

AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO PROTEICA DA LINHAGEM CELULAR HUMANA DE ADENOCARCINOMA RENAL, 786-O, SUBMETIDA À RADIAÇÃO IONIZANTE

EVELIN CAROLINE DA SILVA

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear- Aplicações.

Orientadora:

Profa. Dra. Maria Helena Bellini Marumo

São Paulo 2018

AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO PROTEICA DA LINHAGEM CELULAR HUMANA DE ADENOCARCINOMA RENAL, 786-O, SUBMETIDA À RADIAÇÃO IONIZANTE

EVELIN CAROLINE DA SILVA

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Aplicações

Orientadora:

Prof. Dra. Maria Helena Bellini Marumo

Versão Corrigida

São Paulo

2018

Fonte de Financiamento: CNEM/IPEN

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte

Como citar:

DA SILVA, E. C. **ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO PROTEICA DA LINHAGEM CELULAR HUMANA DE ADENOCARCINOMA RENAL, 786-O, SUBMETIDA À**

RADIAÇÃO IONIZANTE. 2018. 60 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, São Paulo.

Disponível em: (data de consulta no formato: dd/mm/aaaa)

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de geração automática da Biblioteca IPEN/USP, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

```
da Silva, Evelin Caroline

ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO PROTEICA DA LINHAGEM CELULAR HUMANA DE ADENOCARCINOMA RENAL, 786-O, SUBMETIDA À RADIAÇÃO

IONIZANTE / Evelin Caroline da Silva; orientadora Maria Helena Bellini Marumo. -- São Paulo, 2018.

60 p.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Nuclear (Aplicações) -- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2018.
```

Dedicatória

A Deus, por sempre me iluminar nos momentos mais difíceis e me dar força para superá-los.

A meus pais, Sérgio Rui da Silva e Valkiria dos Santos Silva, pela minha formação e por todo apoio em todos os momentos da minha vida.

A meus irmãos, André e Helder que sempre acompanharam minha trajetória pessoal e profissional.

As minhas amigas e amigos, Barbara Magueta, Laís Magueta, Thomaz Augusto, Josias Leal e Felipe Fernandes, por toda paciência, amor e compreensão em todos os anos de convivência, e por todo apoio e ombro amigo nos momentos mais difíceis, especialmente na realização deste trabalho.



AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Prof^a. Dra. Maria Helena Bellini, pela orientação, acolhimento, paciência e por todo esforço, apoio e incentivo às decisões tomadas para a realização deste trabalho. Muito obrigada.

A Bianca Pauletti, do laboratório nacional de biociências (LNBio), por toda ajuda na análise das minhas amostras e duvidas sanadas.

Aos meus pais, Sérgio e Valkiria, por serem grandes incentivadores e me mostrarem a importância dos estudos.

Ao Dr. Léo Kei Iwai do laboratório especial de toxinologia aplicada do Instituto Butantan, por toda ajuda, parceria e conhecimento fornecido nas analises proteômicas.

Ao Vincent Louis Viala, pela ajuda e parceria neste trabalho.

Aos companheiros de laboratório, Luiz Felipe Teixeira e Amanda Ikegami pela ajuda, apoio e horas convividas.

Ao Thomaz e Josias, pelo companheirismo, amizade, e ajuda durante a realização deste projeto. Sou eternamente grata!

A Barbara Magueta e Laís Magueta, por todos os momentos, amizade, risadas, choros e carinho ao longo dos anos. Vocês foram meu ombro amigo em todos os momentos de felicidade e dificuldade. Agradeço eternamente pela amizade de 11 anos! Amo vocês

A todos que me ajudaram diretamente ou indiretamente neste trabalho.

A CNEN pela bolsa concedida.

A FAPESP pelo apoio financeiro

SILVA, Evelin Caroline. **Análise do perfil de expressão proteica da linhagem celular humana de adenocarcinoma renal, 786-O, submetida à radiação ionizante**. 2018. 64 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN-CNEN/SP. São Paulo.

Resumo

O carcinoma de células renais (CCR) representa 3% das neoplasias humanas e aproximadamente 90% das neoplasias renais e entre os tumores urológicos. O CCR é bastante resistente à radioterapia convencional. Entretanto, com o aparecimento de novas técnicas/equipamentos é possivel a aplicação de doses com precisão presevando-se os tecidos adjacentes. Para a verificação da expressão proteica em diferentes tecidos e fluidos corporais, foi utilizado o estudo proteômico sob diferentes condições e / ou tempos. A espectrometria de massa permite a identificação e quantificação de milhares de proteínas e peptídeos em fluidos biológicos ou células lisadas, sendo assim uma ferramenta poderosa para identificação de potenciais biomarcadores de doenças. A finalidade deste trabalho foi analisar o perfil proteico das células de adenocarcinoma renal (786-0) após a radiação com doses que variaram de 2 a 10 Gy. Os dados foram tratados com o programa One-way ANOVA seguida do de Bonferroni. Pelo ensaio de clonogenicidade definiou-se a dose de 8 Gy como a ideal estudos. A extração das proteínas citoplasmáticas foi realizada com o kit de extração do proteoma subcelular PE e a quantificação das proteínas feita pelo método de Lowry. A integridade das proteínas foi analisada por SDS-PAGE e a solução proteica foi verificada em LTQ Orbitrap. Os resultados gerados foram analisados pelo servidor MASCOT para a busca de peptídeos. A análise por espectrometria de massa foi possível identificar 44 proteínas nas amostras não irradiadas - e 87 das amostras irradiadas. Nas amostras não irradiadas a distribuição dos grupos funcionais foi de síntese proteica 46,66%; Metabolismo energético 16,66%; Migração e proliferação 16,66%; Antioxidantes 3,33%. No grupo irradiado síntese proteica 35,89%; Metabolismo energético 20,51%; Migração e proliferação 20,51%; Antioxidantes 5,12%; Chaperonas moleculares 5,12% e Endopeptidases 5,12%. Em seguida, analisou-se o espetro de as seguências com escores acima de 40. Nas amostras irradiadas encontrou-se: ENO1 (47 kDa); A VIM (53 kDa)/ HEL113; PSMA1; TRAJ56; hCG; Cofilina-1 (19 kDa); HIST1H4H; PKM2; ANXA1; HSPB1/ HSP27. Deste grupo, entendemos que a subunidade alfa do proteassoma - tipo 1 (PSMA1), que possui uma atividade molecular de endopeptidase, seja um alvo interessante para estudos posteriores.

Palavras-chave: CCR, proteômica, irradiação ionizante.

SILVA, Evelin Caroline. **Protein expression profile analysis of renal carcinoma cell, 786-0, submitted to ionizing irradiation** .64 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN-CNEN/SP. São Paulo.

Abstract

Renal cell carcinoma (CRC) represents 3% of human neoplasms and approximately 90% of renal neoplasms and among urological tumors. The RCC is quite resistant to conventional radiotherapy. This technique allows the dose of radiation, in a single fraction, to be accurately applied to the tumor and the tissues adjacent to it, most of the time, are spared. The protein expression analysis in different tissues and body fluids was realized according the proteomics study under different conditions and / or times. Mass spectrometry allows the identification and quantification of thousands of proteins and peptides in a biological fluid or lysed cells, and is analyzed on a platform to identify differences in the expression of proteins associated with the proliferation of cancer cells and to establish potential biomarkers predictive of answer. The aim of this work was to analyze the protein profile of human renal cancer 786-0 cells after radiation, evaluated according the mitotic potential of irradiated cells in GammaCell performed at doses of 2 to 10 Gy. The irradiated cell colonies were stained and counted, and the multiple comparisons were analyzed by One-way ANOVA followed by the Bonferroni post-test. The dose of 8 Gy was defined as ideal for cell irradiation, the cytoplasmic proteins were extracted by the subcellular proteome PE kit and quantified by the Lowry method. For protein integrity analysis, SDS-PAGE was performed. The protein solution was analyzed in LTQ Orbitrap. The generated result was analyzed by the MASCOT server for search of peptides. Mass spectrometric analysis identified 44 proteins in non-irradiated samples - and 87 in irradiated samples. In non-irradiated samples the distribution of functional groups was protein synthesis 46.66%; Energy metabolism 16.66%; Migration and proliferation 16.66%; Antioxidants 3.33%. In the irradiated group protein synthesis 35.89%; Energy metabolism 20.51%; Migration and proliferation 20.51%; Antioxidants 5.12%; Molecular chaperones 5.12% and Endopeptidases 5.12%. Then, the spectrum of the sequences above 40 was analyzed. In the irradiated samples we found: ENO1 (47 kDa); VIM (53 kDa) / HEL113; PSMA1; TRAJ56; hCG; Cophylline-1 (19 kDa); HIST1H4H; PKM2; ANXA1; HSPB1 / HSP27. From this group, we identified the alpha subunit of the proteome type 1 (PSMA1) that has an endopeptidase This group, understood as a proteasome - type 1 (PSMA1) alpha subunit, has an endopeptidase molecular molecule and is an interesting target for further studies.

Key words: CCR, proteomics, ionizing irradiation.

Sumário

1. INT	RODUÇÃO	2
1.1	Carcinoma de Células Renais (CCR)	2
1.2	Métodos terapêuticos para o CCR primário e metastático	3
1.3	Radioterapia como opção terapêutica para o CCR	4
1.4	Biologia do câncer renal na perspectiva radioterapêutica	6
1.5	Análise proteômica na medicina	8
1.6	Espectrometria de Massas (EM)	9
2. C	Objetivo geral	. 13
2.1	Objetivos Específicos	. 13
3. N	METODOLOGIA	. 14
3.1	Cultura Celular	. 14
3.2	Ensaio do tempo de dobramento	. 14
3.3 proteid	Curva de radiossensibilidade e irradiação com a dose definida para extração ca	
3.4	Extração proteica e dosagem da concentração proteica citoplasmática	
3.5	Espectrometria de massas	
3.5.1 LNBio	Digestão tríptica das proteínas citoplasmáticas em solução total Protocolo (CNPEM)	. 16
3.5.2	Análise emLTQ Orbitrap – Thermo Scientific	. 16
3.5.3	Análise ontológica das proteínas citoplasmáticas	. 17
3.5.4	Análise Estatística	. 17
3.6	- Delineamento experimental	. 18
4. R	RESULTADOS E DISCUSSÃO	. 19
4.1	Cultura Celular	. 19
4.2	Ensaio tempo de dobramento	. 19
4.3	Curva de radiossensibilidade	. 20
4.4 786-0.	Extração e análise do perfil eletroforético das proteínas citossólicas das célu	
4.5 A	Análise em LTQ Orbitrap – Thermo Scientific	. 24
4.5.1	Análise das proteínas citosólicas totais- Qualitativa	. 24
5. C	Discussão	. 41
6. C	Conclusão	. 45
7 R	Referências Bibliográficas	47

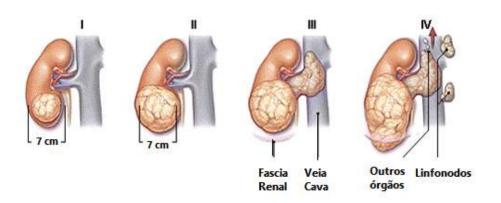
1. INTRODUÇÃO

1.1 Carcinoma de Células Renais (CCR)

O carcinoma de células renais (CCR) é uma neoplasia parenquimatosa renal que compreende 3% dos tumores malignos humanos e aproximadamente, 90% das neoplasias renais em adultos (LJUNBERG, B. et al, 2010). Dentre as neoplasias urológicas, o CCR é o terceiro mais frequente, porém, o primeiro em mortalidade (ROCHA, F. G. G, et al, 2010; KRASNY, L. et al, 2010). Sua incidência é em torno de 2 a 10 casos/100.000 habitantes/ano. Os subtipos histológicos mais frequentes são o de células claras (CCRcc), o papilífero (CCRp) e o cromófobo (CCRcr). O CCR tem como principais etiologias o tabagismo, doença cística, esclerose tuberosa e no CCRcc a síndrome de von Hippel-Lindau. (PAULA, 2010). A classificação histológica e o estadiamento dos tumores são de extrema importância para o prognóstico e escolha do tratamento da doença. No estadio 1 (T1) o tumor está restrito ao rim; no estadio 2 (T2) limitado ao rim, porém com um tamanho acima de 7 cm; o estadio 3 (T3) células tumorais invadiram a cápsula ou gordura perirrenal e há a presença de metástases em linfonodos próximos; finalmente, no estadio 4 (T4) observa-se invasão de células tumorais para fora da fascia renal, levando ao surgimento de metastáses em órgãos distantes.

Os estadios estão representados na figura 1.

Figura 1 - Estadiamento do carcinoma de células renais. I) Estadio 1(T1) – Tumor dentro do rim, limitando-se a 7 cm; II) Estadio 2 (T2) – Tumor limitado a fáscia renal, porém com 7 cm ou mais; III) Estadio 3 (T3) - é a invasão da cápsula ou gordura perirrenal, invasão vascular e presença de metástases em linfonodos próximos; IV) Estadio 4 (T4) - o tumor invade áreas fora da fascia renal, como a adrenal e outros órgãos, levando ao surgimento de metastáses.



Fonte: Modificado do site – (Chennai clinics, 2017)

1.2 Métodos terapêuticos para o CCR primário e metastático

O método de tratamento do CCR vai depender do estadio da doença. O tratamento para pacientes com a doença localizada (T1 e T2) é a nefrectomia parcial ou total do rim. (ROCHA, F. G. G, et al, 2010). O tratamento do tumor metastático é realizado com drogas cujos alvos são aqueles genes que se encontram diferencialmente expressos no tumor renal, capazes de bloquear vias específicas de sinalização celular (JONASCH et al, 2009).

Em 2006, seis drogas foram aprovadas pelo *Food and Drug Administration – US* (FDA) (GORDAN, J. D., 2007) O uso desses agentes é denominado de terapia-alvo, no qual há um direcionamento da ação do medicamento às células tumorais. Atualmente, há duas classes de antagonistas; os antagonistas da via de sinalização do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e os bloqueadores da via alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR). No primeiro grupo, estão o Sunitinib (Pfizer), Sorafenid (Bayer), Bevacizumab

(Genentech/Roche), Pazopanib (LC Laboratories) e Axitinibe (Pfizer). No grupo dos bloqueadores da mTOR, estão: o Temsirolimus (Wyeth Pharmaceuticals) e o Everolimus (Novartis) (GORDAN, J. D., 2007; BHATT, R. S. 2008; BRANNON, A. R, 2010).

Sunitinib e pazopanib são consideradas drogas de primeira linha em CCR, enquanto o axitinibe e sorafenib, apesar de terem demonstrado benefício na progressão de sobrevivência (PFS), são considerados agentes de segunda linha. (MAKHOV, 2018)

1.3 Radioterapia como opção terapêutica para o CCR

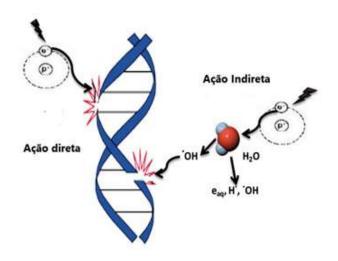
Entende-se por radiação ionizante qualquer tipo de partícula ou onda eletromagnética que transporta energia suficiente para ionizar ou remover elétrons de um átomo. Qualidades diferentes de radiação ionizante são determinadas através da transferência linear de energia (LET), que é a taxa de energia liberada por unidade de trajeto. Valores de LET de Raios-X, raios-γ e elétrons na faixa de 0,2 a 5 keV / µm, são chamados baixo-LET de radiação, enquanto nêutrons e íons mais pesados com valores de LET na faixa de 50 a 200 keV são chamados de radiação alta-LET e tem eficácia biológica relativa aumentada (RBE) (MAIER et al, 2016). A radiação ionizante vem sendo utilizada para tratamento clínico desde 1895, em especial no tratamento em pacientes com câncer (GIAP, 2012). Danos por radiação na célula podem ser causados pela ação direta ou indireta da radiação nas moléculas de DNA. Na ação direta, a radiação atinge diretamente a molécula de DNA, rompendo a estrutura molecular. Essa mudança estrutural leva a danos celulares ou até mesmo a morte celular. Na ação indireta, a radiação atinge as moléculas de água, principal constituinte da célula, e outras moléculas orgânicas na célula, onde radicais livres como hidroxila (HO •) e alcoxi (RO2 •) são produzidos. (Omar Desouky 2015)

Os radicais livres são caracterizados por um elétron desemparelhado na estrutura, que é muito reativo e, portanto, reage com moléculas de DNA para causar um dano estrutural molecular. Além disso, o peróxido de hidrogênio, H₂O₂, também é tóxico para a molécula de DNA. O resultado da ação indireta da

radiação nas moléculas de DNA é o comprometimento da função ou morte da célula. O número de radicais livres produzidos pela radiação ionizante depende da dose total. Verificou-se que a maioria dos danos induzidos pela radiação resulta do mecanismo de ação indireta porque a água constitui quase 70% da composição da célula (BETTERIDE *et al*, 2000; BASKAR *et al*, 2014).

Representação esquemática na figura 2.

Figura 2 – Esquema ilustrativo da ação direta e indireta da radiação ionizante.



Fonte: Modificado de - (Fundación Mapfre, 2014)

O CCR é considerado um tumor radiorresistente, razão pela qual a radioterapia (RT) vem sendo utilizada em combinação com outras modalidades terapêuticas (BUCH, 2012; SHIBATA *et al*, 2016). A RT pré-operatória é utilizada em CCRs com estadios avançados. A clínica Mayo (EUA) realizou um estudo com 11 pacientes com recidiva local, 8 pacientes CCR de células claras (CCRcc) e 3 com carcinoma de células escamosas do rim. Tais pacientes receberam doses de 45 e 50, 40 Gy, seguida de cirurgia e irradiação de elétrons intraoperatória de 10 a 25 Gy. Dos 8 pacientes com CCRcc, 6 sobreviveram, dos quais, 4 não apresentaramprogressão da doença em um periodo de 15 – 50 meses e 1 paciente morreu sem a doença. Em outros estudos, 13 pacientes apresentaram um aumento na sobrevida em comparação com outros, em estádio similar, sem a RT (FRYDENBERG *et al.*, 2008).

Estudo clínico retrospectivo, com 56 pacientes, mostraram que a RT pós-operatória com dose de 46 Gy, promoveu uma sobrevida de 5 e 10 anos. O esquema de tratamento fracionado, doses de 45 a 50 Gy em 3 a 5 semanas, é utilizado como tratamento paliativo em pacientes com doença metastática limitada. (STEIN *et al*, 1992; MAKAREWICZ *et al.*, 1998; PARASHAR, 2014).

Nas últimas décadas, houve um grande avanço na área de computação para produção de imagens radiológicas, o que possibilitou o desenvolvimento da técnica conformacional tridimensional (3D). Tal técnica permite a identificação dos tumores com alta precisão, minimizando a exposição à radiação do tecido normal. (BAUMANN, 2016)

A RT estereotáxica permite a aplicação de altas doses de radiação de maneira direcionada no tumor, poupando os tecidos normais adjacentes. Nessa nova tecnologia a imagem 3D do tumor orienta a aplicação de altas doses ablativas. A RT esterotáxica foi utilizada em estudos clínicos tanto com pacientes portadores de tumor primário, quanto com tumor metastático (WERSÄLL *et al.*, 2005). Após o tratamento, as lesões tumorais regrediram totalmente em 30% dos pacientes em 3 a 36 meses, enquanto 60% dos pacientes tiveram uma redução parcial de volume ou nenhuma mudança após um acompanhamento médio de 37 meses. Os efeitos colaterais foram geralmente leves. Dentre os 162 tumores tratados, apenas 3 recorreram, mostrando uma taxa de controle local de 90 a 98% (PARASHAR *et al.*, 2014).

1.4 Biologia do câncer renal na perspectiva radioterapêutica

O carcinoma de células renais tem sido tradicionalmente considerado intrinsecamente radiorresistente e os mecanismos moleculares específicos responsáveis por tal radiorresistência não foram completamente elucidados. Nas últimas décadas houveram grandes avanços no entendimento da fisiopatologia do CCR. Por exemplo, Gordan *et al* (2010). descreveu que a perda do supressor tumoral Von Hippal Lindau (VHL) ocorre em 70% de CCR de células claras . A não funcionalidade do VHL resulta na ação constitutiva do fator de transcrição HIF-2α e consequente adaptação celular à hipóxia.

Estudos recentes investigaram a relação entre a radiorresistência do CCR e o HIF-2α. Para isso, usaram a técnica de RNA de interferência para obtenção de linhagens de CCR com níveis baixos de HIF-2α. Essas linhagens celulares foram analisadas quanto a sua resposta a doses crescentes de radiação ionizante. Os resultados demonstraram que níveis reduzidos de HIF-2α promoveram um aumento significativo na radiossensibilidade e um aumento na parada do ciclo celular em G2. Os autores concluíram que drogas inibidoras de HIF-2α poderiam ser eficazes radiossensibilizadores no CCR (BHATT, *et al.*, 2008).

Outro fator de transcrição, o STAT1, parece conferir radioresistência ao CCR. Dados recentes de Hui *et al*(2009) demonstraram maior radiossensibilidade entre linhagens de CCR humano pelo inibição da expressão de STAT1 pela fludarabina e por siRNA.

Há estudos com alguns sensibilizadores que auxiliam a radioterapia em células tumorais. Um desses estudos foi realizado com o ácido bifosfonato zoledrônico (ZA), que resultou na radiosensibilização, potenciando a via de apoptose mediada por caspase-3. O efeito radiossensibilizador do ZA foi observado em linhagens celulares de CCR, incluindo as células 786-O, A-498 e ACHN, mas o mesmo não ocorreu em células Caki-1 (KIJIMA *et al*, 2013). Em outro estudo, Ambalagan e autores, avaliaram a efetiva da terapêutica da RT em conjugação com os inibidores da via mTOR (Temsirolimus) e indutores de autofagia (STF-62247). O tratamento conjugado aumentou a morte celular sob condições oxicas e hipóxicas / fisiológicas(AMBALAGAN, 2012).

Muitos estudos pré-clínicos demonstraram que a depleção ou inibição de antioxidantes intracelulares (glutationa, tioredoxina, peroxirredoxina e superóxido dismutase, etc.) pode melhorar sensibilidade à radiação, e a regulação positiva desses enzimas reguladoras de redox, podem proteger as células dos danos causados pela radiação (ZHANG, 2014).

A descoberta de genes com atividade sinérgica em combinação com RT é fundamental para expandir as opções de manejo terapêutico dos pacientes com CCR.

1.5 Análise proteômica na medicina

O termo proteoma foi cunhado por Marc Wilkins em 1977 para descrever todas as proteínas expressas por um genoma (WILKINS *et al*, 1997). Os principais objetivos da proteômica são: (i) identificar todas as proteínas; (ii) analisar a expressão diferencial de proteínas em diferentes amostras; (iii) caracterizar proteínas, identificando e estudando sua função e localização celular; e (iv) compreender as redes de interação das proteínas.

Os avanços tecnológicos no campo de espectrometria de massa (EM) e bioinformática possibilitaram o estudo de inúmeras proteínas de células, tecidos e fluidos corporais em um único experimento. Com base nesse potencial analítico, a proteômica tem sido aplicada em pesquisas que visam o entendimento da fisiopatologia de várias doenças. Desta forma, a proteômica clínica pode ser definida como o uso de estratégias proteômicas para responder a questões clínicas e melhorar a prática médica ao nível do diagnóstico, prognóstico ou terapia (HANASH, S., 2003).

A oncoproteômica é um ramo da proteômica que inclui o estudo de proteínas e suas interações nas células tumorais. Há um grande interesse nessa área no sentido de compreender melhor a patogênese do câncer, desenvolver novos biomarcadores tumorais para o diagnóstico e detecção precoce da doença, analisando-se o perfil protéico de amostras biológicas (HANASH, S., 2003). Possui o potencial de revolucionar a prática clínica, incluindo diagnóstico e triagem de câncer baseado em plataformas proteômicas como complemento à histopatologia, seleção individualizada de combinações terapêuticas, avaliação em tempo real da eficácia terapêutica e toxicidade e, finalmente, a modulação racional da terapia com base nas alterações na rede de proteínas do câncer associadas ao prognóstico e a resistência a drogas. (CHO, 2007)

1.6 Espectrometria de Massas (EM)

A espectrometria de massas (EM) é uma técnica analítica que promove caracterização de moléculas por meio da determinação da relação massa/carga (m/z) de íons, que permitiram a identificação e quantificação de milhares de proteínas e peptideos em um fluido biológico ou de um lisado de complexo de células (SCHWAMBORN, K.; CAPRIOLI, R. M. MALDI, 2010). Um espectrômetro de massas consiste: sistema de introdução de amostras que pode ser realizado por cromatografia líquida de diferentes configurações tais como HPLC, nano-LC e UPLC, fonte de geração de íons (MALDI ou Eletrospray (ESI)), analisador de massas (quadrupolo ou tandem qTOF) e detector. A região entre o capilar ou introdutor de amostra, as lentes de realce (DRE) são muito importantes, pois nesta região pode ocorrer a dissociação induzida por colisão (CID). Esta região contém íons formados no ESI e o gás secante (nitrogênio). Como há um campo elétrico, os íons são acelerados provocando a colisão entre estes e as moléculas do gás secante. Assim, por exemplo, se um íon solvatado entrar nesta região ele pode sofrer colisão e perder moléculas do solvente ou até mesmo sofrer processos de rearranjo intramolecular ou fragmentação. (MORAES, 2005). Já a Célula de colisão foi projetada para acoplar uma fonte de íons de alta pressão, tal como uma fonte de eletropulverização a um analisador de massa. (KAPLAN, 2008)

Informações estruturais utilizando espectrometria de massas em tandem são obtidas através da fragmentação da molécula no interior do espectrômetro de massas. Isso requer a habilidade do equipamento em selecionar um íon de m/z específico em um primeiro analisador, fragmentar a molécula através da colisão de um gás neutro (ex. argônio), e analisar os fragmentos gerados em um segundo analisador. Para essa finalidade utilizam-se instrumentos do tipo triploquadrupolo e quadrupolo-TOF (Q-TOF), No Q-TOF, o íon é selecionado no quadrupolo, enviado para uma câmara de colisão e os fragmentos analisados pelo TOF. Acoplamento à espectrometria de massa em tandem nanoESI-MS permite tanto a identificação de proteínas em larga escala quanto aquelas pouco abundantes. (CHANG, 2015). Representação esquemática na figura 3.

As principais diferenças entre os equipamentos de massas se dão na fonte de ionização e no analisador, que conferem a cada

equipamento características específicas com diferentes capacidades resolução, sensibilidade e aplicação. Os estudos proteômicos geralmente envolvem espectrometria de massa de ionização pulverização por nanoelectrospray (MS) e dependem da cromatografia liquida (LC) para a limpeza da amostra e aumentam a faixa dinâmica de análise através da cromatografia de analitos diluídos, separando analitos abundantes e raros (MANN, 2008; QIAN et al, 2014).

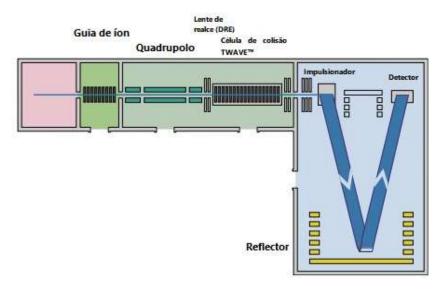
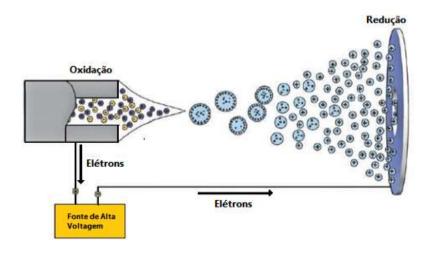


Figura 3 – Esquema de um eletrospray MS qTOF.

Fonte: Modificado de: (Manual qTOF premier- Waters, 2004.)

A ionização por eletrospray envolve a produção de íons através da formação de um spray da solução contendo o analito em um campo elétrico. É uma técnica de ionização considerada branda que possibilita a análise de biomoléculas grandes na sua forma intacta, como proteínas e DNA. O eletrospray cria gotículas carregadas através de um processo de nebulização. O processo de ionização química no ESI ocorre devido à aplicação de um forte campo elétrico que age sobre a superfície da gotícula. (QIAN *et al*, 2014) Esquema representado na figura 4.

Figura 4 – Esquema do processo de ionização de eletrospray.



Fonte: Modificado de - (LANÇAS, 2013)

A EM juntamente com tecnologias para o fracionamento de amostras e análise de dados automatizados, tais como: o software *Proteome Discoverer e MASCOT™* (Matrix Science, EUA) identifica fragmentos das proteínas digeridas analisadas dos espectros de massas. Ele compara os dados brutos da espectrometria de massa com as informações do banco de dados FASTA selecionado, para identificar as diferenças de expressão de proteínas associadas à radiorresistência de células cancerigenas e estabelecer potenciais biomarcadores preditivos da resposta terapêutica (BRANNON, A. R. *et al,* 2010; CHANG, 2015).

Com os avanços nas análises de bioinformática, foi possível obter com maior clareza e compreensão as proteínas e as vias de sinalização celular envolvidas. Softwares online como a Ferramenta de Pesquisa para a Recuperação de Genes Interativos (*STRING™ 10.5. Protein-Protein interaction network*), que realiza redes de interação molecular e *Reactome pathway database*, que realiza a análise das proteínas identificando as respectivas vias biológicas, são utilizados com frequência na busca de biomarcadores e análises dos perfis biológicos celulares (YADAV *et al*, 2017; JUPE *et al*, 2018).

Através da técnica analítica de espectrometria de massas, uma série de marcadores de prognósticos já foram identificados com base na análise comparativa de tumores primários e metastáticos, incluindo proteína C-reativa, tetraspanina 7, proteína induzível de hipóxia 1, proteína de ribonucleoproteína nucleosa pequena fosso-S6, U3, anidrase carbônica IX e densidade microvascular (DUBNSKI, 2011; MASUI, et al 2013). Além disso, foi possível identificar que a maioria das proteínas já encontradas possivelmente estão ligadas à radioresistência, estão involvidas em resposta a antioxidantes, metabolismo energético, chaperonas moleculares e resposta inflamatória (RUXIAN et al, 2009). O Quadro 1 demonstra os possíveis biomarcadores que causam radioresistência relatados na literatura.

Quadro 1 – Possíveis biomarcadores de rádio resistência encontrados na literatura identificados por LC-MS/MS.

Autor	Ano	Linhagem celular	Resultado
WANG et al	2005	MCF-7	†PRDX II
PANKIV et al.	2006	CC531	†GGT
WU et al.	2011	NPC	[†] ERP29
ZHANG et al.	2012	CNE1	†HSPE27
CHANG et al.	2015	Astrocitoma RR	[†] COFILIN1; [†] PGK1
LIN et al	2015	HNC	[†] GP96, Grp78, HSP60, Rab40B e GDF-15

No entanto, até o momento, nenhum biomarcador possui aplicação clínica (SCHULTZ, 2011).

2. Objetivo geral

Analisar o perfil proteico das células de adenocarcinoma renal humano 786-0 após radiação ionizante, buscando biomarcadores de radioresistência.

2.1 Objetivos Específicos

- Verificar qual a melhor dose de radiação ionizante para a linhagem de adenocarcinoma renal humano 786-0 através da curva de radiossensibilidade.
- Analisar o perfil proteico citoplasmático de células irradiadas.

3. METODOLOGIA

3.1 Cultura Celular

Foram utilizadas células da linhagem 786-O (adenocarcinoma renal de células claras humano – com a mutação do gene VHL), adquiridas da ATCC (ATCC® CRL-1932). Essas células foram cultivadas em meio RPMI 1640 contendo 10% de soro fetal bovino (SFB), 300 µg/ml estreptomicina e 100 U/ml penicilina G (RPMI completo). Em seguida, as células foram mantidas em câmara úmida a 37°C e em atmosfera com 5% de CO₂.

Após a confluência de 80-90% as células foram tripsinizadas com solução de tripsina a 0,25% (Trypsin - EDTA (1x) – Canada, EUA) por 10 minutos e em seguida sua ação foi inibida com RPMI completo, centrifugadas por 5 minutos a 1500rpm e a viabilidade celular avaliada por azul de Tripan.

3.2 Ensaio do tempo de dobramento

Para a análise do dobramento celular, as células 786-0 foram semeadas em uma densidade de 5x10³ células por poço em uma placa de 24 poços, em quadruplicata com 2 mL de meio RPMI completo a 37°C em estufa úmida a 5% de CO₂. No dia seguinte, o meio de cultura foi trocado por RPMI 1640 puro (sem soro fetal bovino) e as células permaneceram em privação de soro por 24h. Após este período, o meio foi trocado pelo meio RPMI completo eas células foram contadas nos tempos de 24h, 48h, 72h e 96h a partir da sincronização.

3.3 Curva de radiossensibilidade

As células 786-0 foram semeadas em placas de 60 mm de diâmetro nas densidades de 100, 200, 600, 1000 e 1200 células, em triplicata, com 4 mL de meio RPMI completo. Em seguida, foram mantidas a 37°C, em estufa de CO₂. No dia seguinte, o meio das células foi substituído pelo meio RPMI 1460 puro e em seguida, as células 786-0 foram submetidas à irradiação com ⁶⁰Co administradas pelo GammaCell 220 – Irradiation Unit of Canadian-Atomic Energy Commision Ltd. (CTR IPEN), utilizando a taxa de dose com atenuador de 90% (0,0883 kGy/h – 88,3Gy/h).

Após a irradiação, o meio foi removido e adicionados 4mL de meio RPMI completo e as células foram mantidas à 37°C, em estufa de CO_{2 por} 10 dias. Após esse período, as células foram lavadas com 3 mL de tampão fosfato salino (PBS), fixadas e coradas com 5 mL de metanol 20% e cristal de violeta 0,5%, durante 50 minutos. Em seguida, o corante foi descartado e foram realizadas lavagens com água destilada para retirar o excesso de corante. As colônias com número de células maior ou igual a 50 foram contadas. Os resultados foram expressos com eficiência de plaqueamento (EP) e fração de sobrevida (FS), sendo:

EP =(nº de colônias contadas) / (nº de células semeadas) x 100 FS= nº de colônias contadas em cultura tratada / nº de células semeadas x (EP em cultura controle)

Os valores de fração de sobrevida foram ajustados à equação de crescimento exponencial: Y = e^{-(A-BxX-CxX2)}, onde Y é correspondente aos valores obtidos de frações de sobrevida e X às doses de radiação utilizada. Os coeficientes obtidos após os ajustes foram comparados pelo teste F das somas dos quadrados para comparar-se às regressões obtidas para cada tratamento.

3.4 Extração proteica e dosagem da concentração proteica citoplasmática

Para a extração proteica, foram utilizadas seis placas de células 786-0 não irradiadas e após 24h da irradiação. Para a obtenção da fração proteica citoplasmática, foi utilizado o *Kit* PE Subcellular Proteome Extraction (Merck, S/A- EUA), conforme as instruções do fabricante. A dosagem da concentração protéica citoplasmática foi realizada em microplaca utilizando o kit reagentes A,B e S (Biorad, EUA)e a concentração proteica do homogenato celular foi determinada através de leitura em absorbância de 750 nm em leitor de microplacas *Espectra Max, Molecular Devices*, (SunnyVale, CA, EUA).

3.5 Espectrometria de massas

3.5.1 Digestão tríptica das proteínas citoplasmáticas em solução total Protocolo LNBio (CNPEM)

Para a estabilização das sequências proteicas, foi adicionado uréia 8M (1:1) na solução e para redução, adicionou-se de ditiotreitol (DTT) 5mM seguida de incubação por 30 minutos a 56°C. Após a redução, o DTT foi removido e adicionado para alquilação lodoacetamida (IAA) 14 mM em de bicarbonato de amônio 100mM e mantido por 30 minutos a temperatura ambiente no escuro. A solução IAA após incubação foi descartada e foi adicionado DTT 5 mM e mantido em incubação protegido da luz por 15 minutos. Em seguida, as amostras foram diluídas na proporção de 1:5 com bicarbonato de amônio 50 mM para reduzir a concentração da uréia para 1,6 M. Após redução da uréia, foi adicionado CaCl₂ 1 mM. A digestão das proteínas foi feita com 20 μg de tripsina (Sequencing Grade modified Trypsin, PROMEGA-EUA) em 1000 μL de bicarbonato de amônio 50 mM gelado, sendo a concentração final de 20 ng/ μL. As amostras foram mantidas por 16 horas a 37°C eapós a digestão, foi adicionado ácido trifluoroacético (TFA) 0,4% e verificado o PH ácido de 2,0. Por fim, as amostras foram liofilizadas e armazenadas a -20°C.

3.5.2 Análise em LTQ Orbitrap – Thermo Scientific

Os peptídeos foram separados por gradiente de hidrofobicidade em coluna C18 (100 μ m x 100 mm) (Waters, EUA) por um cromatógrafo tipo *NanoAcquity Ultra Performance LC* (Waters, EUA), acoplado com fonte de nanoeletrospray no espectrômetro de massa *Q-TOF Premier*, (Waters, EUA), do laboratório de Espectrometria de Massa no LNBio (Laboratório Nacional de Biociências), em Campinas – SP. Um volume de 4,5 μ L contendo 2 μ g de peptídeos foram injetados automaticamente, passando primeiramente por uma coluna de *Trappig Symmetry* C18 (180 μ m x 20 mm) para dessalinização dos peptídeos a um fluxo de 5 μ L/min durante 2 minutos. Em seguida, os peptídeos foram carregados para a coluna analítica e eluídos em um gradiente de 2-90% de acetonitrila contendo ácido fórmico a 0,1% durante 60 minutos sob fluxo de 0,6 μ L/min.

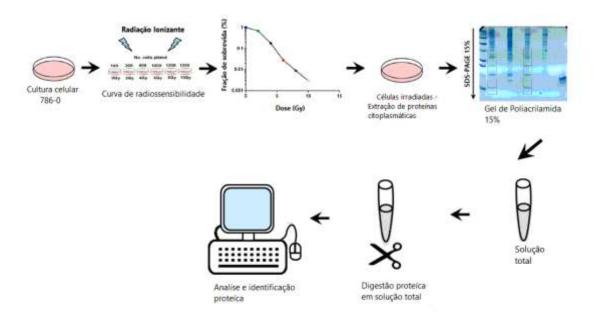
3.5.3 Análise ontológica das proteínas citoplasmáticas

A análise ontológica das proteínas diferencialmente reguladas e das vias presentes após a irradiação foi realizada utilizando a biblioteca *MASCOT* e *Scaffold*, utilizando-se os seguintes parâmetros: taxonomia *Homo sapiens* [humana ID 9606], número máximo de *missedcleavages* igual a 1, modificação fixa de cisteína por carbamidometilação e modificações variáveis por acetilação da porção N-terminal e oxidação da metionina.

3.5.4 Análise Estatística

A avaliação estatística das diferenças entre os grupos controle não irradiado e irradiado foram realizadas pelo *Teste-T de student* do programa Graphpad Prism 6.0 (San Diego, CA).

3.6 - Delineamento experimental



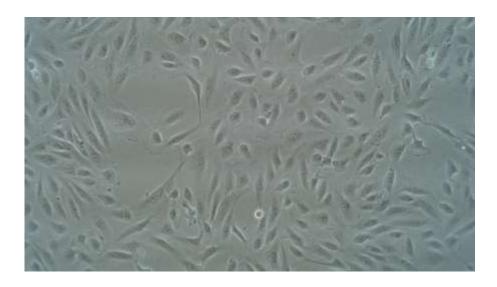
Fonte: Arquivo Pessoal

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Cultura Celular

As células de adenocarcinoma renal humano 786-0 foram cultivadas em monocamada. Após a obtenção de confluência celular de 70-80%, as células foram utilizadas nos ensaios subsequentes. (Figura 5)

Figura 5 – Imagem representativa das células 786-0 em cultura. Células mantidas em condições de normóxia com confluência de 75%.

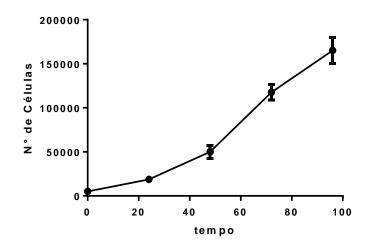


Fonte: Arquivo pessoal.

4.2 Ensaio tempo de dobramento

Para observar a taxa proliferativa das células 786-0 em cultura celular, foi realizado o ensaio de tempo de dobramento. A Figura 6 mostra o perfil de crescimento da linhagem celular de adenocarcinoma renal humano 786-0. O tempo de dobramento celular calculado pelo programa Graphpad Prism 6.0 (San Diego, CA) foi de 19 horas, com valor de correção R² = 0,9264.

Figura 6 - Curva do tempo de dobramento. Obtida após contagem nos períodos de 24h, 48h, 72h e 96h, da linhagem celular 786-0. Cada ponto foi realizado em quadruplicata. Otempo de dobramento calculado foi de 19 horas, com R² = 0,9263.



4.3 Curva de radiossensibilidade

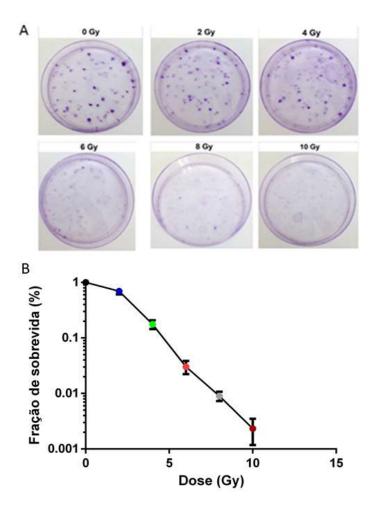
Para verificar a radiossensibilidade, as células foram irradiadas com doses que variaram de 2-10 Gy e, consequentemente, foram obtidos os valores de sobrevivência clonogênica. Na tabela 2 estão descritos todos os dados obtidos nesse ensaio.

Após o ensaio de tempo de dobramento, foi determinado o período de incubação das células para formação de colônias de 10 dias. Na figura 7A podemos observar as colônias sobreviventes após 10 dias de irradiação. Na figura 7B podemos observar a fração de sobrevivência, com doses de 0 a 10 Gys.

Tabela 2 – Ensaio de sobrevivência clonogênico da linhagem celular de adenocarcinoma renal humano, 786-0, após irradiação (2-10 Gy).

Dose (Gy)	Número de células semeadas	Número de colônias celulares contadas Média ±DP	Eficiência de plaqueamento (%)	Fração de sobrevida (%)
0	100	56,3 ± 2,5	56,30	100,00
2	200	77.3 ± 8.5	38,65	68,65
4	600	60,0 ± 10,5	10,00	17,76
6	1.000	16.0 ± 3.6	1,60	2,84
8	1.200	6,0 ± 1,0	0,50	0,89
10	1.200	2,0 ± 1,0	0,17	0,30

Figura 7 – A) Ensaio clonogênico: Avaliação da radiossensibilidade da linhagem celular de adenocarcinoma renal humano 786-0, após irradiação nas doses de 2 a 10 Gys com ⁶⁰Co, administradas pelo GammaCell 220 – Irradiation Unit of Canadian-Atomic Energy Commision Ltd. (CTR IPEN). **B) Curva de radiossensibilidade:** Fração de sobrevida da linhagem celular 786-0 após irradiação com as intensidades de 2-10 Gy.



4.4 Extração e análise do perfil eletroforético das proteínas citossólicas das células 786-0

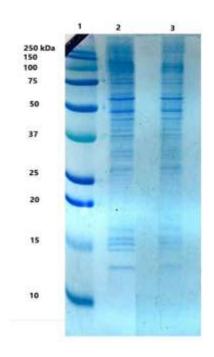
Nos ensaios para análise proteômica, a dose de 10 Gy foi determinado após a curva de radiossensibilidade a dose letal para a linhagem celular 786-0, entretanto, para extração proteica, foi utilizada a dose de 8 Gy, com fração de sobrevida de 0,89%. Para a obtenção das proteínas citossólicas, foi utilizado o PE *subcellular extraction* kit, que realiza extrações proteicas subcelulares, em 1x10⁶, de células, semeadas em placa de petri de 60mm. Para quantificação proteica, foi utilizada uma técnica colorimetrica com base no método de LOWRY utilizando o kit de reagentes A, B e S e a concentração determinada através de leitura em absorbância de 750 nm em leitor de microplacas *Espectra Max, molecular devices*, SunnyVale, (CA, EUA).

O rendimento médio obtido nas extrações das proteínas citossólicas estão representados na Tabela 3. Foi realizado SDS-PAGE 15% para verificação da integridade proteica. Figura 8.

Tabela 3 – Rendimento médio das extrações de proteínas citossólicas de células 786-0 controle e irradiadas com 8 Gy.

Amostras	Concentração (mg/mL) média ± Desvio Padrão		
Controle (N=3)	2,59± 0,07		
8 Gy (N=6)	3,13± 0,67		

Figura 8 - Perfil eletroforético das proteínas citossólicas das células 786-0. Análise da integridade proteica através das bandas do SDS-PAGE 15% corado por *Coomassie Brilliant Blue*: 1 – kit Precision Plus Protein Standards, Kaleidoscope (Marcador de peso molecular); 2 - Amostra de fração proteica do Citossol de células não irradiadas; 3 – Amostra de fração proteica do citoplasma de células irradiadas com 8 Gys.



4.5 Análise em LTQ Orbitrap – Thermo Scientific

4.5.1 Análise das proteínas citosólicas - Qualitativa

As amostras proteicas foram analisadas por LTQ – Thermo no laboratório especial de toxinologia aplicada do Instituto Butantan - USP. Foram encontradas 127 proteínas, sendo 44 nas amostras não irradiadas e 87 nas amostras irradiadas. O resultado gerado foi analisado pelo servidor MASCOT™ para a pesquisa dos peptídeos e análise das funções moleculares de termos Gene Ontology (http://geneontology.org/) para todas as proteínas listadas e pelo site Phosphosite (www.phosphosite.org). (Tabela 4 e 5). Após pesquisa e identificação dos peptídeos, foi realizada a distribuição dos grupos funcionais (Figura 9) e em seguida selecionado os espectros peptídicos.(Figura 10 e 11).

Tabela 4 - -Proteínas totais obtidas das amostras de solução total citoplasmática não irradiada. Peptídeos analisados e identificados funções moleculares de termos *Gene Ontology*, e pelo site *Phosphosite*.

Access Number	RefSeq	Gene	Protein name	Score	Molecular Function (GO; Phosphosite)
Q587J7	NC_000073.6	NCL	Nucleoline	47	RNA binding [GO:0003723]
I6LFJ3	NC_000010.11	RPS25	Ribosomal protein 40S S25	40	RNA binding [GO:0003723]; structural constituent of ribosome [GO:0003735]
A0A087X067	NC_000002.12	PTMA	Prothymosin Alpha	35	STRUCTURAL constituent of eye lens [GO:0005212]
A0A024RAF9	NC_000002.12	C16orf96	Protein not characterized	31	SULFOTRANSFERASE activity; [Phosphosite]
B4DMQ7	NC_000002.12	cDNA FLJ61217,	cDNA FLJ61217, very similar to the regulator of the G 12 protein signaling	30	NADPH binding; [Phosphosite]
LOR5C4	NC_000002.12	HIST1H2BJ	Histone H2B Type 1-J	29	DNA binding [GO:0003677]; protein heterodimerization activity [GO:0046982]
Q0VAS5	NC_000006.12	RPL36A- HNRNPH2	Reading from RPL36A- HNRNPH2	23	STRUCTURAL constituent of ribosome [GO:0003735]
A0A024R5Z9	NC_000015.10	cDNA FLJ60696, muito semelhante ao fator de alongamento 2	cDNA FLJ60696, very similar to elongation factor 2	47	ADP binding; [Phosphosite]
A0A024RAZ7	NC_000012.12	CLTA	Clathrin A Light Chain	35	STRUCTURAL molecule activity [GO:0005198]
B4DL87	NC_000007.14 LDHAL6A L-lactate dehydrogenase type A 6ª			35	L-LACTATE dehydrogenase activity [GO:0004459]
	NC_000010.11	RAD9A	Cell cycle Control Point control protein	17	ACETYLTRANSFERASE activity; [Phosphosite]
Q6FGH5	NC_000017.11	MSRA	Mitochondrial peptide methionine sulfoxide reductase	17	PEPTIDE-METHIONINE (S)- S-oxide reductase activity [GO:0008113]
A0A087WX59	NC_000020.11	RPS21	Ribosomal protein 40S S21	30	ATP binding [GO:0005524]; calmodulin binding [GO:0005516]; calmodulindependent protein kinase activity [GO:0004683]
A0A087WZV3	NC_000012.12	KIF3A Kinesine-type protein		26	ATP binding [GO:0005524]; microtubule binding [GO:0008017]; microtubule motor activity [GO:0003777]

H0YEN5	NC_000016.10	HELZ	Helicase with zinc finger domain 2		HELICASE activity [GO:0004386]; metal ion binding [GO:0046872]	
Q96M91	NC_000018.10	SOWAHA	Protein containing the mastery of anquirin repetition	23	ZINC ION binding [GO:0008270]	
Q14997	NC_000002.12	POTEM	Member of the domain family Putky POT ankyrin M		LYSINE-ACETYLATED histone binding; peptidase activator activity; protein binding; [Phosphosite]	
L8EC92	NC_000001.11	TRIM60	Tripartite protein containing the 60 motif	21	STRUCTURAL constituent of ribosome [GO:0003735]	
A0A087WSW8	NC_000005.10	DLGAP3	Protein 3 associated with DLG	15	AMYLOID-BETA binding [GO:0001540]	
A0A024RD59	NC_000006.12	SNF1LK2	Salt-inducible kinase 2 26		ATP binding [GO:0005524]; magnesium ion binding [GO:0000287]; protein serine/threonine kinase activity [GO:0004674]	
D3DS95	NC_000006.12	AMIGO2	Adhesion molecule with Ig as domain 2	23	N/D	
A1E282	NC_000011.10	ARPINA	Complex inhibitor of 2/3 protein related to actin	22	N/D	
G3V1A4	NC_000011.10	PCNT	Pericentrin	19	MOLECULAR ADAPTOR activity [GO:0060090]	
A0A024R017	NC_000006.12	PS1TP5BP1	Beta actin	39	ATP binding [GO:0005524]	
B4DMC6	NC_000011.10	YWHAZ	Tyrosine 3- monoxygenase/Tryptophan 5- monoxygenase activation zeta protein		MONOOXYGENASE activity [GO:0004497]; protein domain specific binding [GO:0019904]	
F5H793	NC_000012.12	PKM2	Pyruvate kinase M2	19	ADP binding [GO:0043531]; identical protein binding [GO:0042802].	
A0A024R1N1	NC_000022.11	CAMK2A	Calcium-dependent alpha protein kinase II	16	ACTIN binding; [Phosphosite]	
B4DM82	NC_000006.12	ENO1	Alpha-Enolase	33	MAGNESIUM ION binding [GO:0000287]; phosphopyruvate hydratase activity [GO:0004634]	
B4DIT7	NC_000022.11	FLNA	Filamin	96	ACTIN binding [GO:0003779]	
B4DEA6	NC_000022.11	hspB1/hsp27	cDNA FLJ52243 very similar to Heat Shock Protein Beta 1	65	N/D	
A0A248RGE3	NC_000022.11	HEL113	113 Epididymis luminal Protein	41	ACETYLTRANSFERASE activity; [Phosphosite]	
B4DL87	NC_000002.12	VIM	Vimentin	42	STRUCTURAL molecule activity [GO:0005198]	
A6NC78	NC_000015.10	TRAJ56	Joining Alpha T Cell Receptor, 56	38	N/D	

Q9NRC6	NC_000015.10	TUBA1C	Alpha-1C tubulin chain		GTPase activity [GO:0003924]; GTP binding [GO:0005525]; structural constituent of cytoskeleton [GO:0005200]
A0A024R7K9	NC_000019.10	TUBB2B	Tubulin Beta Chain	41	GTPase activity [GO:0003924]; GTP binding [GO:0005525].
F4MHI3	NC_000024.10 cDNA FLJ58286, cDNA FLJ58286, very similar to actin, cytoplasmatic 2		27	ATP binding [GO:0005524]	
H7C1B4	NC_000002.12	PS1TP5BP1	Beta of actin [39	N/D
A0A024RD80	A024RD80 NC_000006.12 AXL Receptor protein tyrosine kinase UFO		16	ATP binding [GO:0005524]; transmembrane receptor protein tyrosine kinase activity [GO:0004714]	
A0A024RB85	NC_000012.12	SALL2	Protein similar to Sal 2	14	NUCLEIC ACID binding [GO:0003676]
A0A024RAQ1	NC_000012.12	POTEI	Family member of the Ankyrin domain POT I	38	DNA-binding; [Phosphosite]
B4DEV8	NC_000011.10	RPS2	40S S2 ribosomal protein	22	PROTEIN binding; [Phosphosite]
B4DL19	NC_000009.12	DPH2L1	cDNA, FLJ94672, very similar to Homo sapiens DPH2-like 1	22	CALCIUM ION binding; [Phosphosite]
P02795	NC_000016.10	RAD9A	Cell cycle Control Point control protein RAD9A	17	PROTEIN binding; [Phosphosite]
C9IZY2	NC_000006.12	SNF1LK2	Salt inducible kinase 2	26	PROTEIN binding; [Phosphosite]

Tabela 5 - Proteínas totais obtidas das amostras de solução total citoplasmática irradiada. Peptideos analisados e identificados funções moleculares de identificados funções moleculares de termos *Gene Ontology, e* pelo site *Phosphosite*.

Access Number	RefSeq	Gene	Protein name	Score	Molecular Function (GO; Phosphosite)
Q587J7	NC_000073.6	TDRD12	Tudor Domain containing 12	19	ATP binding [GO:0005524]; helicase activity [
I6LFJ3	NC_000010.11	KIR3DS1	Immunoglobulin Receptor type killer cell, three domains Ig and short cytoplasmic tail 1	18	MHC class I receptor activity; protein binding; [Phosphosite]
A0A087X067	NC_000002.12	POTEE	Member of the Ankyrin domain family POT E	17	N/D
A0A024RAF9	NC_000002.12	HS6ST1	Heparan sulfate 6-O- sulfotransferase 1	16	SULFOTRANSFERA SE activity [GO:0008146]
B4DMQ7	NC_000002.12	TP53I3	Protein inducible tumor Protein p53 3	15	OXIDOREDUCTASE activity [GO:0016491]
LOR5C4	NC_000002.12	POTEM	Member of the domain family Putky POT ankyrin M	34	ATP binding [GO:0005524]
Q0VAS5	NC_000006.12	HIST1H4H	Histone H4	58	DNA binding [GO:0003677]; protein heterodimerizatio n activity [GO:0046982]
A0A024R5Z9	NC_000015.10	PKM2	Pyruvate kinase M2	47	ADP binding [GO:0043531]; binding [GO:0070324]
A0A024RAZ7	NC_000012.12	HNRPA1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	30	RNA binding [GO:0003723]
B4DL87	NC_000007.14	HSPB1/ HSP27	CDNA FLJ52243, highly similar to Heat-shock protein beta-1	83	N/D
	NC_000010.11	MYST4	Acetyltransferase lysine 6B	32	ACETYLTRANSFER ASE activity; DNA binding; histone acetyltransferase activity; metal ion binding; protein binding; transcription factor binding; [Phosphosite]
Q6FGH5	NC_000017.11	RPL23A	L23a ribosomal protein	30	rRNA binding; protein binding; structural constituent of ribosome; TORC2 complex binding; [Phosphosite]

A0A087WX59	NC_000020.11	ADRM1	Adhesion regulating molecule 1	27	ENDOPEPTIDASE activator activity; protease binding; proteasome binding; protein binding; [Phosphosite]
A0A087WZV3	NC_000012.12	CACNA1C	Calcium voltage dependent channel subunit Alpha1 C	24	VOLTAGE-GATED calcium channel activity [GO:0005245]
HOYEN5	NC_000016.10	RPS2	40S ribosomal subunit protein S2	20	RNA binding [GO:0003723]; structural constituent of ribosome [GO:0003735]
Q96M91	NC_000018.10	CFAP53	Cilia and Flagelin associated with 53 protein	19	PROTEIN binding; [Phosphosite]
Q14997	NC_000002.12	PSME4	Proteasome Activator subunit 4	18	LYSINE- ACETYLATED histone binding [GO:0070577]; peptidase activator activity [GO:0016504]; proteasome binding [GO:0070628]
L8EC92	NC_000001.11	FDPS	Farnesyl diphosphate synthase	15	N/D
A0A087WSW8	NC_000005.10	PCDHA4	Protocadherin Alfa 4	18	CALCIUM ION binding [GO:0005509]
A0A024RD59	NC_000006.12	ІСК	Intestinal cell kinase	15	ATP binding [GO:0005524]; protein serine/threonine kinase activity [GO:0004674]
D3DS95	NC_000006.12	hCG_21173	HCG21173, isoform CRA_a	47	STRUCTURAL constituent of ribosome [GO:0003735]
A1E282	NC_000011.10	B-ACTIN	Beta actin	41	N/D
G3V1A4	NC_000011.10	CFL1	Coophylline 1	44	ACTIN binding [GO:0003779]
A0A024R017	NC_000006.12	HIST1H2AC	Histone Group 1 H2A family member C	26	DNA binding [GO:0003677]; protein heterodimerizatio n activity [GO:0046982]
B4DMC6	NC_000011.10	cDNA FLJ60696, similar ao Fator de elongamento 2	cDNA FLJ60696, similar to elongation factor 2	21	GTPase activity [GO:0003924]; GTP binding [GO:0005525]; translation elongation factor activity [GO:0003746]

F5H793	NC_000012.12	LDHB	Lactate dehydrogenase B	25	OXIDOREDUCTASE ACTIVITY, acting on the CH-OH group of donors, NAD or NADP as acceptor [GO:0016616]
A0A024R1N1	NC_000022.11	МҮН9	Heavy chain of myosin 9	32	ACTIN FILAMENT BINDING [GO:0051015]; ATP binding [GO:0005524]
B4DM82	NC_000006.12	PPlase	Peptidyl Prolyl CIS/trans Isomerases	21	PEPTIDYL-PROLYL CIS-TRANS ISOMERASE ACTIVITY [GO:0003755]
B4DIT7	NC_000022.11	cDNA FLJ58187, similar a Protein-glutamine gamma- glutamyltransferase 2(EC 2.3.2.13)	cDNA FLJ58187, similar to Protein-Glutamine gamma- glutamyltransferase 2 (EC 2.3.2.13)	21	METAL ION BINDING [GO:0046872]; protein-glutamine gamma- glutamyltransferas e activity [GO:0003810]
B4DEA6	NC_000022.11	cDNA FLJ56566, highly similar to Small glutamine- rich tetratricopeptiderepeat- containing protein A	cDNA FLJ56566, highly similar to Small glutamine- rich tetratricopeptiderepeat- containing protein A	19	N/D
A0A248RGE3	NC_000022.11	RBS	40S ribosomal protein (Fragment)	15	STRUCTURAL CONSTITUENT OF RIBOSOME [GO:0003735]
B4DL87	NC_000002.12	cDNA FLJ52243, highly similar to Heat-shock protein beta-1	cDNA FLJ52243, highly similar to Heat-shock protein beta-1	21	N/D
A6NC78	NC_000015.10	GOLGA8IP	A86 family member Golgin A8, pseudogene	29	N/D
Q9NRC6	NC_000015.10	SPTBN5	Beta Spectrin, non- erythrocytic 5	18	ACTIN BINDING [GO:0003779]; dynactin binding [GO:0034452]; dynein intermediate chain binding [GO:0045505]; KINESIN BINDING [GO:0019894]
A0A024R7K9	NC_000019.10	SSBP4	Single-stranded DNA- binding protein 4	18	SINGLE-STRANDED DNA BINDING [GO:0003697]
F4MHI3	NC_000024.10	UTY	A repeated ubiquically transcribed tetratricopeptide containing, linked in Y	15	HISTONE DEMETHYLASE ACTIVITY (H3-K27 specific) [GO:0071558]; metal ion binding [GO:0046872]
H7C1B4	NC_000002.12	GCKR	Glucokinase Regulator	14	CARBOHYDRATE DERIVATIVE BINDING [GO:0097367]

A0A024RD80	NC_000006.12	HSP90AB1	Thermal shock protein 90 class B members of the Alpha family	14	ATP binding [GO:0005524]; CTP binding [GO:0002135]; dATP binding [GO:0032564];]
A0A024RB85	NC_000012.12	PA2G4	2G4 associated with proliferation	15	DNA binding; DNA-binding transcription factor activity; protein binding; ubiquitin protein ligase binding; [Phosphosite]
A0A024RAQ1	NC_000012.12	CSDA	Sulfossulfate of cysteine Desulfinase	20	DNA-binding transcription repressor activity, RNA polymerase II- specific [GO:0001227]; mRNA 3'-UTR binding [GO:0003730]
B4DEV8	NC_000011.10	PSMA1	Alpha Proteasome subunit 1	53	ENDOPEPTIDASE ACTIVITY [GO:0004175]; threonine-type endopeptidase activity [GO:0004298]
B4DL19	NC_000009.12	ANXA1	A1 Annexina	43	CALCIUM- DEPENDENT PHOSPHOLIPID BINDING [GO:0005544];
P02795	NC_000016.10	MT2A	Metallothieine 2A	33	DRUG BINDING [GO:0008144]; metal ion binding
C9IZY2	NC_000006.12	BTN2A2	Subfamily Butyrophilin 2 member A2	16	PROTEIN BINDING; [Phosphosite]
A0A024R4F1	NC_000001.11	ENO1	Alpha-Enolase	47	MAGNESIUM ION BINDING [GO:0000287]; phosphopyruvate hydratase activity [GO:0004634]
A0A087WWY3	NC_000023.11	FLNA	Filamin	29	ACTIN BINDING [GO:0003779]
V9HWE1	NC_000010.11	HEL113	113 Epididymis luminal Protein	18	STRUCTURAL CONSTITUENT OF EYE LENS [GO:0005212]
A0A1B0GTT5	NC_000010.11	VIM	Vimentin	42	STRUCTURAL MOLECULE ACTIVITY [GO:0005198]
A0A075B6Z2	NC_000014.9	TRAJ56	Joining Alpha T Cell Receptor, 56	37	N/D
A0A024QZU2	NC_000006.12	TUBB2B	Tubulin Beta Chain	24	GTPase activity [GO:0003924]; GTP binding

					[GO:0005525]; structural constituent of cytoskeleton
					[GO:0005200]
A0A075B724	NC_000010.11	TUBB8	Tubulin Chain Beta-8	16	GTPase activity [GO:0003924]; GTP binding [GO:0005525]; structural constituent of cytoskeleton [GO:0005200]
8EC92	NC_000001.11	FDPS	farnesyl diphosphate synthase	15	METAL ION BINDING; [Phosphosite]
A0A024RB85	NC_000012.12	PA2G4	Isoform associated with proliferation 2G4, 38kDa	23	DNA binding; DNA- binding transcription factor activity; protein binding; ubiquitin protein ligase binding; [Phosphosite]
E9PG15	NC_000002.12	YWHAQ	14-3-3 Protein Theta	21	PROTEIN DOMAIN SPECIFIC BINDING [GO:0019904]
A0A024R326	NC_000003.12	RPL29	Ribosomal protein 60S L29	19	STRUCTURAL CONSTITUENT OF RIBOSOME [GO:0003735]
A0A024RB31	NC_000012.12	MYL6B	Myosin, mild polypeptide 6B, alkali, smooth muscle and non-muscle	24	CALCIUM ION BINDING [GO:0005509]
D3DQ69	NC_000001.11	SERBP1	SERPINE1 mRNA binding protein	23	mRNA 3'-UTR binding [GO:0003730]
A0A087WVQ9	NC_000006.12	EEF1A1	Elongation factor 1-alpha 1	20	GTPase activity [GO:0003924]; GTP binding [GO:0005525]
A0A248RGE3	NC_000023.11	RPL10	Ribosomal protein 40S	15	PROTEIN BINDING; [Phosphosite]
A0A1W2PQM2	NC_000012.12	TUBA1C	Alpha-1C tubulin chain	30	GTPase activity [GO:0003924]; GTP binding [GO:0005525]; structural constituent of cytoskeleton [GO:0005200]
H0YFG2	NC_000012.12	FKBP4	Peptidil-Prolil cis-trans isomerase FKBP4	26	FK506 binding [GO:0005528]; heat shock protein binding [GO:0031072]; peptidyl-prolyl cis- trans isomerase activity [GO:0003755]
A0A087WUM2	NC_000011.10	LDHAL6A	L-lactate dehydrogenase	25	L-LACTATE DEHYDROGENASE

					ACTIVITY [GO:0004459]
A0A024R2Q4	NC_000003.12	RPL15	L15 ribosomal protein	25	STRUCTURAL CONSTITUENT OF RIBOSOME [GO:0003735]
D0PNI1	NC_000008.11	YWHAZ	Epididymis 4 luminal Protein	25	MONOOXYGENAS E ACTIVITY [GO:0004497]; protein domain specific binding [GO:0019904]
A0A024QZD1	NC_000019.10	RPL18	L18 ribosomal protein	24	STRUCTURAL CONSTITUENT OF RIBOSOME [GO:0003735]
Q5JXB2	NC_000023.11	UBE2NL	Putative enzyme conjugation of ubiquitin E2N	23	UBIQUITIN conjugating enzyme activity [GO:0061631]
Q86YZ3	NC_000001.11	HRNR	Hornerina	23	CALCIUM ION BINDING; transition metal ion binding; [Phosphosite]
A8K3K1	NC_000015.10	cDNA FLJ78096, muito semelhante à actina de Homo sapiens, alfa, músculo cardíaco (ACTC), mRNA	cDNA FLJ78096, very similar to the actin of Homo sapiens, alpha, cardiac muscle (ACTC), mRNA	21	ATP binding [GO:0005524]
B2RDY9	NC_000003.12	ADCY	Adenylate cyclase- associated protein	22	N/D
J3KQV8	NC_000021.9	SYNJ1	Synaptojanin-1	20	EH DOMAIN BINDING [GO:1990175]; inositol-1,4,5- trisphosphate 5- phosphatase activity [GO:0052658];
A0A024QZZ7	NC_000006.12	HIST1H2BD	Histone H2B	19	DNA binding [GO:0003677]; protein heterodimerizatio n activity [GO:0046982]
A0A024R6T4	NC_000016.10	MT1M	Metallothionein	18	METAL ION BINDING [GO:0046872]
Q9BSV4	NC_000001.11	SFPQ	SFPQ protein	18	RNA binding [GO:0003723]
C9J5W6	NC_000003.12	TAGLN3	Transgelin-3	16	ACTIN FILAMENT BINDING; [Phosphosite]
A0A024RAF9	NC_000002.12	HS6ST1	Heparan-Sulfate 6-O- sulfotransferase	16	SULFOTRANSFERA SE ACTIVITY; [Phosphosite]
B4DMQ7	NC_000002.12	TP53I3	Protein-induced tumor protein p53	15	NADPH binding; NADPH:quinone reductase activity; protein homodimerization

					activity; quinone binding
H7C1B4	NC_000002.12	GCKR	Glycinase regulating protein	14	FRUCTOSE-6- PHOSPHATE BINDING; protein binding; [Phosphosite]
A0A024RD59	NC_000006.12	ICK	Intestinal cell (MAK-like) kinase	15	ATP binding; magnesium ion binding; protein binding; protein kinase activity; protein serine/threonine kinase activity
B4DEW1	NC_000006.12	FUT9	Fucosyltransferase	27	ALPHA-(1->3)- FUCOSYLTRANSFE RASE ACTIVITY; fucosyltransferase activity; [Phosphosite]
B4DRY1	NC_000004.12	cDNA FLJ54428, muito semelhante à SLIT e à proteína tipo NTRK 1	cDNA FLJ54428, very similar to SLIT and NTRK type 1 protein	19	N/D
H0Y942	NC_000005.10	FAM81B	FAM81B protein	18	PROTEIN BINDING; [Phosphosite]
C9IZY2	NC_000006.12	BTN2A2	Subfamily Butirofilina 2 members A2	16	PROTEIN BINDING; [Phosphosite]
H0Y5P4	NC_000010.11	MLLT10	Cofactor DOT1L of histone lysine methyltransferase	15	CHROMATIN BINDING; DNA binding; DNA- binding transcription factor activity;

Figura 9 – Gráfico representativo do percentual das proteínas citossólicas obtidas de amostras de solução total irradiadas e não irradiadas. A) Distribuição das proteínas em grupos funcionais - amostras não irradiadas. B) Distribuição das proteínas em grupos funcionais - amostras irradiadas.



Tabela 6 – Grupos funcionais identificados nas proteínas citossólicas obtidas de amostras não irradiadas e irradiadas.

Não Irradiado		Irradiado		
Função		Função		
Antioxidantes	3,33%	Antioxidantes	5,12%	
Chaperonas moleculares	0,00%	Chaperonas moleculares	5,12%	
Síntese proteica e estrutura	47%	Síntese proteica e estrutura	35,89%	
Resposta anti-inflamatória	0,00%	Resposta anti-inflamatória	2,56%	
Metabolismo celular e energético Migração, Proliferação e Invasão	16,66%	Metabolismo celular e energético Migração, proliferação e Invasão	21%	
celular Interação proteína-proteína e	16,66%	celular Interação proteína-proteína Sinalização	21%	
Sinalização celular	16,66%	celular	5,12%	
Edopeptidases	0,00%	Endopeptidases	5,12%	

Como observado na tabela 6, nas amostras não irradiadas foram identificadas proteínas pertencentes à 5 grupos funcionais. Já, nas do grupo irradiado observouse 8 grupos. As proteínas mais abundantes tanto nas amostras não irradiadas (47%), quanto nas irradiadas (35,89%), apresentaram atividade funcional ligada à o de síntese proteica e estrutura celular. Em uma análise global da tabela 6 podemos observar que após 24h de irradiação houve um aumento da representatividade de proteínas antioxicidantes, das ligadas ao metabolismo celular e energético, bem como daquelas envolvidas com a migração, proliferação e invasão celular. Somente

nas amostras irradiadas foram observadas proteínas dos grupos funcionais chaperonas, resposta anti-inflamatória e endopeptidases.

Após identificação dos peptídeos, os espectros dos peptídeos que obtiveram score acima de 40 foram analisados. Espectros analisados na figura 10 (Não irradiado – 9 peptídeos) e 11 (Irradiado – 12 peptídeos).

Figura 12 – Espectros das proteínas do grupo não irradiado selecionadas pelo score peptídico acima de 40, após análise por espectrometria de massas – LTQ. A) Espectro da proteína Nucleonina (NCL), com score peptídico de 47. B) Espectro da proteína Subunidade delta de proteína do complexo T, com score peptídico de 41. C) Espectro da proteína ribossômica 40S S25 - RPS25, com score peptídico de 40. D) Espectro da proteína luminal do Epidídimo 113 – HEL113, com score peptídico de 41. E) Espectro da proteína Prothomosina alfa – PTMA, com score peptídico de 55. F) Espectro do cDNA FLJ52243 semelhante a proteína *Heat Shock* beta 1, com score peptídico de 69. G) Espectro da proteína Membro da família do domínio ankyrin POTE I – POTEI, com score peptídico de 41. H) Espectro da proteína Filamina A – FLNA, com score peptídico de 96. I) Espectro da cDNA semelhante ao fator de enlongamento 2 – EEF2, com score peptídico de 47.

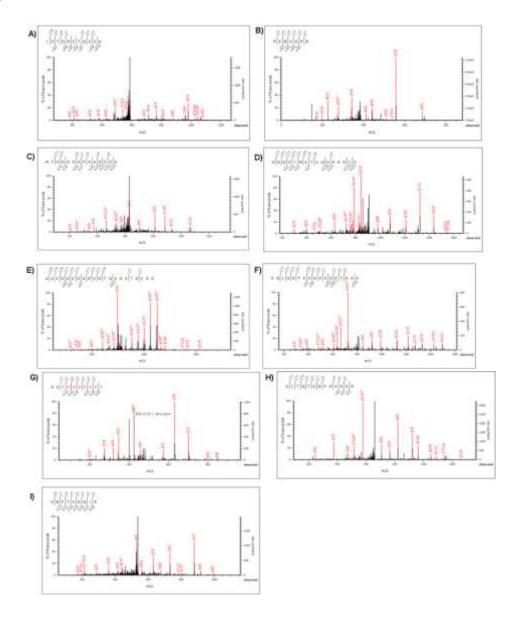
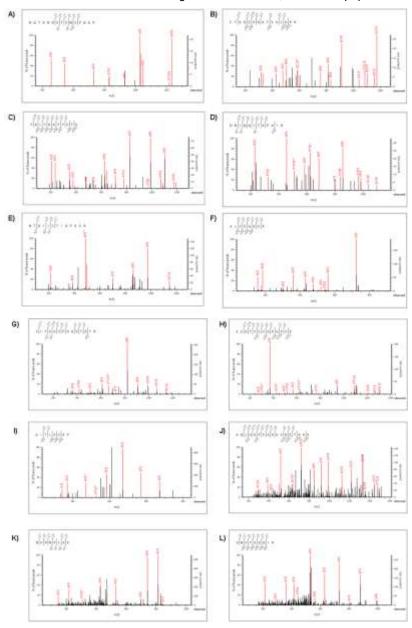


Figura 13 – Espectros das proteínas do grupo irradiado selecionadas pelo score peptídico acima de 40, após análise por espectrometria de massas – LTQ. A) Espectro da proteína Subunidade do proteassoma tipo alfa - PSMA1, com score peptídico de 53. B) Espectro da proteína HCG21173, com score peptídico de 47. C) Espectro da proteína cofilina 1 – CFLN1, com score peptídico de 44. D) Espectro da proteína Histona 4H- HST1H4H, com score peptídico de 58. E) Espectro da proteína Piruvato quinase 2 – PKM2, com score peptídico de 47. F) Espectro da proteína Anexina – ANXA, com score peptídico de 43. G) Espectro da proteína Vimentina – VIM, com score peptídico de 42. H) Espectro do cDNA FLJ58187 semelhante a proteína gama-glutamil glutamiltransferase, com score peptídico de 41. I) Espectro do receptor alfa de células T juntando 56 - TRAJ56, com score peptídico de 40. J) Espectro do cDNA FLJ52243 semelhante ao Heat Shock protein beta 1, com score peptídico de 83. K) Espectro da proteína Enolase 1 – ENO1, com score peptídico de 47. L) Espectro do cDNA FLJ60696, muito semelhante ao fator de alongamento 2 – EEF2, com score peptídico de 45.



As proteínas que obtiveram um score peptídico acima de 40 no grupo irradiado foram: ENO1 (47 kDa); A VIM (53 kDa)/ HEL113; PSMA1; TRAJ56; hCG; Cofilina-1 (19 kDa); HIST1H4H; PKM2; ANXA1; HSPB1/ HSP27.

4.5.2 Seleção da proteína pela atividade biológica.

Após a análise das proteínas, interligações entre os grupos e funções biológicas, foi selecionado a proteína Subunidade alfa do proteassoma, tipo 1 (PSMA1). A PSMA1 possui uma atividade molecular de endopeptidase e o processo biológico está relacionado diretamente com o sistema imune. Estudos demonstram que as PSMAs participam do processo de progressão maligna dos cânceres (YUNHAI, 2017). A PSMA1 foi encontrada nas amostras irradiadas, com um score peptídico de 53. A figura 11 demonstra o espectro com os picos encontrados da fragmentação peptídica indicando a presença da proteína na amostra irradiada, e a tabela 7 demonstra os dados brutos obtidos através da análise do espectro.

Figura 14 – Espectro da proteína Subunidade alfa do proteoma, tipo 1, (PSMA1), selecionada após análise por espectrometria de massas – LTQ.

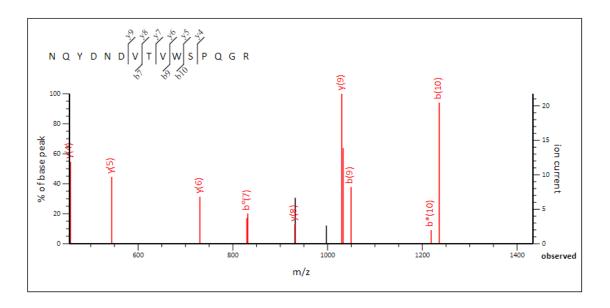


Tabela 7 – Dados obtidos a partir do espectro dos fragmentos de peptídeos correspondentes à proteína – Subunidade alfa do proteassoma, tipo 1; gene PSMA1.

Proteína	Gene	Score	Mr(calc)	Delta	Sequência
Subunidade alfa do proteassoma,					
tipo 1	PSMA1	52.9	1777.8020	0.0057	NQYDNDVTVWSPQGR

5. Discussão

O carcinoma de células renais tem sido tradicionalmente considerado intrinsecamente radioresistente, entretanto, os mecanismos moleculares específicos responsáveis por tal radioresistência não estão elucidados. Nesse trabalho analisou-se o perfil de proteínas citossólicas da linhagem celular de adenocarcinoma renal humano 786-0, visando a obtenção de dados que possibilitassem um melhor entendimento desses mecanismos.

De acordo com a literatura, a radiossensibilidade está associada à atividade mitótica celular, determinando o tempo de formação de colônias celulares. A análise da cinética de crescimento *in vitro* das células 786-0 relevou um tempo de dobramento de 19h (não foram 19h?), valor este, próximo ao apresentado por Lobo N.C. *et al (2016)* que foi de 19h. Este tempo revela que as células 786-0 possuem alto potencial mitótico.

A curva de radiossensibilidade permite introduzir parâmetros que ajudam no entendimento dos efeitos radiobiológicos, que no contexto radiológico, pode definir uma dose terapêutica na qual ocorrem 50% ou mais de morte das células tumorais. No ensaio clonogênico, a dose única de 10 Gy foi suficiente para a morte de mais de 95% das células tumorais. Entretanto, para a extração proteica, utilizamos a dose de 8 Gys, com fração de sobrevida de 0,89%. Braunstein *et al* (2009) fizeram um tratamento com 8 Gys nas células MCF10A e realizaram posteriormente a extração proteica, corroborando com esse trabalho. Palayoor *et al* (2004) realizaram a curva de radiossensibilidade para a linhagem 786-0, utilizaram a dose de 8 Gys e sucessivamente extração proteica após 24h de irradiação, corroborando com este trabalho.

Na análise por Orbitrap, foi possível identificar um perfil de proteínas com funções biológicas distintas. As proteínas citossólicas totais foram utilizadas para uma análise qualitativa. Foram identificadas 127 proteínas, destas, 44 nas amostras não irradiadas e 83 nas amostras irradiadas. Dentre as proteínas identificadas, foram analisadas proteínas com função antioxidantes; chaperonas; endopeptidase; interação proteína-proteína e sinalização celular; metabolismo celular e energético; Adesão; migração, proliferação e invasão celular; síntese proteica e estrutura; e resposta anti-inflamatórias. Kim *et al* (2015), fizeram também uma análise proteômica por LCMS-MS a partir de células de câncer de

mama, após irradiação com dose de 10 Gy, encontraram proteínas que possuem atividade biológica de metabolismo, migração, sistema imune e sinalização celular, corroborando com este trabalho. Yentrapalli *et al* (2013), submeteram à irradiação células endoteliais da veia umbilical e verificaram a presença de proteínas com atividade biológica em processos metabólicos, sistema imune, antioxidantes e processos celulares incluindo adesão celular, compartimento celular organização e sinalização celular, corroborando com este trabalho.

As proteínas que obtiveram um score peptídico acima de 40 no grupo irradiado são: ENO1 (47 kDa) que é uma enzima citoplasmática abundante com atividade 2-fosfo-D-glicerato hidrolase, tem função molecular de ligação a GTPase; ligação ao ion magnésio; atividade da hidratase de fosfopiruvato; ligação protéica; atividade de homodimerização de proteína, e participa dos processos biológicos de gliconeogênese; regulação negativa do crescimento celular, regulação negativa da transcrição do promotor de RNA polimerase II, regulação negativa da transcrição e regulação positiva do processo biossintético Estudos demonstram que a enolase 1 (ENO1) possui atividade de ATP. oncogênica e muitas vezes é superexpressa em vários cânceres humanos, além de seu papel crítico na glicólise. (ZHAN, 2015). A VIM (53 kDa)/ HEL113, é uma proteína de filamento intermediário envolvida no desenvolvimento de astrócitos; Diferenciação de células gliais de Bergmann; resposta celular ao interferon gama; via de sinalização mediada por citocinas; organização de filamentos intermediários; regulação positiva do processo biosinstético de colágeno; regulação positiva da tradução e regulação da estabilidade do mRNA. Tanaka et al (2016) verificaram em células de câncer de mama que a coexistência da expressão vimentina é um fator de prognóstico pobre para câncer de mama primário e que pode contribuir para o fenótipo agressivo no câncer de mama. Lu e colaboradores (2017) verificaram que a VIM e CEPB4 interagem juntas e o CEPB4 promove a migração e invasão celular via expressão positiva da Vimentina no câncer de mama. Subunidade alfa do proteoma tipo 1 - O PSMA1, é um componente do complexo proteassoma do núcleo 20S envolvido na degradação proteolítica da maioria das proteínas intracelulares. Esse complexo desempenha inúmeras funções essenciais dentro da célula e para tanto, associa-se a diferentes moléculas reguladoras. Associado ao ativador do proteassoma PA200 ou PA28, o proteassoma 20S medeia a degradação

proteica independente da ubiquitina. Este tipo de proteólise é necessário em várias vias, incluindo a espermatogênese (complexo 20S-PA200) ou a geração de um subconjunto de peptídeos antigênicos apresentados pelo MHC classe I (complexo 20S-PA28). A TRAJ56 é um receptor de células T reconhecem antígenos estranhos que foram processados como pequenos peptídeos e ligados a moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) na superfície de células apresentadoras de antígeno (APC). A Gonadotrofina coriônica humana (hCG), desemprenha um papel na transformação celular, angiogenesis, mestatização e fuga imunológica. (SISINNI, 2015). Cofilina-1 é uma isoforma de 19 kD, não muscular da proteína reguladora da actina que pertence à família da fator de despolimerização de actina (ADF) / cofilina A função primária da cofilina-1 é acelerar o turnover da actina via separação dos filamentos de actina ou despolimerização da actina ligada ao ADP na extremidade pontiaguda dos filamentos de actina. A cofilina-1 é essencial para a progressão do ciclo celular, migração, intravasão e invasão de células tumorais (OSTROWSKA,2017).

A Piruvato quinase M2 (PKM2) é uma das quatro isoenzimas da PK, que se expressa universalmente em células de proliferação rápida, como células embrionárias e células cancerígenas. Nos últimos anos, cada vez mais pesquisas sugerem que o PKM2 desempenha um papel crucial na progressão do câncer através de vias metabólicas e não metabólicas. Por um lado, o produto médio da glicólise como aminoácidos, nucleotídeos e lipídios é necessário para o rápido crescimento das células cancerígenas. Por outro lado, o PKM2 suporta o crescimento de tumores através da regulação da expressão de genes envolvidos na proliferação celular, migração e apoptose (WONG,2015).

A ANXA1 é uma proteína imunorreguladora com diversas funções no sistema imunológico e em câncer. Vários estudos demonstram que a alta expressão de ANXA1 no câncer de mama leva a um mau prognóstico e metástase por ser um modulador da inflamação (NIINIRVITA, 2017). A gamaglutamil transferase (GGT) é uma enzima ligada à membrana que cataboliza a glutationa reduzida em cisteína e glicina no ciclo γ- glutamil de Meisler. Isto fornece cisteína para a síntese intracelular de glutationa, o principal anti-oxidante tiol. Níveis séricos elevados de GGT são marcadores de estresse oxidativo. Há evidências de que a GGT é desregulada em células malignas e, ao produzir

espécies reativas de oxigênio, provoca a progressão do tumor em direção a fenótipos mais agressivos associados a um pior prognóstico (GAMAGE, 2013).

As proteínas de choque térmico (Hsps) são superexpressas em uma ampla gama de cânceres humanos e estão implicadas na proliferação. diferenciação, invasão, metástase, morte e reconhecimento de células tumorais pelo sistema imunológico. A principal função da HSPB1/ HSP27 é fornecer termotolerância in vivo, citoproteção e suporte à sobrevivência celular sob condições de estresse. Também está envolvida na via sinalização apoptótica (CHATERJEE, 2017).O fator de elongação eucariótica 2 (eEF2) é uma proteína que desempenha um papel essencial no passo de alongamento da cadeia polipeptídica. As células controlam os níveis de tradução no passo de alongamento através da regulação da atividade de eEF2 sob múltiplas condições biológicas, como progressão do ciclo celular. Alguns estudos demonstram que o eEF2 foi superexpresso nos tumores gástricos e colorretais e promove progressão na fase G2/M do ciclo celular (WANG, 2017)

Após a análise da atividade biológica das proteínas obtidas nas amostras irradiadas, foi selecionada a proteína Subunidade alfa do proteoma - tipo 1. Atualmente, vários estudos demonstraram que a Subunidade alfa do proteomatipo 1 é um potencial biomarcador por causar o progresso maligno celular. Segundo Yunhai et al (2017), demonstraram que há um aumento da expressão de PSMA1 em tumores renais, cérebro, cabeça e pescoço; próstata, Pâncreas, Melanoma e mieloma. A expressão de PSMA1 foi maior em CCRcc do que em células normais. Segundo Mairinger et al (2014), houve um aumento significativo da expressão da PSMA1 em tumores neuroendócrinos pulmonares. Kyle et al (2013) realizaram a irradiação de camundongos com xenoenxertos NCI-H460 após silenciamento induzido com shRNA PSMA1 e mostraram um aumento significativo da sobrevida murina em comparação com qualquer tratamento isolado. Eles demonstram que a inibição do proteassoma é uma estratégia promissora para a radiossensibilização de células do câncer de pulmão não pequenas (NSCLC) pela inibição da expressão mediada por NF-кВ. Chen et al (2017), relataram que células tumorais mostram dependência aumentada do proteassoma para sua sobrevivência, crescimento e disseminação.

6. Conclusão

- O protocolo de irradiação e extração de proteínas foi adequado para o estudo com as células 786-0. Levando-se em consideração a fração de sobrevida de 0,86% após a irradiação com 8Gy, obteve-se um produto proteico de boa qualidade e quantidade.
 - O número de sequências encontradas nas análises por LTQ 44 proteínas nas amostras não irradiadas e 87 nas amostras irradiadas, foi baixo quando comparado com dados da literatura.
- Após o refinamento dos dados, utilizando-se apenas as sequências com score acima de 40 resultou em Foram observados em 9 peptídeos no grupo não irradiado (Nucleonina (NCL), Subunidade delta de proteína do complexo T (CCT4), proteína ribossômica 40S S25 (RPS25), Proteína luminal do epidídimo 113 (HEL 113), Prothomosina alfa (PTMA), espectro do cDNA FLJ52243 semelhante à proteína heat shock beta 1, proteína membro da família do domínio ankyrin POTE I (POTEI), proteína Filamina A (FLNA) e espectro da cDNA semelhante ao fator de enlongamento 2 (EEF2). e 12 peptídeos no grupo irradiado (subunidade do proteassoma tipo alfa -PSMA1, proteína HCG21173, proteína cofilina 1 – (CFLN1), espectro da proteína Histona 4H- (HST1H4H), proteína Piruvato quinase 2 – (PKM2), proteína Anexina - (ANXA), proteína Vimentina (VIM), espectro do cDNA FLJ58187 semelhante a proteína gama-glutamil glutamiltransferase, espectro do receptor alfa de células T juntando 56 (TRAJ56), espectro do cDNA FLJ52243 semelhante ao Heat Shock protein beta 1, espectro da proteína Enolase 1 – ENO1 e espectro do cDNA FLJ60696, muito semelhante ao fator de alongamento 2 (EEF2).
- A comparação do percentual das proteínas totais das amostras irradiadas em relação às não irradiadas de acordo com a função, foi observada uma diminuição de proteínas relacionadas com a síntese proteica e estrutura e de interação proteína-proteína e sinalização celular. Além disso, houve um aumento de proteínas antioxidantes, relacionadas com chaperonas moleculares, resposta anti-inflamatória, metabolismo celular e energético, migração, proliferação e invasão celular e endopeptidase.

 Após a análise das proteínas de acordo com a função biológica, foi selecionada a proteína da Subunidade alfa do proteassoma, tipo 1 (PSMA1), que possui potencial como biomarcador de câncer renal e está envolvido com o progresso maligno celular.

Desta forma, com a análise do perfil da linhagem celular humana de adenocarcinoma renal (786-0) após irradiação a 8 Gy, houve a identificação de proteínas ligadas à radioresistência do CCR. Entretanto, a validação desses resultados se faz necessária.

7. Referências Bibliográficas

BASKAR, R. et al. Biological response of cancer cells to radiation treatment. **Molecular biosciences,** v. 1, n. 24, p.111-222, jan. 2014.

BHATT, R.S. Hypoxia inducible factor-2α: Effect on radiationsensitivity and differential regulation by an mTOR inhibitor. **BJU Int**. 102, 358-363. 2008

BLANCO, A. I *et al.* Role of radiation therapy in the management of renal cell cancer. **Cancers**, v. 3, p. 4010-4023, 2011.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRANNON, A. R.; *et al* Molecular stratification of clear cell renal cell carcinoma by consensus clustering reveal distinct subtypes and survival patterns. **Genes & Cancer**, v. 1, n. 2, p. 152-163, 2010.

BRAUNSTEIN, S. et al. Regulation of Protein Synthesis by Ionizing Radiation. **Molecular and cellular biology**, New York, v. 29, n. 21, p. 5645–5656, nov. 2009.

BUCH *et al.* Determination of cell survival after irradiation via clonogenic assay versus multiple MTT Assay - A comparative study. **Radiation Oncology**, 7:1, 2012

CASTILLO-TONG, D. C. *et al.* Association of myeloperoxidase with ovarian cancer. **Tumour Biol.**; 35(1): 141–148, 2014.

CHANG, L. et al. Identification of protein biomarkers and signaling pathways associated with prostate cancer radioresistance using label-free lc-ms/ms proteomic approach. **Scientific reports** |, v.00, p. 7:41834, jan. 2017.

CHATTERJEE S., BURNS T.F. Targeting Heat Shock Proteins in Cancer: A Promising Therapeutic Approach. **Int J Mol Sci**. 15;18(9). 2017.

CHEN, J. et al. M2 regulates viability and apoptosis in human colorectal cancer cells via the PI3K/Akt pathway. **OncoTargets and Therapy**, 10 811–817, 2017

CHEN, Y., ZHANG, Y., & GUO, X. Proteasome dysregulation in human cancer: implications for clinical therapies. **Cancer and Metastasis Reviews**, 36(4), 703–716. 2017.

CHENG, J. *et al.* Downregulation of Peptidylprolyl isomerase A promotes cell death and enhances doxorubicin-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma. **Gene** 591, 236–244, 2016.

CHO WC. Contribution of oncoproteomics to cancer biomarker discovery. **Molecular cancer**, 6:25, 2007

CRON KR, ZHU K, KUSHWAHA DS, et al. Proteasome inhibitors block DNA repair and radiosensitize non-small cell lung cancer. **PLoS One**. 2013;8(9):e73710. 2013

DUBINSKI W., *et al* Assessment of the prognostic significance of endoglin (CD105) in clear cell renal cell carcinoma using automated image analysis. **Human Pathology**. 43, 1037–1043, 2011.

FROSE, J. *et al.* Epithelial-Mesenchymal Transition Induces Podocalyxin to Promote Extravasation via Ezrin Signaling. **Cell Reports** 24, 962–972, 2018.

FRYDENBERG M, *et al.* Cancer of the kidney, renal pelvis, and ureter. **H J Urol**, p. 1403–1404, 152(1):15-21, 2008.

FUKS Z; KOLESNICK R. Engaging the vascular component of the tumor response. **Cancer Cell**; 8: 89–91, 2005.

GAMAGE, D. G.; HENDRICKSON, T. L. GPI Transamidase and GPI anchored proteins: Oncogenes and biomarkers for câncer. **Crit Rev Biochem Mol Biol**, Early Online: 1–19, 2013.

GIAP, Huan; GIAP, Bosco. Historical perspective and evolution of charged particle beam therapy. **Transl cancer res,** v. 1, n. 3, p. 27-136, jan. 2012.

GORDAN, J. D.; *et al.* Sorafenib and sunitinib: novel targeted therapies for renal cell cancer. **Pharmacotherapy**, v. 27, p. 1125-1144, 2010.

GORDAN, J. D.; SIMON, M. C. Hypoxia-inducible factors: central regulators of the tumor phenotype. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 17, p. 71-77, 2007.

GUPTA Y. et al, Macrophage Migration Inhibitory Factor Secretion Is Induced by Ionizing Radiation and Oxidative Stress in Cancer Cells. **PLoS ONE**. 11(1). 2016

HANASH, S.Disease proteomics. **Nature** 422, 226–232, 2003.

HUI, Z. et al. Radiosensitization by inhibiting STAT1 in renal cell carcinoma. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 73, 288-295. 2009.

JI ZM, YANG LL, NI J, XU SP, YANG C, DUAN P, LOU LP, RUAN QR. Silencing Filamin A Inhibits the Invasion and Migration of Breast **Cancer** Cells by Upregulating 14-3-3 σ . **Curr Med Sci.** 38(3):461-466. 2018

JIANG, Z. *et al.* Aldolase A as a prognostic factor and mediator of progression via inducing epithelial–mesenchymal transition in gastric cancer. **J Cell Mol Med**.;22:4377–4386. 2018.

JONASCH E, et al. Phase II presurgical feasibility study of bevacizumab in untreated patients with metastatic renal cell carcinoma. **J Clin Oncol** 27:4076–4081 8, 2009

KAPLAN, D. A. et al. Electron transfer dissociation in the hexapole collision cell of a hybrid quadrupole-hexapole fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer. **Rapid commun. mass spectrom**, v. 22, n.11, p. 271–278, jan. 2008.

KIM et al. Quantitative proteomic analysis of single or fractionated radiation-induced proteins in human breast cancer MDA-MB-231 cells. Cell & Bioscience. 5:2. 2015

KRASNY, L. et al. An in-vitro tumour microenvironment model using adhesion to type i collagen reveals akt-dependent radiation resistance in renal cancer cells. **Nephrol dial transplant**, Alemanha, v. 25, p. 373–380, jan. 2010.

LANÇAS, Fernando M.. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: finalmente "compatíveis"? ii. a escolha do analisador de massas. **Scientia chromatographica**, v. 5, n. 1, p. 27-46, jan. 2013.

LIN, R. et al. Proteomic Analysis of Ionizing Radiation-Induced Proteins at the Subcellular Level. **Journal of Proteome Research**, [S.L], v. 8, p. 390–399, jan. 2008.

LJUNBERG, B.*et al.* EAU guidelines on renal cell carcinoma: the 2010 update. **European Urology**, v. 58, p. 398-406, 2010.

LOBO NC, GEDYE C, APOSTOLI AJ, et al. Efficient generation of patient-matched malignant and normal primary cell cultures from clear cell renal cell carcinoma patients: clinically relevant models for research and personalized medicine. **BMC Cancer.**16:485. 2016.

MAIER, Patrick; HARTMANN, Linda; HERSKIND, Frederikwenz And Carsten. Cellular pathways in response to ionizing radiation and their targetability for tumor radiosensitization. **Int. j. mol**. sci, v. 17, n. 102, p.111-222, jan. 2016.

MAIRINGER FD, WALTER RF, THEEGARTEN D, HAGER T, VOLLBRECHT C, et al. Gene Expression Analysis of the 26S Proteasome Subunit PSMB4 Reveals Significant Upregulation, Different Expression and Association with Proliferation in Human Pulmonary Neuroendocrine Tumours. **J Cancer**. 5(8):646-54. 2014.

MAKAREWICZ, R, *et al.* The value of postoperative radiotherapy in advanced renal cell cancer. **Neoplasma**, 45(6):380–383, 1998.

MANN, M., KELLEHER, N.L.; The case for high resolution and high mass accuracy; Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. **Precision proteomics**: 105: 18132–18138, 2008.

MASUI, O. et al. Quantitative Proteomic Analysis in Metastatic Renal Cell Carcinoma Reveals a Unique Set of Proteins with Potential Prognostic Significance*. **Molecular & Cellular Proteomics,** [S.L], v. 12, n. 1, p. 132-144, dez. 2009.

MORAES, Maria Carolina B. Espectrometria de massas com ionização por "electrospray" aplicada ao estudo de espécies inorgânicas e organometálicas. **Quim. nova**, v. 26, n. 4, p. 556-563, jan. 2003.

Niinivirta M. et al. Tumoral ANXA1 Is a Predictive Marker for Sunitinib Treatment of Renal Cancer Patients. **J Cancer**. 23;8(19):3975-3983. 2017.

NEAL, L. C. *et al.* 14-3-3 ζ as a prognostic marker and therapeutic target for cancer. **Expert Opin Ther Targets**. 14(12): 1343–1354. 2010.

Ostrowska Z, Moraczewska J. Cofilin - a protein controlling dynamics of actin filaments. Postepy Hig Med Dosw (Online). 2017 May 5;71(0):339-351.

NISHIMURA, Y. *et al.* Overexpression of YWHAZ relates to tumor cell proliferation and malignant outcome of gastric carcinoma. **British Journal of Câncer.** 108, 1324–1331. 2013.

NORITA, M. et al. PKM1 Confers Metabolic Advantages and Promotes Cell-Autonomous Tumor Cell Growth. **Cancer Cell** 33, 355–367. 2018.

PALAYOOR, S. T. et al. Effect of radiation and ibuprofen on normoxic renal carcinoma cells overexpressing hypoxia-inducible factors by loss of von hippellindau tumor suppressor gene function. **Clinical cancer research**, Bethesda, v. 10, p. 4158–4164, jan. 2008.

PANCHANATHAN, R. *et al.* Hypoxia primes human normal prostate epithelial cells and cancer cell lines for the NLRP3 and AIM2 inflammasome activation. **Oncotarget**, Vol. 7, No. 19, 2016

PARASHAR B, *et al.* Role of Radiation Therapy for Renal Tumors. **Seminars in Interventional Radiology**, 31(1):86-90, 2014.

PENTHALA, N. R. *et al*, Development and Validation of a Novel Assay to Identify Radiosensitizers that Target Nucleophosmin 1. **Bioorg Med Chem**.; 23(13): 3681–3686, 2016.

PÉREZ-VALENCIA, J. A. Angiogenesis and evading immune destruction are the main related transcriptomic characteristics to the invasive process of oral tongue câncer. **Scientific reports**, 8:2007, 2018.

QIAN L. et al. Performance Comparisons of Nano-LC Systems, Electrospray Sources and LC-MS-MS Platforms. **Journal of Chromatographic Science**;52:120–127, 2014.

RINI I B. et al. Renal cell carcinoma. Lancet; 373: 1119-32, 2009

ROCHA, F. G. G., *et al.* Endostatin gene therapy enhances the efficacy of IL-2 in suppressing metastatic renal cell carcinoma in mice. **Cancer Immunology Immunotherapy**, v. 59, p. 1357-1365, 2010.

RU-XIAN L. *et al.* Proteomic Analysis of Ionizing Radiation-Induced Proteins at the Subcellular Level. **Journal of Proteome Research**, 8, 390–399. 2009

SCHULTZ L., *et al.* Immunoexpression status and prognostic value of mTOR and hypoxia-induced pathway members in primary and metastatic clear cell renal cell carcinomas. **Am. J. Surg. Pathol.** 35, 1549–1556, 2011.

SCHWAMBORN, K.; CAPRIOLI, R. M. MALDI. Imaging mass spectrometry – painting molecular pictures. **Molecular Oncology**, v. 4, n. 6, p. 529-538, 2010.

STEIN M, *et al.*The value of postoperative irradiation in renal cell cancer. **Radiother Onco**l., 24(1):41–44, 1992.

SU KIM, D. *et al* Composite Three-Marker Assay for Early Detection of Kidney Câncer. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**; 22(3); 390–8. 2013

TAKEMASA I. *et al.* Potential biological insights revealed by an integrated assessment of proteomic and transcriptomic data in human colorectal cancer. **International Journal of Oncology** 40: 551-559, 2012.

Wang, X., Xie J, Proud, C. G. Eukaryotic Elongation Factor 2 Kinase (eEF2K) in Cancer. **Cancers (Basel**); 9(12): 162; 2017.

WANG Z, LI C, JIANG M, CHEN J, YANG M, PU J. Filamin A (FLNA) regulates autophagy of bladder carcinoma cell and affects its proliferation, invasion and metastasis. **Int Urol Nephrol.** 50(2):263-273. 2018

WANG, F. C.; AI, G. P.; WEI, Y. J. Identification of differentially expressed proteins of gamma-ray irradiated rat intestinal epithelial IEC-6 cells by two-dimensional gel electrophoresis and matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight mass spectrometry. **Proteomics**, 5 (2), 426–432. 2005.

WATERS. Qtof premier. **Site da WATERS**, jan. 2012. Disponível em: http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720000869en.pdf>. Acesso em: 29 jun. 2017.

WERSÄLL, PJ, et al. Extracranial stereotactic radiotherapy for primary and metastatic renal cell carcinoma. **Radiother Oncol**;77(1):88–95, 2005.

WHITE, N.M.A. *et al* Quantitative proteomic analysis reveals potential diagnostic markers and pathways involved in pathogenesis of renal cell carcinoma. **Oncotarget**, Vol. 5, N° 2, p.506, 2014.

WILKINS MR, *et al.* proteome research: new frontiers in functional genomics (principles and practice), kindle edition, new york, **springer-verlag**, 1997

Wong N., Ojo D., Yan J., Tang D. PKM2 contributes to cancer metabolism. **Cancer Lett.** 28;356(2 Pt A):184-91. 2015.

ZHAN, P. *et al.* FBXW7 negatively regulates ENO1 expression and function in colorectal cancer. **Lab Invest.**; 95(9): 995–1004. 2015.

ZHANG Y, ZHU T, LIU J, LIU J, GAO D, SU T, ZHAO R. FLNa negatively regulated proliferation and metastasis in lung adenocarcinoma A549 cells via suppression of EGFR. **Acta Biochim Biophys Sin**. 1;50(2):164-170. 2018

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Diretoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Ensino
Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 – Cidade Universitária CEP: 05508-000
Fone/Fax(0XX11) 3133-8908
SÃO PAULO – São Paulo – Brasil
http://www.ipen.br

O IPEN é uma Autarquia vinculada à Secretaria de Desenvolvimento, associada à Universidade de São Paulo e gerida técnica e administrativamente pela Comissão Nacional de Energia Nuclear, órgão do Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações.