	0,09
RNA-binding protein NOB1	NOB1	1,25	0,08
DNA-directed RNA polymerase III subunit RPC2	POLR3B	1,25	0,07
Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial	ACAT1	1,25	0,08
Arf-GAP with Rho-GAP domain, ANK repeat and PH domain-containing protein 1	ARAP1	1,25	0,04
S-epiapterin reductase	SPR	1,25	0,11
Thymidine kinase, cytosolic	TK1	1,25	0,16
THO complex subunit 6 homolog	THOC6	1,25	0,08
Rapamycin-insensitive companion of mTOR	RICTOR	1,25	0,14
Destrin	DSTN	1,25	0,06
Cyclin-dependent kinase 11B	CDK11B	1,25	0,07
SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subunit 1	SMARCD1	1,25	0,16
Elongation factor G, mitochondrial	GFM1	1,25	0,14
3-ketoacyl-CoA thiolase, peroxisomal	ACAA1	1,26	0,02
Mitochondrial fission factor	MF1	1,26	0,03
Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1, mitochondrial	COX4I1	1,26	0,14
Nucleolar MIF4G domain-containing protein 1	NOM1	1,26	0,14
Basic leucine zipper and W2 domain-containing protein 1	BZW1	1,26	0,03
Cytochrome c-type heme lyase	HCCS	1,26	0,12
Ras-related protein Rab-6A	RAB6A	1,26	0,10
Splicing factor 3A subunit 2	SF3A2	1,26	0,04
Cirhin	CIRH1A	1,26	0,08
Rac GTPase-activating protein 1	RACGAP1	1,26	0,17
Solute carrier family 12 member 6	SLC12A6	1,26	0,08
Protein kinase C iota type	PRKCI	1,26	0,06
28S ribosomal protein S18b, mitochondrial	MRPS18B	1,26	0,06
Serine/threonine-protein phosphatase 6 regulatory ankyrin repeat subunit A	ANKRD28	1,26	0,03
39S ribosomal protein L50, mitochondrial	MRPL50	1,26	0,12
Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2	TGM2	1,26	0,16
Nuclear pore complex protein Nup93	NUP93	1,26	0,09
60S ribosomal protein L30	RPL30	1,26	0,07
Catenin delta-1	CTNND1	1,27	0,05
Signal recognition particle receptor subunit alpha	SRP19	1,27	0,08
Adenine phosphoribosyltransferase	APRT	1,27	0,06
60S ribosomal protein L11	RPL11	1,27	0,05
PHD finger-like domain-containing protein 5A	PHF5A	1,27	0,15
Leukocyte surface antigen CD47	CD47	1,27	0,04
Integrin-linked kinase-associated serine/threonine phosphatase 2C	ILKAP	1,27	0,03
Metastasis-associated protein MT1A	MTA1	1,27	0,12
Coronin-2A	CORO2A	1,27	0,17
ATP-dependent RNA helicase DDX24	DDX24	1,27	0,03
Ras GTPase-activating-like protein IQGAP2	IQGAP2	1,27	0,12
Optic atrophy 3 protein	OPA3	1,27	0,11
V-type proton ATPase 116 kDa subunit a isoform 1	ATP6VOA1	1,27	0,11
UDP-glucose:glycoprotein glucyltransferase 1	UGGT1	1,27	0,07
Catalase	CAT	1,27	0,13
Probable lysosomal cobalamin transporter	LMBRD1	1,27	0,03
60S ribosomal protein L18	RPL18	1,27	0,05
MKI67 FHA domain-interacting nucleolar phosphoprotein	NIFK	1,28	0,20
39S ribosomal protein L23, mitochondrial	MRPL23	1,28	0,02
Pyrroline-5-carboxylate reductase 2	PYCR2	1,28	0,13
RNA-binding protein 39	RBM39	1,28	0,14
Cyclin-dependent-like kinase 5	CDK5	1,28	0,09
Pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase PRP16	DHX38	1,28	0,12
Protein asunder homolog	ASUN	1,28	0,11
Transformer-2 protein homolog alpha	TRA2A	1,28	0,06
Signal recognition particle subunit SRP72	SRP72	1,28	0,12
Transferrin receptor protein 1	TFRC	1,28	0,01
AT-rich interactive domain-containing protein 2	ARID2	1,28	0,15
Glycogen phosphorylase, brain form	PYGB	1,28	0,07
Vesicle-associated membrane protein 8	VAMP8	1,28	0,12
Protein S AAL1	SAA1	1,28	0,05
Adenylate kinase 2, mitochondrial	AK2	1,28	0,07
Rab3 GTPase-activating protein non-catalytic subunit	RAB3GAP2	1,28	0,06
Nucleoporin p54	NUP54	1,28	0,11

RNA demethylase ALKBH5	ALKBH5	1,29	0,07
Serine/threonine-protein kinase TAO3	TAOK3	1,29	0,07
E3 ubiquitin-protein ligase UBR5	UBR5	1,29	0,03
Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	ACADVL	1,29	0,09
Protein MON2 homolog	MON2	1,29	0,05
Coiled-coil domain-containing protein 58	CCDC58	1,29	0,12
Ribosome biogenesis protein BOP1	BOP1	1,29	0,10
ATP-dependent 6-phosphofructokinase, platelet type	PFKP	1,29	0,10
28S ribosomal protein S31, mitochondrial	MRPS31	1,29	0,10
Minor histocompatibility antigen H13	HMI3	1,29	0,05
Acetyl-CoA carboxylase 1	ACACA	1,29	0,08
NCK-interacting protein with SH3 domain	NCKIPSD	1,29	0,12
MORC family CW-type zinc finger protein 3	MORC3	1,29	0,17
Nucleolar protein 6	NOL6	1,29	0,06
39S ribosomal protein L12, mitochondrial	MRPL12	1,29	0,01
Glycerol-3-phosphate acyltransferase 3	AGPAT9	1,29	0,09
Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM44	TIMM44	1,29	0,05
Transformation/transcription domain-associated protein	TRRAP	1,29	0,07
Tyrosine-protein kinase Lyn	LYN	1,29	0,13
GTPase NRas	NRAS	1,29	0,08
Mitochondrial dicarboxylate carrier	SLC25A10	1,29	0,10
Nucleoporin NUP188 homolog	NUP188	1,29	0,13
Eukaryotic translation initiation factor 2D	EIF2D	1,30	0,17
WD repeat-containing protein 3	WDR3	1,30	0,13
UDP-glucose 4-epimerase	GALE	1,30	0,14
ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit clpX-like, mitochondrial	CLPX	1,30	0,10
Symplekin	SYMPK	1,30	0,07
ATP-dependent RNA helicase DDX39A	DDX39A	1,30	0,14
Serine/arginine repetitive matrix protein 2	SRRM2	1,30	0,18
2'-deoxyribonucleotide 5'-phosphate N-hydrolase 1	DNPH1	1,30	0,05
Alanine-tRNA ligase, mitochondrial	AARS2	1,30	0,12
Stress-70 protein, mitochondrial	HSPA9	1,30	0,04
Mitochondrial import receptor subunit TOM22 homolog	TOMM22	1,30	0,15
6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 3	PFKFB3	1,30	0,12
Zinc finger C3H1 domain-containing protein	ZFC3H1	1,30	0,06
B-cell receptor-associated protein 31	BCAP31	1,30	0,21
A-kinase anchor protein 8-like	AKAP8L	1,30	0,08
Protein AATF	AATF	1,30	0,09
Nucleoporin p58/p45	NUP111	1,30	0,10
Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim8B	TIMM8B	1,30	0,12
Deoxynucleotidyltransferase terminal-interacting protein 2	DNTTIP2	1,30	0,22
FAST kinase domain-containing protein 3	FASTKD3	1,30	0,06
Protein FAM136A	FAM136A	1,30	0,12
Aspartate aminotransferase, mitochondrial	GOT2	1,31	0,06
E3 ubiquitin-protein ligase BRE1A	RNF20	1,31	0,06
Echinoderm microtubule-associated protein-like 4	EML4	1,31	0,18
Threonine synthase-like 1	THNSL1	1,31	0,20
Protein SMG9	SMG9	1,31	0,11
FACT complex subunit SPT16	SUPT16H	1,31	0,12
Nucleolar RNA helicase 2	DDX21	1,31	0,07
Squamous cell carcinoma antigen recognized by T-cells 3	SART3	1,31	0,09
TMEM1-like protein	TMEM1L	1,31	0,18
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX20	DDX20	1,31	0,08
ADP-ribosylation factor 4	ARF4	1,31	0,05
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 5, mitochondrial	NDUFB5	1,31	0,05
39S ribosomal protein L16, mitochondrial	MRPL16	1,31	0,16
Protein FAM118B	FAM118B	1,31	0,04
Cullin-1	CUL1	1,31	0,15
Integrator complex subunit 4	INTS4	1,31	0,08
Notchless protein homolog 1	NLE1	1,32	0,01
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX52	DDX52	1,32	0,12
DNA mismatch repair protein Msh3	MSH3	1,32	0,08
FAS-associated factor 2	FAF2	1,32	0,15
Nipped-B-like protein	NIPBL	1,32	0,09
DNA replication licensing factor MC M7	MCM7	1,32	0,04
Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM14	DNAJC19	1,32	0,19
Endoplasm	HS90B1	1,32	0,05
Surf and G-patch domain-containing protein 2	SURGP2	1,32	0,16
Histone deacetylase complex subunit SAP18	SAP18	1,32	0,10
Rho-related GTP-binding protein RhoG	RHOG	1,32	0,07

S uppressor of SWI4 1 homolog	P PAN	1,32	0,07
S yntaxin-6	STX6	1,32	0,15
Nck-associated protein 1	NC KAP1	1,32	0,07
Intron-binding protein aquarius	AQR	1,32	0,15
R alBP 1-associated E ps domain-containing protein 1	R EPS1	1,32	0,07
S erine/arginine-rich s plicing factor 7	S RSF7	1,32	0,14
Ubiquitin thioesterase OTU1	YOD1	1,32	0,06
R ibosomal RNA processing protein 1 homolog A	RRP1	1,32	0,12
P rotein CBFA2T3	CBFA2T3	1,32	0,14
S terol-4-alpha-carboxylate 3-dehydrogenase, decarboxylating	NS DHL	1,32	0,12
P re-mRNA-processing factor 40 homolog A	PRPF40A	1,32	0,13
C alcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit gamma	C AMK2G	1,32	0,08
ADP-ribosylation factor-like protein 8B	AR L8B	1,32	0,14
W ASH complex subunit 7	KIAA1033	1,32	0,15
R egulator of microtubule dynamics protein 1	R MDN1	1,33	0,10
D NA repair protein RAD50	RAD50	1,33	0,11
S WI/S NF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subunit	S MARC45	1,33	0,21
A TP synthase subunit epsilon, mitochondrial	ATP5E	1,33	0,12
28S ribosomal protein S35, mitochondrial	MRPS35	1,33	0,11
WD repeat-containing protein 74	WDR74	1,33	0,11
S tromal cell-derived factor 2-like protein 1	SDF2L1	1,33	0,18
P hosphatidylinositol 4-kinase alpha	PI4KA	1,33	0,10
M idas in	MDN1	1,33	0,15
5'-3' exoribonuclease 2	XRN2	1,33	0,10
M ediator of RNA polymerase II transcription subunit 17	MED17	1,33	0,05
N ADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial	NDUF51	1,33	0,13
ADP-ribosylation factor-like protein 1	ARL1	1,33	0,09
V acuolar protein sorting-associated protein 53 homolog	VPS53	1,33	0,18
E rlin-1	ERLIN1	1,33	0,05
R an-binding protein 9	RANBP9	1,33	0,04
E lectron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial	ETFA	1,34	0,11
A tlasin-3	ATL3	1,34	0,01
L a-related protein 4B	LARP4B	1,34	0,11
H AUS augmin-like complex subunit 5	HAUS5	1,34	0,20
S RA stem-loop-interacting RNA-binding protein, mitochondrial	S LIRP	1,34	0,07
E RO1-like protein alpha	ERO1A	1,34	0,13
Aconitase hydratase, mitochondrial	ACO2	1,34	0,09
G TP-binding protein 1	GTPBP1	1,34	0,12
S erine/threonine-protein kinase mTOR	MTOR	1,34	0,08
T SC 22 domain family protein 2	TSC22D2	1,34	0,07
pre-rRNA processing protein FTSJ3	FTSJ3	1,34	0,14
V-type proton ATPase subunit d 1	ATP6V0D1	1,34	0,02
R as-related protein Rab-1A	RAB1A	1,34	0,05
F ermitin family homolog 3	FERMFT3	1,34	0,04
C ytochrome b-c1 complex subunit 6, mitochondrial	UQCRCR	1,34	0,08
T orsin-1A-interacting protein 1	TOR1AIP1	1,34	0,09
I mportin subunit alpha-4	KPNAA3	1,34	0,06
M itochondrial import inner membrane translocase subunit TIM50	TIMM50	1,34	0,15
I nterferon regulatory factor 2-binding protein 1	IRFBP1	1,34	0,10
U nhealthy ribome biogenesis protein 2 homolog	URB2	1,34	0,19
P rotein lunapark	LNP	1,34	0,24
Eukaryotic initiation factor 4A-III	EIF4A3	1,34	0,14
P eptidyl-tRNA hydrolase ICT1, mitochondrial	ICT1	1,34	0,17
G lutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	GLUD1	1,34	0,10
S erine-tRNA ligase, mitochondrial	SARS2	1,35	0,12
P achytene checkpoint protein 2 homolog	TRIP13	1,35	0,11
P rotein TBR G4	TBRG4	1,35	0,12
E xcystis complex component 1	EXOC1	1,35	0,18
H exokinase-1	HK1	1,35	0,11
S mad nuclear-interacting protein 1	SNIP1	1,35	0,05
C-terminal-binding protein 1	CTBP1	1,35	0,11
S permatogenesis-associated protein 5	SPATA5	1,35	0,10
R as-related protein Rab-5A	RAB5A	1,35	0,08
A DP/ATP translocase 3	SLC25A6	1,35	0,06
P olynucleotide 5'-hydroxyl-kinase NOL9	NOL9	1,35	0,12
R as-related protein Rab-35	RAB35	1,35	0,12
C ytosolic Fe-S cluster assembly factor NUBP2	NUBP2	1,35	0,08
A cetyl-coenzyme A synthetase, cytoplasmic	ACSS2	1,35	0,04
E xome complex component RRP4	EXOSC2	1,35	0,12
I nitol hexakisphosphate and diphosphoinositol-pentakisphosphate kinase 2	PPIP5K2	1,35	0,04

Putative pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase DHX16	DHX16	1,35	0,11
Testis-expressed sequence 10 protein	TEX10	1,35	0,16
Interferon-induced, double-stranded RNA-activated protein kinase	EIF2AK2	1,35	0,09
AFG3-like protein 2	AFG3L2	1,35	0,11
ATPase family AAA domain-containing protein 3B	ATAD3B	1,35	0,09
Peroxisomal membrane protein PEX14	X14	1,35	0,06
Replication factor C subunit 5	RFC5	1,35	0,03
Pentatricopeptide repeat-containing protein 1, mitochondrial	PTCD1	1,36	0,09
Ras-related protein Rap-2b	RAP2B	1,36	0,10
Negative elongation factor C/D	NELFCD	1,36	0,15
Lysophosphatidylcholine acyltransferase 1	LPCAT1	1,36	0,08
NudC domain-containing protein 1	NUCDC1	1,36	0,11
Inner centromere protein	INCENP	1,36	0,16
39S ribosomal protein L17, mitochondrial	MRPL17	1,36	0,10
LIM and Selenocysteine cell antigen-like-containing domain protein 1	LIMS1	1,36	0,04
ATP synthase subunit delta, mitochondrial	ATPSD	1,36	0,10
ATPase family AAA domain-containing protein 3A	ATAD3A	1,36	0,21
Solute carrier family 12 member 2	SLC12A2	1,36	0,08
Ribophosphate pyrophosphokinase 2	PRPS2	1,36	0,22
Calcineurin B homologous protein 1	CHP1	1,36	0,10
Cytochrome c oxidase protein 20 homolog	COX20	1,36	0,13
Signal peptidase complex subunit 1	SPCS1	1,36	0,14
DNA replication licensing factor MCM4	MCM4	1,36	0,08
Caspase kinase II subunit alpha'	CSNK2A2	1,37	0,04
Serine palmitoyltransferase 1	SPTLC1	1,37	0,05
ADP-dependent glucokinase	ADPGK	1,37	0,11
39S ribosomal protein L4, mitochondrial	MRPL4	1,37	0,23
Caspase kinase II subunit beta	CSNK2B	1,37	0,06
Methionine-tRNA ligase, cytoplasmic	MARS	1,37	0,09
Dipeptidyl peptidase 2	DPP7	1,37	0,27
Cysteine protease ATG4B	ATG4B	1,37	0,13
Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 10	MED10	1,37	0,02
General transcription factor II-I	GTF2I	1,37	0,08
Ribosomal protein S6 kinase alpha-3	RPS6KA3	1,37	0,15
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	HNRNP	1,37	0,13
Sin3 histone deacetylase corepressor complex component SDS3	SUDS3	1,37	0,16
Cofilin	COL1	1,37	0,18
Triokinase/FMN cyclase	TKFC	1,37	0,15
Putative peptidyl-tRNA hydrolase PTRHD1	PTRHD1	1,37	0,15
Protein ELYS	AHCTF1	1,37	0,01
DNA-directed RNA polymerase III subunit RPC1	POLR3A	1,37	0,16
Flotillin-2	FLOT2	1,37	0,04
3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2	HSD17B10	1,37	0,12
Cell division cycle protein 16 homolog	CDC16	1,37	0,07
Vesicle-associated membrane protein-associated protein B/C	VAPB	1,37	0,08
Fragile X mental retardation syndrome-related protein 1	FXR1	1,37	0,11
60S ribosomal protein L7-like 1	RPL7L1	1,37	0,11
HEAT repeat-containing protein 3	HEATR3	1,37	0,14
CCAAT/enhancer-binding protein zeta	CEBPZ	1,38	0,10
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 48	USP48	1,38	0,13
Hydroxysteroid dehydrogenase-like protein 2	HSDL2	1,38	0,17
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX27	DDX27	1,38	0,19
28S ribosomal protein S30, mitochondrial	MRPS30	1,38	0,14
Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	ALDH2	1,38	0,05
Metaxin-1	MTX1	1,38	0,12
Centrin-2	CETN2	1,38	0,14
Replication factor C subunit 2	RFC2	1,38	0,13
Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 3	CPSF3	1,38	0,17
DDB1- and CUL4-associated factor 7	DCAF7	1,38	0,14
RuvB-like 1	RUVBL1	1,38	0,11
Pyroline-5-carboxylate reductase 1, mitochondrial	PYCR1	1,38	0,12
Myo light chain 4	MLYL4	1,38	0,04
Carbonyl reductase family member 4	CBR4	1,38	0,12
Structural maintenance of chromosomes flexible hinge domain-containing protein 1	SMCHD1	1,38	0,23
Tyrine-protein kinase Tec	TEC	1,38	0,18
ADP-ribosylation factor-like protein 2	ARL2	1,38	0,13
DnaJ homolog subfamily C member 3	DNAJC3	1,38	0,12
Transmembrane protein 214	TMEM214	1,38	0,12
rRNA methyltransferase 1, mitochondrial	MRM1	1,38	0,06
U3 small nucleolar ribonucleoprotein protein IMP3	IMP3	1,38	0,15

Regulator of microtubule dynamics protein 3	RMDN3	1,38	0,12
Putative helicase MOV-10	MOV10	1,38	0,10
Iron-responsive element-binding protein 2	IREB2	1,39	0,07
Transforming protein RhoA	RHOA	1,39	0,07
28S ribosomal protein S17, mitochondrial	MRPS17	1,39	0,03
Cytochrome b-c1 complex subunit 9	UQCRC10	1,39	0,13
Aspartyl aminopeptidase	DNP	1,39	0,17
Tubulin beta-3 chain	TUBB3	1,39	0,06
Mitochondrial chaperone BCS1	BCS1L	1,39	0,14
DNA dC->dU-editing enzyme APOBEC-3C	APOBEC3C	1,39	0,07
Myb-binding protein 1A	MYBBP1A	1,39	0,11
Mitochondrial fission process protein 1	MTFP1	1,39	0,27
Glutathione S-transferase theta-1	GSTT1	1,39	0,05
Nucleoplasmmin-3	NPMB	1,39	0,03
Calcium homeostasis endoplasmic reticulum protein	CHERP	1,39	0,17
Transducin beta-like protein 2	TBL2	1,39	0,19
RNA-binding protein 28	RBMB28	1,39	0,09
Sorting nexin-9	SNX9	1,39	0,18
Hexokinase-2	HK2	1,39	0,16
Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A beta isoform	PPP2R1B	1,39	0,21
Neutral alpha-glucidase AB	GANAB	1,40	0,13
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase G	PPIG	1,40	0,21
Pre-lamin-A/C	LMNA	1,40	0,25
Citrate synthase, mitochondrial	CS	1,40	0,10
Polycomb protein EED	EED	1,40	0,25
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBPs	FKBP5	1,40	0,08
Glucose-induced degradation protein 8 homolog	GID8	1,40	0,12
Telomere-associated protein Rif1	RIF1	1,40	0,11
Heat shock 70 kDa protein 14	HSPA14	1,40	0,12
RNA 3'-terminal phosphate cyclase-like protein	RCL1	1,40	0,11
Transcription intermediary factor 1-beta	TRIM28	1,40	0,17
Golgin subfamily A member 3	GOLGA3	1,40	0,08
Enoyl-CoA delta isomerase 2, mitochondrial	ECI2	1,40	0,14
NF-kappa-B-repressing factor	NKRF	1,40	0,16
Carnitine O-palmitoyltransferase 2, mitochondrial	CPT2	1,40	0,07
Nucleolar transcription factor 1	UBTF	1,40	0,15
Cytochrome c oxidase subunit 6C	COX6C	1,41	0,10
Serine/threonine-protein phosphatase 4 catalytic subunit	PPP4C	1,41	0,14
L-xylene reductase	DCXR	1,41	0,24
Conserved oligomeric Golgi complex subunit 7	COG7	1,41	0,07
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex assembly factor 4	NDUFAF4	1,41	0,02
E3 ubiquitin-protein ligase TRIM3	TRIM3	1,41	0,05
3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase, mitochondrial	HIBADH	1,41	0,09
Pre-mRNA-splicing factor 38A	PRPF38A	1,41	0,25
G2/mitotic-specific cyclin-B2	CCNB2	1,41	0,11
Lysosome-associated membrane glycoprotein 2	LAMP2	1,41	0,03
Mitochondrial Rho GTPase 1	RHOT1	1,41	0,14
39S ribosomal protein L11, mitochondrial	MRPL11	1,41	0,11
3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase, mitochondrial	HIBCH	1,41	0,11
Sodium-dependent multivitamin transporter	SLC5A6	1,41	0,16
Polymerase I and transcript release factor	PTRF	1,41	0,06
ATP-dependent RNA helicase DDX50	DDX50	1,42	0,16
Elongation factor Tu, mitochondrial	TUFM	1,42	0,03
Threonylcarbamoyladenine tRNA methylthiotransferase	CDKL1	1,42	0,15
DNA topoisomerase 2-alpha	TOP2A	1,42	0,20
Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex	DLST	1,42	0,05
39S ribosomal protein L47, mitochondrial	MRPL47	1,42	0,20
Mannosidase II	MOGS	1,42	0,08
Structural maintenance of chromosomes protein 6	SMC6	1,42	0,13
Protein FAM98B	FAM98B	1,42	0,24
Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1	PLOD1	1,42	0,16
Leucine-rich repeat and calponin homology domain-containing protein 4	LRC4H	1,42	0,11
Ubiquitin/S-G 15-conjugating enzyme E2 L6	UBE2L6	1,42	0,14
BET1 homolog	BET1	1,42	0,10
Protein RRP5 homolog	PDCD11	1,42	0,04
Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial	DLD	1,42	0,10
Cytolic 5'-nucleotidase 3A	NT5C3A	1,42	0,13
3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial	ACAA2	1,42	0,07
Mitochondrial-processing peptidase subunit beta	MPMCB	1,42	0,09
ER membrane protein complex subunit 1	EMC1	1,42	0,08

Mimitin, mitochondrial	NDUFAF2	1,42	0,08
28S ribosomal protein S 14, mitochondrial	MRPS14	1,43	0,09
Mitochondrial intermembrane space import and assembly protein 40	CHCHD4	1,43	0,10
Kinesin-like protein KIF23	KIF23	1,43	0,11
Cohesin subunit SA-1	STAG1	1,43	0,22
Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 1	PTPN1	1,43	0,16
Pyruvate dehydrogenase protein X component, mitochondrial	PDHX	1,43	0,08
Diphosphomevalonate decarboxylase	MVD	1,43	0,06
WD repeat-containing protein 48	WDR48	1,43	0,19
RNA-binding protein PNO1	PNO1	1,43	0,21
Mitochondrial Rho GTPase 2	RHOT2	1,43	0,11
Polymerase delta-interacting protein 2	POLDIP2	1,43	0,06
Mitofusin-1	MFN1	1,43	0,18
Thioredoxin reductase 2, mitochondrial	TXNRD2	1,43	0,11
DNA-directed RNA polymerase I subunit RPA43	TWIS TNB	1,43	0,02
Kinase D-interacting substrate of 220 kDa	KIDINS220	1,43	0,10
Diacylglycerol kinase zeta	DGKZ	1,44	0,13
Peroxisomal membrane protein PMP34	SLC25A17	1,44	0,10
WD repeat-containing protein 44	WDR44	1,44	0,24
ATP-dependent RNA helicase DDX55	DDX55	1,44	0,09
Guanine nucleotide-binding protein-like 3	GNL3	1,44	0,08
Integrin beta-1	ITGB1	1,44	0,22
FAD-dependent oxidoreductase domain-containing protein 1	FOXRED1	1,44	0,26
Phosphatidyl cytidylyltransferase, mitochondrial	TAMM41	1,44	0,12
Pre-mRNA-processing-splicing factor 8	PRPF8	1,44	0,12
DnaJ homolog subfamily B member 11	DNAJ B11	1,44	0,09
NAD-dependent malic enzyme, mitochondrial	ME2	1,44	0,07
Sphingolipid delta(4)-desaturase DES1	DEGS1	1,44	0,24
tRNA pseudouridine synthase A, mitochondrial	PUS1	1,44	0,25
Acyl-coenzyme A thioesterase 13	ACOT13	1,44	0,09
Nucleoporin NUP53	NUP35	1,44	0,32
ADP/ATP translocase 1	SLC25A4	1,44	0,19
Death-inducer obliterator 1	DIDO1	1,45	0,03
Ribosomal protein S6 kinase alpha-2	RPS6KA2	1,45	0,17
Serine/threonine-protein kinase tousled-like 1	TLK1	1,45	0,12
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 2	HNRNPUL2	1,45	0,11
Protein BUD31 homolog	BUD31	1,45	0,25
Mediator of DNA damage checkpoint protein 1	MDC1	1,45	0,06
Ras-related protein Ral-B	RALB	1,45	0,06
Microtubule-associated protein 1S	MAP1S	1,45	0,05
D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	PHGDH	1,45	0,10
Double-stranded RNA-specific adenine deaminase	ADAR	1,45	0,16
Pumilio domain-containing protein KIAA0020	KIAA0020	1,45	0,05
MIC complex subunit MIC27	APOOL	1,45	0,11
THO complex subunit 1	THOC1	1,45	0,17
Uridine-cytidine kinase 2	UCK2	1,45	0,09
Syntenin-1	SDCBP	1,45	0,20
Presequence protease, mitochondrial	PITRM1	1,45	0,14
Serpin B9	SERPINB9	1,45	0,14
Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial	UQCRCFS1	1,45	0,20
DDB1- and CUL4-associated factor 13	DCAF13	1,46	0,20
Protein KRII homolog	KRII1	1,46	0,19
Transcription intermediary factor 1-alpha	TRIM24	1,46	0,23
Poly [ADP-ribose] polymerase 1	PARP1	1,46	0,19
Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondrial	IDH3A	1,46	0,12
Zinc finger CCH domain-containing protein 11A	ZC3H11A	1,46	0,12
Kinetochore protein SPC25	SPC25	1,46	0,06
G patch domain-containing protein 2	GPATCH2	1,46	0,16
FAD synthase	FLAD1	1,46	0,22
Negative elongation factor A	NELFA	1,46	0,16
Bifunctional coenzyme A synthase	COASY	1,46	0,14
Sister chromatid cohesion protein PDS5 homolog A	PDS5A	1,46	0,13
Pentatricopeptide repeat domain-containing protein 3, mitochondrial	PTCD3	1,46	0,10
N-acetyltransferase 10	NAT10	1,46	0,10
Centromere protein Q	CENPQ	1,46	0,19
Flotillin-1	FLOT1	1,46	0,15
Acyl-coenzyme A thioesterase 9, mitochondrial	ACOT9	1,46	0,11
60 kDa heat shock protein, mitochondrial	HSPD1	1,46	0,10
DNA mismatch repair protein MsH6	MSH6	1,46	0,18
Ribosome biogenesis protein BRX1 homolog	BRX1	1,46	0,07

Cytochrome c oxidase assembly factor 7	COA7	1,46	0,18
Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit beta, mitochondrial	S UCL A2	1,46	0,20
Lysine-specific demethylase 3B	KDM B B	1,46	0,21
Ribonucleoprotein PTB-binding 1	R AVER 1	1,47	0,12
Methyltransferase-like protein 17, mitochondrial	M E TTL 17	1,47	0,14
RNA polymerase II subunit A C-terminal domain phosphatase	C TDP 1	1,47	0,12
Vacuolar protein sorting-associated protein 45	VPS 45	1,47	0,02
Metaxin-2	MTX 2	1,47	0,22
Serine/threonine-protein phosphatase PGAM5, mitochondrial	P GAM5	1,47	0,16
Multiple myeloma tumor-associated protein 2	MMTAG 2	1,47	0,08
Protein phosphatase 1F	PPM1F	1,47	0,22
O-acetyl-ADP-ribose deacetylase MARCHD1	MAC ROD 1	1,47	0,17
Translation initiation factor IF-2, mitochondrial	MTIF2	1,47	0,21
WD repeat-containing protein 75	WDR 75	1,47	0,14
NADPH:adrenodoxin oxidoreductase, mitochondrial	F DXR	1,47	0,17
GrpE protein homolog 1, mitochondrial	GRL1	1,47	0,26
39S ribosomal protein L49, mitochondrial	M RPL 49	1,47	0,13
Origin recognition complex subunit 3	O RC 3	1,47	0,09
DnaJ homolog subfamily A member 3, mitochondrial	DNAJA3	1,48	0,22
ATP-dependent 6-phosphofructokinase, liver type	P FK L	1,48	0,18
ADP/ATP translocase 2	SLC 25A5	1,48	0,26
HEAT repeat-containing protein 1	HEATR 1	1,48	0,05
NAD(P) transhydrogenase, mitochondrial	NNT	1,48	0,10
Isocitrate dehydrogenase domain-containing protein 2	I SOC 2	1,48	0,09
Nucleolar protein 58	NOP58	1,48	0,19
Microprocessor complex subunit DGC R8	DGC R8	1,48	0,18
DNA-directed RNA polymerases I, II, and III subunit RPABC3	POLR2H	1,48	0,03
Membrane-associated progesterone receptor component 2	PGR MC 2	1,48	0,22
Transmembrane protein 33	TME MB3	1,48	0,21
Telomere length regulation protein TEL2 homolog	TELO2	1,48	0,07
Nucleolar protein 8	NOL8	1,48	0,08
Calnexin	CANX	1,48	0,26
GrpE protein homolog 2, mitochondrial	GRL2	1,48	0,30
Malate dehydrogenase, mitochondrial	M DH2	1,48	0,13
FACT complex subunit SSRP1	S S R P 1	1,48	0,05
WD repeat-containing protein 46	WDR46	1,48	0,15
Probable asparagine--tRNA ligase, mitochondrial	NARS 2	1,49	0,12
39S ribosomal protein L1, mitochondrial	M RPL 1	1,49	0,15
Cysteine desulfurase, mitochondrial	NFS 1	1,49	0,03
Aurora kinase B	AUR KB	1,49	0,21
39S ribosomal protein L9, mitochondrial	M RPL 9	1,49	0,06
3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase, mitochondrial	O XSM	1,49	0,07
Methylcrotonoyl-CoA carboxylase subunit alpha, mitochondrial	MCC C 1	1,49	0,05
Kinesin-like protein KIF2A	KIF2A	1,49	0,19
Charged multivesicular body protein 4b	C HMP4B	1,49	0,04
RNA-binding protein 12	R BM12	1,49	0,18
Ataxin-3	ATXN3	1,49	0,14
Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit beta, mitochondrial	IDH3B	1,49	0,06
U3 small nucleolar RNA-associated protein 6 homolog	UTP6	1,49	0,11
Exportin-6	XPO6	1,49	0,19
Transcription factor Sp1	SP1	1,49	0,35
Protein regulator of cytokinesis 1	PRC1	1,50	0,25
DNA-dependent protein kinase catalytic subunit	PRKDC	1,50	0,09
Peroxisomal multifunctional enzyme type 2	HS D17B4	1,50	0,09
Centromere protein V	C ENPV	1,50	0,10
Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial	PDHA1	1,50	0,12
Phosphatidate cytidylyltransferase 2	CDS2	1,50	0,10
Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-5	GNG5	1,50	0,15
28S ribosomal protein S5, mitochondrial	M RPS 5	1,50	0,13
Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM16	PAM16	1,50	0,15
WD repeat-containing protein 36	WDR36	1,50	0,11
Alkyldihydroxyacetonephosphate synthase, peroxisomal	AGPS	1,51	0,13
Programmed cell death protein 6	PDCD6	1,51	0,11
rRNA-processing protein UTP23 homolog	UTP23	1,51	0,26
Lanterol 14-alpha demethylase	CYP51A1	1,51	0,32
Oxygen-dependent coproporphyrinogen-III oxidase, mitochondrial	C POX	1,51	0,17
WASH complex subunit strumpellin	KIAA0196	1,51	0,12
RNA-binding protein with serine-rich domain 1	R NPS 1	1,51	0,40
Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 4	C PSF4	1,51	0,02
MIC complex subunit MIC60	IMMT	1,51	0,14

Acyl-coenzyme A thioesterase 8	ACOT8	1,51	0,06
Nodal modulator 2	NOMO2	1,51	0,13
Ribome biogenesis protein BMS 1 homolog	BMS1	1,51	0,10
Putative ATP-dependent RNA helicase DHX30	DHX30	1,51	0,04
Leucine-rich PPR motif-containing protein, mitochondrial	LPRPRC	1,51	0,06
Transmembrane emp24 domain-containing protein 9	TMED9	1,52	0,17
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 7	NDUFA7	1,52	0,17
Mitochondrial inner membrane protein OXA1L	OXA1L	1,52	0,18
Probable ATP-dependent RNA helicase DHX40	DHX40	1,52	0,17
General transcription factor IIE subunit 1	GTF2E1	1,52	0,25
Ras-related protein Rab-21	RAB21	1,52	0,05
THO complex subunit 2	THOC2	1,52	0,17
39S ribosomal protein L35, mitochondrial	MRPL35	1,52	0,28
Transformer-2 protein homolog beta	TRA2B	1,52	0,23
Lanosterol synthase	LSS	1,52	0,11
Thiulfate sulfurtransferase	TST	1,52	0,14
Phosphatidylserine phosphatase SAC 1	SACM1L	1,52	0,13
RNA-binding protein 5	RBM5	1,53	0,13
Kynureninase	KYNU	1,53	0,31
Epoxyde hydrolase 1	EPHX1	1,53	0,06
Exome complex component RRP40	EXOSC3	1,53	0,18
Replication factor C subunit 1	RFC1	1,53	0,18
Cytochrome b5 type B	CYB5B	1,53	0,17
NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 5	MT-ND5	1,53	0,06
Uncharacterized protein C11orf98	C11orf98	1,53	0,24
ER membrane protein complex subunit 3	EMC3	1,53	0,15
28S ribosomal protein S22, mitochondrial	MRPS22	1,53	0,05
39S ribosomal protein L44, mitochondrial	MRPL44	1,53	0,09
Mitochondrial glutamate carrier 1	SLC25A22	1,53	0,14
Periodic tryptophan protein 2 homolog	PWP2	1,54	0,03
Galactokinase	GALK1	1,54	0,25
Intercellular adhesion molecule 1	ICAM1	1,54	0,14
TAR DNA-binding protein 43	TARDBP	1,54	0,15
Keratin, type I cytekeletal 18	KRT18	1,54	0,30
Synembryon-A	RIC8A	1,54	0,15
Synaptogyrin-2	SYNGR2	1,54	0,17
Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial	HADHA	1,54	0,10
Abhydrolase domain-containing protein 16A	ABHD16A	1,54	0,07
ATP synthase subunit s-like protein	ATPSSL	1,54	0,30
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 6	NDUFA6	1,55	0,25
Electron transfer flavoprotein subunit beta	ETFB	1,55	0,18
rRNA 2'-O-methyltransferase fibrillarin	FBL	1,55	0,15
Regulator of microtubule dynamics protein 2	RMDN2	1,55	0,18
Oxysterol-binding protein-related protein 8	OSBPL8	1,55	0,21
Guanine nucleotide-binding protein G(q) subunit alpha	GNAQ	1,55	0,08
Nucleolar GTP-binding protein 2	GNL2	1,55	0,15
Chitinase domain-containing protein 1	CHID1	1,55	0,25
Succinyl-CoA ligase [GDP-forming] subunit beta, mitochondrial	SUCLG2	1,55	0,13
Remodeling and spacing factor 1	RSF1	1,55	0,13
Heterochromatin protein 1-binding protein 3	HPBP3	1,55	0,22
Ribosomal L1 domain-containing protein 1	RSL1D1	1,55	0,19
Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar1	SLC25A12	1,55	0,11
General transcription factor 3C polypeptide 4	GTF3C4	1,55	0,11
Lariat debranching enzyme	DBR1	1,56	0,23
39S ribosomal protein L39, mitochondrial	MRPL39	1,56	0,01
PHD finger protein 14	PHF14	1,56	0,14
ATP synthase subunit gamma, mitochondrial	ATPC51	1,56	0,08
Voltage-dependent anion-selective channel protein 3	VDAC3	1,56	0,11
Pericentriolar material 1 protein	PCM1	1,56	0,14
ATP-dependent RNA helicase DDX18	DDX18	1,56	0,21
Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 5	UBA5	1,56	0,09
DNA topoisomerase 2-beta	TOP2B	1,56	0,42
Gem-associated protein 4	GEMIN4	1,56	0,07
Hydroxymethylglutaryl-CoA lyase, mitochondrial	HMGCL	1,56	0,15
NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 2, mitochondrial	NDUFS2	1,56	0,19
Baculoviral IAP repeat-containing protein 6	BIR6	1,56	0,20
28S ribosomal protein S29, mitochondrial	DAP3	1,56	0,11
Ornithine aminotransferase, mitochondrial	OAT	1,56	0,15
NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 7, mitochondrial	NDUFS7	1,56	0,13
ER membrane protein complex subunit 8	EMC8	1,57	0,13

Anaphase-promoting complex subunit 4	ANAPC4	1,57	0,02
Tubulin-specific chaperone E	TBC1E	1,57	0,22
Serine hydroxymethyltransferase, mitochondrial	S HMT2	1,57	0,04
Xenotropic and polytropic retrovirus receptor 1	XPR1	1,57	0,15
Mitochondrial ribonuclease P protein 1	TRMT10C	1,57	0,15
1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase beta-3	PLCB3	1,57	0,13
Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial	PDHB	1,57	0,13
Periodic tryptophan protein 1 homolog	PWP1	1,57	0,26
Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase, mitochondrial	ECH1	1,57	0,15
Sister chromatid cohesion protein PDS5 homolog B	PDS5B	1,57	0,13
Cytochrome c oxidase subunit 5B, mitochondrial	COX5B	1,57	0,10
Aldehyde dehydrogenase X, mitochondrial	ALDH1B1	1,57	0,02
Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim9	TIMM9	1,57	0,39
Protein fury homolog-like	FRYL	1,57	0,13
Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial	UQCRC2	1,57	0,08
Aladin	AAAS	1,57	0,12
Ras-related protein Rab-5C	RAB5C	1,57	0,21
Signal peptidase complex catalytic subunit SEC11A	SEC11A	1,58	0,34
Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar2	SLC25A13	1,58	0,13
39S ribosomal protein L43, mitochondrial	MRPL43	1,58	0,22
Prohibitin	PHB	1,58	0,15
Translation machinery-associated protein 16	TMA16	1,58	0,11
NADPH-cytochrome P450 reductase	POR	1,58	0,14
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 8	NDUFA8	1,58	0,36
Lipid droplet-associated hydrolase	LDAH	1,58	0,24
Short-branched chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	ACADS B	1,58	0,18
Mitochondrial ribonuclease P protein 3	KIAA0391	1,58	0,15
Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase	ALDH18A1	1,58	0,09
Nucleolar protein 10	NOL10	1,58	0,39
Exportin-7	XPO7	1,59	0,13
28S ribosomal protein S23, mitochondrial	MRPS23	1,59	0,10
Plakophilin-3	PKP3	1,59	0,07
39S ribosomal protein L21, mitochondrial	MRPL21	1,59	0,03
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 9, mitochondrial	NDUFA9	1,59	0,45
Cyclin-dependent kinase 2	CDK2	1,59	0,12
ATP synthase-coupling factor 6, mitochondrial	ATP5J	1,59	0,16
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 5	NDUFA5	1,59	0,12
Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial	SDHA	1,59	0,11
Copine-1	CPNE1	1,59	0,11
Protein FAM210B	FAM210B	1,59	0,06
Deoxycytidylate deaminase	DCTD	1,59	0,17
Cytochrome c oxidase subunit 7A-related protein, mitochondrial	COX7A2L	1,59	0,16
Tuftelin-interacting protein 11	TFIP11	1,59	0,13
CD81 antigen	CD81	1,59	0,07
Synaptonal-associated protein 23	SNAP23	1,60	0,36
Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial	HADH	1,60	0,18
Estradiol 17-beta-dehydrogenase 11	HSD17B11	1,60	0,10
Volume-regulated anion channel subunit LRRK2	LRRK2	1,60	0,21
Inorganic pyrophosphatase 2, mitochondrial	PPA2	1,60	0,12
MIC complex subunit MIC19	CHCHD3	1,60	0,17
Glycine cleavage system H protein, mitochondrial	GCSH	1,60	0,14
39S ribosomal protein L24, mitochondrial	MRPL24	1,60	0,23
Heat shock 70 kDa protein 13	HSPA13	1,60	0,30
Cytokine receptor-like factor 3	CRLF3	1,60	0,18
ATP synthase subunit a	MT-ATP6	1,60	0,20
3-mercaptopyruvate sulfurtransferase	MPS1	1,60	0,15
Coiled-coil domain-containing protein 97	CCDC97	1,60	0,12
39S ribosomal protein L15, mitochondrial	MRPL15	1,60	0,08
Thioredoxin-related transmembrane protein 1	TMX1	1,60	0,24
ATP synthase subunit d, mitochondrial	ATP5H	1,60	0,19
Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial	TRAP1	1,61	0,06
Translocation protein SEC63 homolog	SEC63	1,61	0,31
Nuclear pore complex protein Nup155	NUP155	1,61	0,11
Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial	ECHS1	1,61	0,11
28S ribosomal protein S2, mitochondrial	MRPS2	1,61	0,13
Nuclear pore complex protein Nup85	NUP85	1,61	0,21
Ras-related C3 botulinum toxin substrate 2	RAC2	1,61	0,23
Mitochondrial intermediate peptidase	MIP	1,61	0,19
ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	ATP5A1	1,61	0,04
Ubiquinol-cytochrome-c reductase complex assembly factor 1	UQCRC1	1,61	0,26

Single-stranded DNA-binding protein, mitochondrial	SSBP1	1,61	0,21
U3 small nucleolar RNA-associated protein 15 homolog	UTP15	1,61	0,05
RNA 3'-terminal phosphate cyclase	RTCA	1,62	0,08
Ubiquinol-cytochrome-c reductase complex assembly factor 2	UQCRC2	1,62	0,17
Isoleucine-tRNA ligase, mitochondrial	IARS2	1,62	0,14
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX10	DDX10	1,62	0,17
DNA polymerase epsilon subunit 2	POLE2	1,62	0,26
NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3, mitochondrial	NDUFV3	1,62	0,11
THO complex subunit 7 homolog	THOC7	1,62	0,23
Extended synaptotagmin-1	ESYT1	1,62	0,20
ATP synthase F(0) complex subunit B1, mitochondrial	ATP5F1	1,62	0,13
Mitochondrial-processing peptidase subunit alpha	PPMCA	1,62	0,11
39S ribosomal protein L41, mitochondrial	MRPL41	1,62	0,07
Transducin beta-like protein 3	TBL3	1,62	0,12
Nuclear pore complex protein Nup205	NUP205	1,62	0,17
Probable arginine-tRNA ligase, mitochondrial	RARS2	1,62	0,17
Serine/threonine-protein kinase VRK1	VRK1	1,63	0,21
Trypsin-1	PRSS1	1,63	0,07
Signal recognition particle receptor subunit beta	SRPRB	1,63	0,17
28S ribosomal protein S28, mitochondrial	MRPS28	1,63	0,18
Bifunctional methylenetetrahydrofolate dehydrogenase/cyclohydrolase, mitochondrial	MTHFD2	1,63	0,10
H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 1	GAR1	1,63	0,09
Opioid growth factor receptor	OGFR	1,63	0,14
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L-like	HNRNPLL	1,64	0,10
Acylglycerol kinase, mitochondrial	AGK	1,64	0,22
[Pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring)] kinase isozyme 1, mitochondrial	PDK1	1,64	0,26
Methyl-CpG-binding domain protein 3	MBD3	1,64	0,06
WD repeat-containing protein 26	WDR26	1,64	0,18
ATP synthase subunit beta, mitochondrial	ATP5B	1,64	0,05
Stideroflexin-1	SFXN1	1,64	0,10
Probable 28S rRNA (cytine-C(5))-methyltransferase	NSUN5	1,64	0,26
Serine/threonine-protein kinase PLK1	PLK1	1,64	0,11
ATP synthase subunit f, mitochondrial	ATP5I2	1,64	0,08
Protein unc-45 homolog A	UNC45A	1,65	0,06
ATP synthase subunit O, mitochondrial	ATP5O	1,65	0,15
Plasma membrane calcium-trans porting ATPase 1	ATP2B1	1,65	0,06
Centromere protein O	CENPO	1,65	0,49
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase F, mitochondrial	PPIF	1,65	0,24
Short-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	ACADS	1,65	0,22
Tyrosyl-DNA phosphodiesterase 2	TDP2	1,65	0,17
High mobility group nucleome-binding domain-containing protein 4	HMGN4	1,65	0,42
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 10	NDUFB10	1,65	0,21
Cytochrome b-c1 complex subunit 8	UQCRCQ	1,65	0,10
ATP-dependent RNA helicase S UPV3L1, mitochondrial	SUPV3L1	1,65	0,14
28S ribosomal protein S34, mitochondrial	MRPS34	1,65	0,19
Lipoamide acyltransferase component of branched-chain alpha-keto acid dehydro	DBT	1,66	0,27
NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2, mitochondrial	NDUFV2	1,66	0,27
NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 4, mitochondrial	NDUFS4	1,66	0,10
Lysosomal-associated transmembrane protein 5	LAPTM5	1,66	0,15
28S ribosomal protein S9, mitochondrial	MRPS9	1,66	0,11
Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, mitochondrial	GPD2	1,66	0,18
Tricarboxylate transport protein, mitochondrial	SLC25A1	1,66	0,17
Protein kinase C beta type	PRKCB	1,67	0,04
2-oxoglutarate dehydrogenase, mitochondrial	OGDH	1,67	0,03
LETM1 and EF-hand domain-containing protein 1, mitochondrial	LETM1	1,67	0,16
Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2	ATP2A2	1,67	0,21
Lon protease homolog, mitochondrial	LONP1	1,67	0,06
Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	ACADM	1,67	0,12
39S ribosomal protein L55, mitochondrial	MRPL55	1,68	0,26
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 11, mitochondrial	NDUFB11	1,68	0,25
Phosphate carrier protein, mitochondrial	SLC25A3	1,68	0,17
Calcium-binding mitochondrial carrier protein SCaMC-1	SLC25A24	1,68	0,11
Zinc transporter SLC39A7	SLC39A7	1,68	0,25
Growth arrest and DNA damage-inducible protein-interacting protein 1	GADD45GIP1	1,68	0,15
Acetyl-coenzyme A transporter 1	SLC33A1	1,69	0,27
DNA topoisomerase 1	TOP1	1,69	0,41
Coronin-7	CORO7	1,69	0,15
6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase	PFKFB4	1,70	0,12
Tyrosine-tRNA ligase, mitochondrial	YARS2	1,70	0,15
Ufm1-specific protease 2	UFSPP2	1,70	0,29

Reticulon-4	RTN4	1,70	0,15
Zinc finger CCHC domain-containing protein 8	ZCCHC8	1,70	0,15
28S ribosomal protein S6, mitochondrial	MRPS6	1,70	0,15
NFU1 iron-sulfur cluster scaffold homolog, mitochondrial	NFU1	1,70	0,05
Nicasin	NCSTN	1,71	0,17
WD repeat-containing protein 82	WDR82	1,71	0,27
CDGS H iron-sulfur domain-containing protein 2	CISD2	1,71	0,23
Cellular nucleic acid-binding protein	CNPB	1,71	0,30
Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	VDAC1	1,72	0,04
Translocon-associated protein subunit delta	SSR4	1,72	0,32
Transcription factor A, mitochondrial	TFAM	1,72	0,09
Plexin-B2	PLXNB2	1,72	0,32
Prohibitin-2	PHB2	1,72	0,14
Oligosaccharyltransferase complex subunit TC	OSTC	1,73	0,09
RWD domain-containing protein 1	RWD1	1,73	0,24
Acyl-CoA dehydrogenase family member 9, mitochondrial	ACAD9	1,73	0,24
Arginase-2, mitochondrial	ARG2	1,73	0,10
Thioredoxin, mitochondrial	TXN2	1,73	0,49
39S ribosomal protein L48, mitochondrial	MRPL48	1,73	0,08
Polyribonucleotide nucleotidyltransferase 1, mitochondrial	PNPT1	1,74	0,20
Nucleolar protein 56	NOP56	1,74	0,08
1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase alpha	AGPAT1	1,74	0,17
Protein NipSNAP homolog 2	GBAS	1,74	0,10
Prstaglandin E synthase 2	PTGES2	1,75	0,26
NADH-cytochrome b5 reductase 3	CYB5R3	1,75	0,22
Tetratricopeptide repeat protein 19, mitochondrial	TTC19	1,75	0,40
PAX3- and PAX7-binding protein 1	PAXBP1	1,75	0,21
28S ribosomal protein S27, mitochondrial	MRPS27	1,75	0,07
Cat eye syndrome critical region protein 2	CERC2	1,75	0,37
Translocation protein SEC62	SEC62	1,75	0,03
ATPase family AAA domain-containing protein 2	ATAD2	1,76	0,58
2,4-dienoyl-CoA reductase, mitochondrial	DEC R1	1,76	0,09
7-dehydrocholesterol reductase	DHCR7	1,76	0,37
Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 1-like	CHD1L	1,77	0,15
Integrator complex subunit 3	INTS3	1,77	0,37
Actin-binding protein anillin	ANLN	1,77	0,49
Acyl-coenzyme A synthetase ACSM3, mitochondrial	ACSM3	1,77	0,31
Protein NipSNAP homolog 3A	NIPSNAP3A	1,77	0,07
Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	SOD2	1,78	0,40
Cytochrome c oxidase subunit 7A2, mitochondrial	COX7A2	1,79	0,09
GTP:AMP phosphotransferase AK3, mitochondrial	AK3	1,80	0,16
Ribosomal protein 63, mitochondrial	MRPL57	1,80	0,11
ES1 protein homolog, mitochondrial	C2orf33	1,80	0,15
Tomatin-like protein 2, mitochondrial	STOML2	1,80	0,12
Vitamin K epoxide reductase complex subunit 1	VKORC1	1,80	0,43
Polyprenol reductase	SRD5A3	1,80	0,28
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 4	NDUFB4	1,80	0,32
Coiled-coil domain-containing protein 47	CCDC47	1,80	0,57
Ras-related protein Rab-10	RAB10	1,81	0,21
Methionine tRNA transferase 7A	METTL7A	1,81	0,25
Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial	PRDX3	1,81	0,11
Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase subunit DAD1	DAD1	1,81	0,23
Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial	IDH2	1,81	0,18
Mitomal glutathione S-transferase 2	MGST2	1,81	0,34
CAAX prenyl protease 1 homolog	ZMPSTE24	1,82	0,10
Malectin	MLEC	1,82	0,29
Transmembrane protein 43	TME M43	1,82	0,20
Charged multivesicular body protein 2a	CHMP2A	1,82	0,16
tRNA modification GTPase GTPBP3, mitochondrial	GTPBP3	1,83	0,10
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 13	NDUFA13	1,83	0,10
Cytochrome c oxidase subunit 7C, mitochondrial	COX7C	1,83	0,16
Phosphoenolpyruvate carboxykinase [GTP], mitochondrial	PCK2	1,85	0,19
28S ribosomal protein S11, mitochondrial	MRPS11	1,85	0,33
Tyrosine-protein kinase BAZ1B	BAZ1B	1,85	0,30
Histon H2A.Z	H2AFZ	1,85	0,56
Centromal protein of 170 kDa	CEP170	1,85	0,10
Phosphatidylglycerophosphate acetyltransferase 1	PTPMT1	1,85	0,06
Discoidin and metalloproteinase domain-containing protein 10	ADAM10	1,85	0,32
Cytochrome b-c1 complex subunit 7	UQCRCB	1,85	0,22
Catechol O-methyltransferase	COMT	1,85	0,18

Transmembrane protein 147	TME M147	1,85	0,27
Chromosome alignment-maintaining phosphoprotein 1	C HAMP 1	1,86	0,27
28S ribosomal protein S 10, mitochondrial	M R P S 10	1,87	0,09
Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	VDAC 2	1,87	0,05
GPI transamidase component PIG-T	P IGT	1,87	0,20
Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member E	ANP 32E	1,88	0,03
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10	NDUFA10	1,88	0,29
Rap guanine nucleotide exchange factor 6	R A P G E F 6	1,88	0,10
39S ribosomal protein L46, mitochondrial	M R P L46	1,88	0,12
28S ribosomal protein S 33, mitochondrial	M R P S 33	1,89	0,17
Ras-related protein Rab-27A	R A B 27A	1,90	0,19
10 kDa heat shock protein, mitochondrial	H S 1	1,90	0,62
Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase	D L A T	1,91	0,10
Tether containing UBX domain for GLUT4	A S P S C R 1	1,92	0,37
Ankyrin repeat domain-containing protein 27	A N K R D 27	1,92	0,38
Transmembrane protein 109	T M E M 109	1,92	0,35
Cysteine and glycine-rich protein 1	C S R P 1	1,92	0,33
Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein	T R A D D	1,92	0,15
Nicotinamide/nicotinic acid mononucleotide adenyllyltransferase 1	N M N A T 1	1,93	0,30
Aspartate-tRNA ligase, mitochondrial	D A R S 2	1,93	0,21
Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase subunit 1	R P N 1	1,94	0,23
39S ribosomal protein L13, mitochondrial	M R P L13	1,94	0,03
NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 5	N D U F S 5	1,95	0,08
Unconventional myo-XIX	M Y O 19	1,95	0,20
39S ribosomal protein L3, mitochondrial	M R P L3	1,95	0,24
Ubiquitin-like modifier-activating enzyme ATG7	A T G 7	1,96	0,48
Ras-related protein Rap-1b	R A P 1B	1,96	0,12
Fatty acyl-CoA reductase 1	F A R 1	1,97	0,49
Signal peptidase complex subunit 3	S P C S 3	1,98	0,26
3-keto-steroid reductase	H S D 17B 7	1,98	0,26
Ligand-dependent nuclear receptor-interacting factor 1	L R I F 1	1,99	0,22
ATP synthase subunit g, mitochondrial	A T P S L	2,01	0,07
NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 8, mitochondrial	N D U F S 8	2,02	0,24
Lamin-B receptor	L B R	2,04	0,25
Signal peptidase complex subunit 2	S P C S 2	2,04	0,29
Nuclear pore membrane glycoprotein 210	N U P 210	2,04	0,38
SLC-ROBO Rho GTPase-activating protein 2	S R G A P 2	2,06	0,95
Zinc finger protein 512	Z N F 512	2,07	0,40
Micromal glutathione S-transferase 1	M G S T 1	2,07	0,47
Transcription factor p65	R E L A	2,07	0,17
Transmembrane protein 70, mitochondrial	T M E M 70	2,09	0,27
Origin recognition complex subunit 4	O R C 4	2,10	0,25
Sorting and assembly machinery component 50 homolog	S A M M 50	2,12	0,12
Alpha-adducin	A D D 1	2,13	0,69
Branched-chain-amino-acid aminotransferase, mitochondrial	B C A T 2	2,13	0,17
Translocon-associated protein subunit gamma	S S R 3	2,13	0,35
Acylamino-acid-releasing enzyme	A H	2,13	0,39
Derlin-1	D E R L 1	2,14	0,33
Estradiol 17-beta-dehydrogenase 8	H S D 17B 8	2,14	0,44
Histone H2A type 1-B/E	H I S T 1 H 2 A B	2,17	0,76
Core histone macro-H2A.1	H 2 A F Y	2,18	0,65
Choline/ethanolaminephphotransferase 1	C E P T 1	2,18	0,34
Putative tRNA pseudouridine synthase Pus10	P U S 10	2,18	0,63
Very-long-chain (3R)-3-hydroxyacyl-CoA dehydratase 3	H A C D 3	2,19	0,24
Catechol O-methyltransferase domain-containing protein 1	C O M T D 1	2,19	0,28
Nicalin	N C L N	2,19	0,45
Hypermethylated in cancer 2 protein	H I C 2	2,20	0,41
Interferon-stimulated 20 kDa exonuclease-like 2	I S G 20 L 2	2,20	0,66
Protein RMDS5 homolog A	R M N D S A	2,20	0,46
Tonsoku-like protein	T O N S L	2,20	0,32
Dehydrogenase/reductase SDR family member 7	D H R S 7	2,20	0,31
Very long-chain acyl-CoA synthetase	S L C 27A 2	2,21	0,28
Long-chain-fatty-acid-CoA ligase 4	A C S L 4	2,23	0,29
E3 ubiquitin-protein ligase RNF185	R N F 185	2,23	0,65
Transmembrane emp24 domain-containing protein 5	T M E D 5	2,23	0,07
Long-chain-fatty-acid-CoA ligase 3	A C S L 3	2,24	0,29
Lysophospholipid acyltransferase 7	M B O A T 7	2,24	0,11
Crooked neck-like protein 1	C R N K L 1	2,27	0,28

Probable ATP-dependent RNA helicase DHX37	DHX37	2,28	0,39
Very-long-chain enoyl-CoA reductase	TECR	2,28	0,25
Histone H1x	H1FX	2,28	0,20
Translocon-associated protein subunit alpha	SSR1	2,30	0,57
Dolichyl-diphphooligaccharide--protein glycytransferase subunit STT3A	STT3A	2,31	0,21
NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 2	MT-ND2	2,34	0,46
Pre-mRNA-splicing factor ISY1 homolog	ISY1	2,35	0,56
Nucleolar complex protein 4 homolog	NOC4L	2,36	0,23
Ceramide synthase 2	CERS2	2,36	0,74
Histone H2B type 1-L	HIST1H2BL	2,37	0,71
39S ribosomal protein L19, mitochondrial	MRPL19	2,38	0,44
60S ribosome subunit biogenesis protein NIP7 homolog	NIP7	2,38	0,53
Protein lin-54 homolog	LIN54	2,38	0,33
Dolichyl-diphphooligaccharide--protein glycytransferase 48 kDa subunit	DDOST	2,41	0,31
PHD finger protein 6	PHF6	2,44	0,39
Histone H4	HIST1H4A	2,44	0,87
Dolichyl-diphphooligaccharide--protein glycytransferase subunit 2	RPN2	2,45	0,17
Putative E3 ubiquitin-protein ligase UBR7	UBR7	2,45	0,39
Manne-P-dolichol utilization defect 1 protein	MPDU1	2,48	0,55
Spindle assembly abnormal protein 6 homolog	SASS6	2,51	0,24
Uncharacterized protein C1orf167	C1orf167	2,52	0,66
Serine palmitoyltransferase 2	SPTLC2	2,56	0,34
Histone H2B type 1-K	HIST1H2BK	2,57	0,90
Transmembrane protein 41A	TMEM41A	2,58	0,24
Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 3	ATP2A3	2,60	0,45
NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 4	MT-ND4	2,61	0,48
Sodium-dependent phphate transporter 1	SLC20A1	2,64	0,63
Protein kish-A	TMEM167A	2,64	0,37
Extended synaptotagmin-2	ESYT2	2,78	0,52
Ammonium transporter Rh type A	RHAG	2,81	0,61
Acyl-CoA desaturase	SCD	2,83	0,65
Histone H2AX	H2AFX	2,84	0,85
Lactadherin	MFGE8	2,87	0,13
Protein pelota homolog	LO	2,95	0,56
Histone H3.3	H3F3A	3,04	1,25
Cyclin-dependent kinase 11A	CDK11A	3,04	0,78
MIC complex subunit MIC26	APOO	3,05	0,53
Histone H1.4	HIST1H1E	3,17	1,30
Solute carrier family 2, facilitated gluce transporter member 1	SLC2A1	3,31	0,75
Exocyst complex component 2	EXOC2	3,49	0,54
Growth/differentiation factor 15	GDF15	3,65	0,26
Sequestome-1	SQSTM1	3,73	1,03
Solute carrier family 2, facilitated gluce transporter member 14	SLC2A14	4,69	0,88

BIBLIOGRAFIA

1. MENDONÇA, M.A.O.,
MECANISMOS ENVOLVIDOS NA REDUÇÃO DA FUNÇÃO QUIMIOTÁTICA DENEUTRÓFILOS A PÓS QUIMIOTERAPIA EM PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA., in *Patologia Clínica*. 2009, Universidade Federal do Triângulo Mineiro Uberaba – MG.
2. Santos, H.S.d., 1, and e.W.M.d.S. Cruz, *The Antioxidant Vitamin Nutritional Therapy and the Chemotherapy Treatment in Oncology*. Revista Brasileira de Cancerologia, 2001. **47**(3): p. 303-08.
3. Vogelstein, B. and K.W. Kinzler, *The multistep nature of cancer*. Trends Genet, 1993. **9**(4): p. 138-41.
4. Miwa, M., et al., *Genetic and environmental determinants of risk for cholangiocarcinoma in Thailand*. World J Gastrointest Pathophysiol, 2014. **5**(4): p. 570-8.
5. Dantas ÉLR, R.E., *Genetics of Hereditary Cancer*. Revista Brasileira de Cancerologia, 2009. **1**(55): p. 7.
6. Montgomery, M.K., *RNA interference: historical overview and significance*. Methods Mol Biol, 2004. **265**: p. 3-21.
7. Hendruschk, S., et al., *RNA interference targeting survivin exerts antitumoral effects in vitro and in established glioma xenografts in vivo*. Neuro Oncol, 2011. **13**(10): p. 1074-89.
8. Kelly, R.J., et al., *Impacting tumor cell-fate by targeting the inhibitor of apoptosis protein survivin*. Mol Cancer, 2011. **10**: p. 35.
9. Ambrosini, G., C. Adida, and D.C. Altieri, *A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma*. Nat Med, 1997. **3**(8): p. 917-21.
10. Montazeri Aliabadi, H., et al., *Induction of apoptosis by survivin silencing through siRNA delivery in a human breast cancer cell line*. Mol Pharm, 2011. **8**(5): p. 1821-30.
11. Widera, D., et al., *Neural stem cells, inflammation and NF-kappaB: basic principle of maintenance and repair or origin of brain tumours?* J Cell Mol Med, 2008. **12**(2): p. 459-70.
12. Severi, T., et al., *Tumor initiation and progression in hepatocellular carcinoma: risk factors, classification, and therapeutic targets*. Acta Pharmacol Sin, 2010. **31**(11): p. 1409-20.
13. Guo, J.Y., B. Xia, and E. White, *Autophagy-mediated tumor promotion*. Cell, 2013. **155**(6): p. 1216-9.
14. Chen, J., *The Cell-Cycle Arrest and Apoptotic Functions of p53 in Tumor Initiation and Progression*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2016. **6**(3).
15. Haakensen, V.D., et al., *Subtype-specific micro-RNA expression signatures in breast cancer progression*. Int J Cancer, 2016. **139**(5): p. 1117-28.
16. Luzzatto, L. and P.P. Pandolfi, *Causality and Chance in the Development of Cancer*. N Engl J Med, 2015. **373**(16): p. 1579.
17. Armitage, P., *Multistage models of carcinogenesis*. Environ Health Perspect, 1985. **63**: p. 195-201.
18. Swartz, J.B., *Use of a multistage model to predict time trends in smoking induced lung cancer*. J Epidemiol Community Health, 1992. **46**(3): p. 311-5.

19. Kamphorst, J.J., et al., *Hypoxic and Ras-transformed cells support growth by scavenging unsaturated fatty acids from lysophospholipids*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(22): p. 8882-7.
20. Radisky, D.C., et al., *Rac1b and reactive oxygen species mediate MMP-3-induced EMT and genomic instability*. Nature, 2005. **436**(7047): p. 123-7.
21. Hui, L. and Y. Chen, *Tumor microenvironment: Sanctuary of the devil*. Cancer Lett, 2015. **368**(1): p. 7-13.
22. Nieman, K.M., et al., *Adipose tissue and adipocytes support tumorigenesis and metastasis*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1831**(10): p. 1533-41.
23. Carter, J.C. and F.C. Church, *Mature breast adipocytes promote breast cancer cell motility*. Exp Mol Pathol, 2012. **92**(3): p. 312-7.
24. Lima, M., et al., *Chemokine Receptor Expression on Normal Blood CD56(+) NK-Cells Elucidates Cell Partners That Comigrate during the Innate and Adaptive Immune Responses and Identifies a Transitional NK-Cell Population*. J Immunol Res, 2015. **2015**: p. 839684.
25. MacLean, A.L., S. Filippi, and M.P. Stumpf, *The ecology in the hematopoietic stem cell niche determines the clinical outcome in chronic myeloid leukemia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(10): p. 3883-8.
26. Folkman, J., *What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent?* J Natl Cancer Inst, 1990. **82**(1): p. 4-6.
27. Skinner, S.A., P.J. Tutton, and P.E. O'Brien, *Microvascular architecture of experimental colon tumors in the rat*. Cancer Res, 1990. **50**(8): p. 2411-7.
28. Gimbrone, M.A., Jr., et al., *Tumor growth and neovascularization: an experimental model using the rabbit cornea*. J Natl Cancer Inst, 1974. **52**(2): p. 413-27.
29. Hashizume, H., et al., *Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness*. Am J Pathol, 2000. **156**(4): p. 1363-80.
30. Collins, P.D., D.T. Connolly, and T.J. Williams, *Characterization of the increase in vascular permeability induced by vascular permeability factor in vivo*. Br J Pharmacol, 1993. **109**(1): p. 195-9.
31. Nelson, D.A., et al., *Hypoxia and defective apoptosis drive genomic instability and tumorigenesis*. Genes Dev, 2004. **18**(17): p. 2095-107.
32. McDonald, P.C., S.C. Chafe, and S. Dedhar, *Overcoming Hypoxia-Mediated Tumor Progression: Combinatorial Approaches Targeting pH Regulation, Angiogenesis and Immune Dysfunction*. Front Cell Dev Biol, 2016. **4**: p. 27.
33. Loges, S., et al., *Silencing or fueling metastasis with VEGF inhibitors: antiangiogenesis revisited*. Cancer Cell, 2009. **15**(3): p. 167-70.
34. Minchinton, A.I. and I.F. Tannock, *Drug penetration in solid tumours*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(8): p. 583-92.
35. Jiang, B.H., et al., *Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1*. J Biol Chem, 1996. **271**(30): p. 17771-8.
36. Chiarini, F., et al., *Advances in understanding the acute lymphoblastic leukemia bone marrow microenvironment: From biology to therapeutic targeting*. Biochim Biophys Acta, 2015.
37. Pennacchietti, S., et al., *Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met protooncogene*. Cancer Cell, 2003. **3**(4): p. 347-61.

38. Bruick, R.K. and S.L. McKnight, *A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF*. Science, 2001. **294**(5545): p. 1337-40.
39. Epstein, A.C., et al., *C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation*. Cell, 2001. **107**(1): p. 43-54.
40. Lee, K., et al., *Acriflavine inhibits HIF-1 dimerization, tumor growth, and vascularization*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(42): p. 17910-5.
41. Vaupel, P., et al., *[Respiratory gas exchange and glucose uptake by the human spleen in situ (author's transl)]*. Klin Wochenschr, 1977. **55**(5): p. 239-42.
42. Vaupel, P., F. Kallinowski, and P. Okunieff, *Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review*. Cancer Res, 1989. **49**(23): p. 6449-65.
43. Harris, A.L., *Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(1): p. 38-47.
44. Guzy, R.D., et al., *Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing*. Cell Metab, 2005. **1**(6): p. 401-8.
45. Ozcan, U., et al., *Loss of the tuberous sclerosis complex tumor suppressors triggers the unfolded protein response to regulate insulin signaling and apoptosis*. Mol Cell, 2008. **29**(5): p. 541-51.
46. Guertin, D.A. and D.M. Sabatini, *Defining the role of mTOR in cancer*. Cancer Cell, 2007. **12**(1): p. 9-22.
47. Wouters, B.G. and M. Koritzinsky, *Hypoxia signalling through mTOR and the unfolded protein response in cancer*. Nat Rev Cancer, 2008. **8**(11): p. 851-64.
48. Young, R.M., et al., *Dysregulated mTORC1 renders cells critically dependent on desaturated lipids for survival under tumor-like stress*. Genes Dev, 2013. **27**(10): p. 1115-31.
49. Duvel, K., et al., *Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1*. Mol Cell, 2010. **39**(2): p. 171-83.
50. Price, D.T., et al., *Comparison of [18 F]fluorocholine and [18 F]fluorodeoxyglucose for positron emission tomography of androgen dependent and androgen independent prostate cancer*. J Urol, 2002. **168**(1): p. 273-80.
51. Zaidi, N., et al., *Lipogenesis and lipolysis: the pathways exploited by the cancer cells to acquire fatty acids*. Prog Lipid Res, 2013. **52**(4): p. 585-9.
52. Menendez, J.A. and R. Lupu, *Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis*. Nat Rev Cancer, 2007. **7**(10): p. 763-77.
53. Soccio, R.E. and J.L. Breslow, *Intracellular cholesterol transport*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(7): p. 1150-60.
54. Atique, F.B. and M.M. Khalil, *The bacterial contamination of allogeneic bone and emergence of multidrug-resistant bacteria in tissue bank*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 430581.
55. Goldstein, J.L. and M.S. Brown, *Regulation of the mevalonate pathway*. Nature, 1990. **343**(6257): p. 425-30.
56. Eisenberg, D.A., *Cholesterol lowering in the management of coronary artery disease: the clinical implications of recent trials*. Am J Med, 1998. **104**(2A): p. 2S-5S.
57. Feng, B., et al., *The endoplasmic reticulum is the site of cholesterol-induced cytotoxicity in macrophages*. Nat Cell Biol, 2003. **5**(9): p. 781-92.

58. Fu, S., et al., *Aberrant lipid metabolism disrupts calcium homeostasis causing liver endoplasmic reticulum stress in obesity*. Nature, 2011. **473**(7348): p. 528-31.
59. Shi, X., et al., *Synthesis, characterization, and intracellular uptake of carboxyl-terminated poly(amidoamine) dendrimer-stabilized iron oxide nanoparticles*. Phys Chem Chem Phys, 2007. **9**(42): p. 5712-20.
60. Wang, Y., et al., *Increased apoptosis in high-fat diet-induced nonalcoholic steatohepatitis in rats is associated with c-Jun NH₂-terminal kinase activation and elevated proapoptotic Bax*. J Nutr, 2008. **138**(10): p. 1866-71.
61. Ariyama, H., et al., *Decrease in membrane phospholipid unsaturation induces unfolded protein response*. J Biol Chem, 2010. **285**(29): p. 22027-35.
62. Rong, X., et al., *LXRs regulate ER stress and inflammation through dynamic modulation of membrane phospholipid composition*. Cell Metab, 2013. **18**(5): p. 685-97.
63. Moessinger, C., et al., *Two different pathways of phosphatidylcholine synthesis, the Kennedy Pathway and the Lands Cycle, differentially regulate cellular triacylglycerol storage*. BMC Cell Biol, 2014. **15**: p. 43.
64. Malhotra, J.D. and R.J. Kaufman, *Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword?* Antioxid Redox Signal, 2007. **9**(12): p. 2277-93.
65. Renehan, A.G., et al., *Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies*. Lancet, 2008. **371**(9612): p. 569-78.
66. Mosley, S.T., et al., *Targeted killing of cultured cells by receptor-dependent photosensitization*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. **78**(9): p. 5717-21.
67. Versluis, A.J., et al., *Receptor-mediated uptake of low-density lipoprotein by B16 melanoma cells in vitro and in vivo in mice*. Br J Cancer, 1996. **74**(4): p. 525-32.
68. Maier, W., et al., *LRP1 is critical for the surface distribution and internalization of the NR2B NMDA receptor subtype*. Mol Neurodegener, 2013. **8**: p. 25.
69. Saintot, M., et al., *Tumor progression and oxidant-antioxidant status*. Carcinogenesis, 1996. **17**(6): p. 1267-71.
70. Soverini, S., et al., *Mutations in the BCR-ABL1 Kinase Domain and Elsewhere in Chronic Myeloid Leukemia*. Clin Lymphoma Myeloma Leuk, 2015. **15 Suppl**: p. S120-8.
71. Ghartimagar, D., et al., *Patterns of hematological and non-hematological malignancies in bone marrow in a tertiary care hospital in Nepal--11 years study*. Nepal Med Coll J, 2012. **14**(3): p. 187-92.
72. Kang, Z.J., et al., *The Philadelphia chromosome in leukemogenesis*. Chin J Cancer, 2016. **35**(1): p. 48.
73. Gu, S., et al., *Distinct GAB2 signaling pathways are essential for myeloid and lymphoid transformation and leukemogenesis by BCR-ABL1*. Blood, 2016. **127**(14): p. 1803-13.
74. Bertacchini, J., et al., *Inhibition of Ras-mediated signaling pathways in CML stem cells*. Cell Oncol (Dordr), 2015. **38**(6): p. 407-18.
75. Liang, X., et al., *Discovery of 2-((3-Amino-4-methylphenyl)amino)-N-(2-methyl-5-(3-(trifluoromethyl)benzamido)phenyl)-4-(methylamino)pyrimidine-5-carboxamide (CHMFL-ABL-053) as a Potent, Selective, and Orally Available BCR-ABL/SRC/p38 Kinase Inhibitor for Chronic Myeloid Leukemia*. J Med Chem, 2016. **59**(5): p. 1984-2004.
76. Dunant, N.M., et al., *The phosphatidylinositol polyphosphate SHIP1 associates with the dok1 phosphoprotein in bcr-Abl transformed cells*. Cell Signal, 2000. **12**(5): p. 317-26.

77. Basingab, F.S., M. Ahmadi, and D.J. Morgan, *IFNgamma-Dependent Interactions between ICAM-1 and LFA-1 Counteract Prostaglandin E2-Mediated Inhibition of Antitumor CTL Responses*. *Cancer Immunol Res*, 2016. **4**(5): p. 400-11.
78. Samis, J., et al., *Recognizing Endocrinopathies Associated With Tyrosine Kinase Inhibitor Therapy in Children With Chronic Myelogenous Leukemia*. *Pediatr Blood Cancer*, 2016. **63**(8): p. 1332-8.
79. Deininger, M.W., et al., *BCR-ABL tyrosine kinase activity regulates the expression of multiple genes implicated in the pathogenesis of chronic myeloid leukemia*. *Cancer Res*, 2000. **60**(7): p. 2049-55.
80. Jabbour, E., et al., *Choosing the best treatment strategy for chronic myeloid leukemia patients resistant to imatinib: weighing the efficacy and safety of individual drugs with BCR-ABL mutations and patient history*. *Leukemia*, 2010. **24**(1): p. 6-12.
81. Radich, J.P., *The Biology of CML blast crisis*. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2007: p. 384-91.
82. Mahon, F.X., et al., *Selection and characterization of BCR-ABL positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor ST1571: diverse mechanisms of resistance*. *Blood*, 2000. **96**(3): p. 1070-9.
83. Vaidya, S., K. Ghosh, and B.R. Vundinti, *Recent developments in drug resistance mechanism in chronic myeloid leukemia: a review*. *Eur J Haematol*, 2011. **87**(5): p. 381-93.
84. Roychowdhury, S. and M. Talpaz, *Managing resistance in chronic myeloid leukemia*. *Blood Rev*, 2011. **25**(6): p. 279-90.
85. Barnes, D.J., et al., *Bcr-Abl expression levels determine the rate of development of resistance to imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia*. *Cancer Res*, 2005. **65**(19): p. 8912-9.
86. Quintas-Cardama, A., H.M. Kantarjian, and J.E. Cortes, *Mechanisms of primary and secondary resistance to imatinib in chronic myeloid leukemia*. *Cancer Control*, 2009. **16**(2): p. 122-31.
87. Galimberti, S., et al., *Quantitative molecular monitoring of BCR-ABL and MDR1 transcripts in patients with chronic myeloid leukemia during Imatinib treatment*. *Cancer Genet Cytogenet*, 2005. **162**(1): p. 57-62.
88. Saussele, S. and R.T. Silver, *Management of chronic myeloid leukemia in blast crisis*. *Ann Hematol*, 2015. **94 Suppl 2**: p. S159-65.
89. Melo, J.V. and D.J. Barnes, *Chronic myeloid leukaemia as a model of disease evolution in human cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2007. **7**(6): p. 441-53.
90. Li, H.Y., et al., *Cholesterol-modulating agents kill acute myeloid leukemia cells and sensitize them to therapeutics by blocking adaptive cholesterol responses*. *Blood*, 2003. **101**(9): p. 3628-34.
91. Bissell, M.J. and D. Radisky, *Putting tumours in context*. *Nat Rev Cancer*, 2001. **1**(1): p. 46-54.
92. Jorgensen, K.M., et al., *Untangling the intracellular signalling network in cancer--a strategy for data integration in acute myeloid leukaemia*. *J Proteomics*, 2011. **74**(3): p. 269-81.
93. Abi-Jaoudeh, N., et al., *Personalized oncology in interventional radiology*. *J Vasc Interv Radiol*, 2013. **24**(8): p. 1083-92; quiz 1093.
94. Havel, R.J., H.A. Eder, and J.H. Bragdon, *The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum*. *J Clin Invest*, 1955. **34**(9): p. 1345-53.
95. Radding, C.M. and D. Steinberg, *Studies on the synthesis and secretion of serum lipoproteins by rat liver slices*. *J Clin Invest*, 1960. **39**: p. 1560-9.

96. Anderson, N.L. and N.G. Anderson, *The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects*. Mol Cell Proteomics, 2002. **1**(11): p. 845-67.
97. Lozzio, C.B. and B.B. Lozzio, *Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome*. Blood, 1975. **45**(3): p. 321-34.
98. Andersson, L.C., K. Nilsson, and C.G. Gahmberg, *K562--a human erythroleukemic cell line*. Int J Cancer, 1979. **23**(2): p. 143-7.
99. Seigneurin, D., et al., *Human chronic myeloid leukemic cell line with positive Philadelphia chromosome exhibits megakaryocytic and erythroid characteristics*. Exp Hematol, 1987. **15**(8): p. 822-32.
100. Ertel, A., et al., *Pathway-specific differences between tumor cell lines and normal and tumor tissue cells*. Mol Cancer, 2006. **5**(1): p. 55.
101. Rosa Fernandes, L., et al., *7-Ketocholesterol overcomes drug resistance in chronic myeloid leukemia cell lines beyond MDR1 mechanism*. J Proteomics, 2016.
102. Morgan, D.O., *Principles of CDK regulation*. Nature, 1995. **374**(6518): p. 131-4.
103. Nurse, P.M., *Nobel Lecture. Cyclin dependent kinases and cell cycle control*. Biosci Rep, 2002. **22**(5-6): p. 487-99.
104. Mouron, S., et al., *RINGO C is required to sustain the spindle-assembly checkpoint*. J Cell Sci, 2010. **123**(Pt 15): p. 2586-95.
105. Hara, T., et al., *Flavopiridol potentiates the cytotoxic effects of radiation in radioresistant tumor cells in which p53 is mutated or Bcl-2 is overexpressed*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2008. **71**(5): p. 1485-95.
106. Zhang, F., et al., *Wortmannin potentiates roscovitine-induced growth inhibition in human solid tumor cells by repressing PI3K/Akt pathway*. Cancer Lett, 2009. **286**(2): p. 232-9.
107. Liu, J.H., et al., *Functional association of TGF-beta receptor II with cyclin B*. Oncogene, 1999. **18**(1): p. 269-75.
108. Fischer, M., et al., *The p53-p21-DREAM-CHR pathway regulates G2/M cell cycle genes*. Nucleic Acids Res, 2016. **44**(1): p. 164-74.
109. Chiu, A., et al., *Review of chromium (VI) apoptosis, cell-cycle-arrest, and carcinogenesis*. J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev, 2010. **28**(3): p. 188-230.
110. Kaufmann, W.K. and D.G. Kaufman, *Cell cycle control, DNA repair and initiation of carcinogenesis*. FASEB J, 1993. **7**(12): p. 1188-91.
111. Dhavan, R. and L.H. Tsai, *A decade of CDK5*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(10): p. 749-59.
112. Huang, D., et al., *Mammalian Cdk5 is a functional homologue of the budding yeast Pho85 cyclin-dependent protein kinase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(25): p. 14445-50.
113. Thompson, T., et al., *Tumor suppressor p53 status does not determine the differentiation-associated G(1) cell cycle arrest induced in leukemia cells by 1,25-dihydroxyvitamin D(3) and antioxidants*. Cancer Biol Ther, 2010. **10**(4): p. 344-50.
114. Mahoney, E., J.C. Byrd, and A.J. Johnson, *Autophagy and ER stress play an essential role in the mechanism of action and drug resistance of the cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol*. Autophagy, 2013. **9**(3): p. 434-5.
115. Lee, H.J., et al., *Novel Pathway for Hypoxia-Induced Proliferation and Migration in Human Mesenchymal Stem Cells: Involvement of HIF-1alpha, FASN, and mTORC1*. Stem Cells, 2015. **33**(7): p. 2182-95.

116. Dowling, R.J., et al., *Dissecting the role of mTOR: lessons from mTOR inhibitors*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1804**(3): p. 433-9.
117. Ding, J., et al., *Inhibition of PI3K/mTOR overcomes nilotinib resistance in BCR-ABL1 positive leukemia cells through translational down-regulation of MDM2*. PLoS One, 2013. **8**(12): p. e83510.
118. Hung, C.M., et al., *mTOR-dependent cell survival mechanisms*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2012. **4**(12).
119. Castells, M., et al., *Implication of tumor microenvironment in chemoresistance: tumor-associated stromal cells protect tumor cells from cell death*. Int J Mol Sci, 2012. **13**(8): p. 9545-71.
120. Sanchez-Tillo, E., et al., *EMT-activating transcription factors in cancer: beyond EMT and tumor invasiveness*. Cell Mol Life Sci, 2012. **69**(20): p. 3429-56.
121. Rothnie, A., et al., *The importance of cholesterol in maintenance of P-glycoprotein activity and its membrane perturbing influence*. Eur Biophys J, 2001. **30**(6): p. 430-42.
122. Bergman, P.J., *Mechanisms of anticancer drug resistance*. Vet Clin North Am Small Anim Pract, 2003. **33**(3): p. 651-67.
123. Barsony, O., et al., *A single active catalytic site is sufficient to promote transport in P-glycoprotein*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 24810.
124. !!! INVALID CITATION !!!
125. Ruiz, J.L., et al., *Interrelationship between ATP-binding cassette transporters and oxysterols*. Biochem Pharmacol, 2013.
126. Dean, M., A. Rzhetsky, and R. Allikmets, *The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily*. Genome Res, 2001. **11**(7): p. 1156-66.
127. Cousar, J.L., et al., *Influence of ATP-binding cassette polymorphisms on neurological outcome after traumatic brain injury*. Neurocrit Care, 2013. **19**(2): p. 192-8.
128. Zatelli, M.C., et al., *Cyclooxygenase-2 inhibitors prevent the development of chemoresistance phenotype in a breast cancer cell line by inhibiting glycoprotein p-170 expression*. Endocr Relat Cancer, 2007. **14**(4): p. 1029-38.
129. Brown, C.M., B. Reisfeld, and A.N. Mayeno, *Cytochromes P450: a structure-based summary of biotransformations using representative substrates*. Drug Metab Rev, 2008. **40**(1): p. 1-100.
130. Aoyama, K. and T. Nakaki, *Inhibition of GTRAP3-18 may increase neuroprotective glutathione (GSH) synthesis*. Int J Mol Sci, 2012. **13**(9): p. 12017-35.
131. Dunna, N.R., et al., *Deletion of GSTM1 and T1 genes as a risk factor for development of acute leukemia*. Asian Pac J Cancer Prev, 2013. **14**(4): p. 2221-4.
132. PhD, F.N.M.D.J.K., *Retaliation in Drug Resistance*, in *Cancer Drug Resistance*, B.A. Teicher, Editor. 2006, Human Press: 978-1-59745-035-5. p. PP 223-239.