UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Acúmulo da ribonucleoproteína heterogênea nuclear K em câncer de cabeça e pescoço: estudos mitocondriais

Cristiana Bernadelli Garcia

Ribeirão Preto
2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Acúmulo da ribonucleoproteína heterogênea nuclear K em câncer de cabeça e pescoço: estudos mitocondriais

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientada: Cristiana Bernadelli Garcia
Orientadora: Prof. Dra. Andreia Machado Leopoldino

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia em 03/04/2014. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2014

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Garcia, Cristiana Bernadelli.
Acúmulo da ribonucleoproteína heterogênea nuclear K em câncer de cabeça e pescoço: estudos mitocondriais. Ribeirão Preto, 2014.
88 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.
Orientador: Leopoldino, Andreia Machado.

1. hnRNP K. 2. Câncer de cabeça e pescoço. 3. Mitocôndria. 4. Bioenergética. 5. Espectrometria de massas.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Cristiana Bernadelli Garcia
Título do trabalho: Acúmulo da ribonucleoproteína heterogênea nuclear K em câncer de cabeça e pescoço: estudos mitocondriais

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Prof. Dra. Andreia Machado Leopoldino

Aprovado em: ___/___/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Agradecimentos

A Deus, por tudo. Pela força e pela sabedoria, pela proteção e pelo amor. E por me proporcionar um caminho que sou muito feliz em seguir.

A minha família, minha mãe Marlene e minhas irmãs Fernanda e Andréa, por todos os bons momentos, pelo desejo de sempre me ver crescer. Pela compreensão por eu não estar sempre presente.

Ao Flávio, querido companheiro. Um pessoa maravilhosa que confia em minha capacidade sempre, mesmo nos momentos que eu perdia a fé em mim. Um anjo em minha vida.

A querida professora Andreia, que foi muito mais que chefe/orientadora. Não tenho palavras pra agradecer todo o apoio, aprendizado... pela paciência e dedicação. Por contribuir de forma grandiosa no meu crescimento profissional.

Ao prof. Carlos, que ajudou de maneira ímpar no amadurecimento desse trabalho, por todos os conselhos e sugestões.

A prof. Luciane, pela ajuda nos ensaios e nas discussões dos dados obtidos.

A minhas queridas colegas/amigas/filhas de laboratório. Camila e Renata (companheiras desde o início), Karina (minha hnRNP K *partner*, colega pra toda hora), Lays e Maryna (aprendendo e ensinando sempre). Aos meus novos amigos, Lívia e Neto, obrigada pela compreensão por não estar sempre disponível e pela força. A todos que passaram pelo laboratório e deixaram suas contribuições. Ao Lucas, obrigada pela ajuda tanto profissional quanto psicológica. Todos vocês são especiais para mim.

Aos amigos dos laboratórios dos prof. Sergio Akira e Carlos. Emerson, Fernanda, Hamilton, Lais, Silveli. Amanda e Valéria. Obrigada por todos os bons momentos, principalmente pelo apoio quando precisei. Antonio, Franco, Nancy (você nunca será esquecida) queridos colegas, muito obrigada. Vocês também foram importantes nesse meu caminho. E claro, ao prof. Sergio, pela ajuda disponibilizando espaço físico e pelas valiosas sugestões e contribuições no trabalho.

A todos os funcionários da pós-graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia, em especial ao Henrique, pela grande ajuda durante essa caminhada.

A todos os amigos que fiz durante esses quatro anos de pós-graduação, colegas, funcionários e professores, que o caminho que vocês percorrerão seja cheio de conquistas.

"Nossa busca por descobertas alimenta nossa criatividade em todos os campos, não só na ciência. Se chegássemos ao fim da linha o espírito humano definharia e morreria. Mas não creio que um dia sossegaremos: aumentaremos em complexidade, se não em profundidade, e seremos sempre o centro de um horizonte de possibilidade em expansão".

Stephen Hawking, O Universo Numa Casca de Noz

RESUMO

GARCIA, C. B. **Acúmulo da ribonucleoproteína heterogênea nuclear K em câncer de cabeça e pescoço: estudos mitocondriais**. 2014. 89f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

A ribonucleoproteína heterogênea nuclear K (hnRNP K) é uma proteína envolvida em processos de expressão gênica e tem sido proposta como ligante de RNAs mensageiros mitocondriais. Apesar de ser considerada um marcador de pior prognóstico no câncer de cabeça e pescoço, o papel da hnRNP K nesta doença ainda é pouco conhecido. O objetivo deste trabalho foi estudar o envolvimento da hnRNP K na mitocôndria com ênfase na bioenergética e na identificação de novos potenciais ligantes de hnRNP K. As linhagens celulares utilizadas foram de carcinoma de cabeça e pescoço (HN13 e CAL 27) com silenciamento de RNA para hnRNP K e células HEK293 com super-expressão de hnRNP K. O efeito do acúmulo celular da hnRNP K na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial foi avaliado por meio da atividade dos complexos mitocondriais I, II e V em células HN13. A redução do nível de hnRNP K usando RNA de interferência promoveu uma diminuição da atividade dos complexos nas células HN13, indicando o envolvimento da proteína na eficiência do transporte de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial. Células HEK293 com super-expressão da hnRNP K (HEK293/hnRNP K) e as linhagens HN13 e CAL 27 com silenciamento e redução estável de hnRNP K foram utilizadas para determinar o papel de hnRNP K no potencial de membrana mitocondrial, níveis de ATP, produção de lactato e consumo de oxigênio. Células HEK293/hnRNP K comparadas ao controle apresentaram maior nível de ATP, menor potencial de membrana mitocondrial, menor consumo de oxigênio e maior produção de lactato. As células HN13 com redução da hnRNP K apresentaram níveis mais baixos de ATP, com menor liberação de lactato para o meio extracelular e maior consumo de oxigênio. Esses resultados sugerem que o acúmulo da proteína hnRNP K tem ação importante na mitocôndria por alterar o metabolismo bioenergético celular de fosforilação oxidativa para glicólise anaeróbica. A estratégia de co-imunoprecipitação usando anticorpos para hnRNP K, digestão de proteínas com tripsina e cromatografia líquida acoplada a espectrômetria de massa foi usada para encontrar novos potenciais ligantes de hnRNP K. A análise dos dados com o software SEPro identificou 57 proteínas candidatas a ligantes da hnRNP K. Três proteínas foram validadas por co-IP e Western blotting: o fator de transcrição mitocondrial PTCD3, YB1 e PSF. Propomos que a hnRNP K apresenta função na energética mitocondrial, e provavelmente, a sua interação com PTCD3 participa desta função.

Palavras-chave: hnRNP K, câncer de cabeça e pescoço, mitocôndria, bioenergética, espectrometria de massas.

ABSTRACT

GARCIA, C. B. **Accumulation of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K in head and neck cancer: mitochondrial studies**. 2014. 89f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP K) is a protein involved in gene expression processes, which has been proposed to bind mitochondrial mRNAs. Despite it to be considered a prognostic marker in cancer, the hnRNPK role in this disease is unknown. We addressed the involvement of hnRNP K in mitochondria with emphasis on bioenergetics and identification of new potential ligands of hnRNP K. The cell lines used were from head and neck squamous cell carcinoma (HN13 and CAL 27) with RNA silencing for hnRNP K , and HEK293 cells with overexpression of hnRNP K. The effects of cellular accumulation of hnRNP K in mitochondrial electron chain carriers were assessed by the activity of mitochondrial complexes I, II and V in HN13 cells. Reduced levels of hnRNP K using RNA interference promoted a decrease in the activity of the complexes in HN13 cells, indicating the involvement of the protein in the efficiency of the electron transport in mitochondrial respiratory chain. HEK293 cells with overexpression of hnRNP K (HEK293/hnRNP K) and HN13 and CAL 27 cells with silencing and stable reduction of hnRNP K were used to determine the role of hnRNP K in mitochondrial membrane potential, ATP levels, lactate production and oxygen consumption. HEK293/hnRNP K, compared to control cells, showed higher levels of ATP, reduced mitochondrial membrane potential, lower oxygen consumption and higher production of lactate. HN13 cells with reduced hnRNP K had lower ATP levels, with lower release of lactate to the extracellular medium and higher oxygen consumption. These results suggest that accumulation of hnRNP K protein plays a role in mitochondria by changing the cellular energetic metabolism from oxidative phosphorylation to glycolysis. The strategy of co-immunoprecipitation using antibodies for hnRNP K, protein digestion with trypsin, and liquid chromatography, coupled to mass spectrometer, were used to search for new potential ligands of hnRNP K. Data analysis with software SEPro identified 57 candidate proteins binding to hnRNP K. Three proteins were validated by co-IP and Western blotting: the mitochondrial transcription factor PTCD3, YB1, and PSF. We propose that hnRNP K plays a role in the mitochondrial energetics, and probably its interaction with PTCD3 participates in this function.

Keywords: hnRNP K, HNSCC, mitochondria, bioenergetics, mass spectrometry.

ABSTRACTO

GARCIA, C. B. **Acumulación de ribonucleoproteína nuclear heterogénea de K en cáncer de cabeza y cuello: estudios mitocondriales**. 2014. 89f. Tesis (Doctorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

La ribonucleoproteína heterogénea nuclear K (hnRNP K) es una proteína implicada en procesos de expresión génica y se ha propuesto como ligante del RNAm mitocondrial. Aunque se considera un marcador de mal pronóstico en el cáncer de cabeza y cuello, el papel de la hnRNP K en esta enfermedad es aún desconocido. El objetivo de este trabajo fue estudiar la participación de la hnRNP K en la función mitocondrial, con énfasis en la bioenergética y la identificación de nuevos ligandos para la hnRNP K. Las líneas celulares utilizadas fueron el carcinoma de la cabeza y el cuello (HN13 y CAL 27) con el silenciamiento de RNA y las células HEK293 con la sobreexpresión de hnRNP K. El efecto de la acumulación celular de hnRNP K en la cadena transportadora de electrones mitocondrial se evaluó mediante la actividad mitocondrial de los complejos I, II y V en las células HN13. La reducción del nivel de hnRNP K usando la interferencia de RNA promovió una disminución en la actividad de los complejos en las células HN13, lo que sugiere la implicación de la proteína en la eficiencia del transporte de electrones en la cadena respiratoria mitocondrial. Células HEK293 con sobreexpresión de hnRNP K (HEK293/hnRNP K) y células HN13 y CAL 27 con silenciamiento y disminución estable de hnRNP K se utilizaron para determinar el papel de hnRNP K en el potencial de membrana mitocondrial, los niveles de ATP, la producción de lactato y el consumo de oxígeno. Las células HEK293/hnRNP K mostraron mayores niveles de ATP, menor potencial de membrana mitocondrial, una reducción del consumo de oxígeno y un aumento de la producción de lactato en comparación con los controles. Las células HN13 con reducida hnRNP K tenían niveles de ATP inferiores, con una menor liberación de lactato en el medio extracelular y mayor consumo de oxígeno. Estos resultados sugieren que la acumulación de la proteína hnRNP K tiene un papel importante en las mitocondrias para alterar el metabolismo bioenergético celular de la fosforilación oxidativa a la glucólisis anaeróbica. La estrategia de co-inmunoprecipitación utilizando anticuerpos hnRNP K, digestión de proteínas con tripsina y cromatografía líquida acoplada a espectrómetro de masas se utilizó para buscar nuevos ligandos de hnRNP K. El análisis de los datos con el software PatternLab identificaron 57 proteínas candidatas para la unión a la hnRNP K. Tres proteínas fueron validadas por la co-IP y Western Blot: el factor de transcripción mitocondrial PTCD3, YB1 y PSF. Se puede proponer que hnRNP K tiene un papel importante en la mitocondria y, al que menos en parte, su interacción con PTCD3 debe contribuir a esta función.

Palabras clave: hnRNP K, cáncer de cabeza y cuello, mitocondria, bioenergetica, espectrometría de masas

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Alterações genéticas envolvidas no fenótipo glicolítico de células tumorais 9

Figura 2. Análise do nível e da localização celular da proteína hnRNP K em células HEK293/hnRNP K 25

Figura 3. Redução nos níveis da proteína hnRNP K em células (A) HN13 e (B) CAL 27 usando silenciamento de RNA 26

Figura 4. Análise de proliferação, ciclo celular e fase sub-G1 em células HN13 e CAL 27 com redução da hnRNP K 27

Figura 5. Análise de parâmetros energéticos de células HEK293/hnRNP K..... 30

Figura 6. Análise do consumo de O_2 pelas células HEK293/hnRNP K e HEK293 controle (LacZ) 32

Figura 7. Potencial de membrana mitocondrial em células HEK293 com superexpressão de hnRNP K. 32

Figura 8. Níveis de ATP em células CAL 27 e HN13 com redução de hnRNP K .. 34

Figura 9. Potencial de membrana mitocondrial de células (A) CAL 27 e (B) HN13 com redução de hnRNP K 35

Figura 10. Determinação de lactato liberado para o meio extracelular por células CAL 27 e HN13 com expressão de hnRNP K reduzida 36

Figura 11. Captação de glicose por células CAL 27 e HN13 com redução de hnRNP K 37

Figura 12. Consumo de O_2 em células (A) CAL 27 e (B) HN13 com redução de hnRNP K 38

Figura 13. Determinação da atividade dos complexos I, II e V da cadeia respiratória mitocondrial em células HN13 com silenciamento de hnRNP K 40

Figura 14. Imagem representativa de proteínas mitocondriais separadas por SDS-PAGE e corados com coomassie G-250. 41

Figura 15. Análise das proteínas identificadas como ligantes de hnRNP K utilizando o programa PatternLab 44

Figura 16. Imunomarcação de proteínas identificadas por espectrometria de massa como ligantes de hnRNP K 45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista de anticorpos usados no trabalho e suas respectivas diluições 17

Tabela 2. Níveis de ATP celular, liberação de lactato para o meio extracelular e captação de glicose em células HEK293 controle (LacZ) ou hnRNP K 31

Tabela 3. Lista resumida de proteínas que se ligam especificamente à hnRNP K identificadas através de ensaio de co-IP no presente trabalho 43

Tabela 4. Parâmetros bioenergéticos determinados em células com aumento ou redução de hnRNP K, em relação a seus respectivos controles 47

Tabela S1. Proteínas que se ligam a hnRNP K identificadas por co-IP e espectrometria de massas 67

Tabela S2. Proteínas que se ligam especificamente a hnRNP K identificadas por co-IP e espectrometria de massas 72

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

2DG	2-desoxi-glicose
2DG6P	2-desoxi-glicose-6-fosfato
AAPVD	*Approximately Area-Proportional Venn Diagram*
ATP	Adenosina trifosfato
BCL	Gene de linfoma de células b
BRCA	Gene do câncer de mama
BrdU	5'-bromo-2'-desoxiuridina
BSA	Soro albumina bovina
°C	Graus Celsius
CCCP	Carbonil cianeto m-clorofenil hidrazona
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
CO_2	Dióxido de carbono
DCPIP	2,6-diclorofenolindofeno
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dubelcco
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DSS	Dissuccinimidil suberato
DTT	Ditiotreitol
$\Delta\Psi m$	Potencial de membrana mitocondrial
eIF4E	Fator de iniciação da tradução eucariótico 4E
EROs	Espécies reativas de oxigênio
EUA	Estados Unidos da América
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
G6PD	Glicose-6-fosfato desidrogenase
GFP	Proteína verde fluorescente
GOEx	G*ene Ontology Explorer*
HIF-1α	Fator indutor de hipóxia 1α
HK-II	Hexoquinase II
hnRNP	Ribonucleoproteína heterogênea nuclear
EPM	Erro padrão da média
HSP	Proteína de choque térmico
IgG	Imunoglobulina G
JC-1	5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3' tetraetil benzimidazolil carbocianina
kb	Quilobase
kDa	Quilo dalton
KRH	Tampão Krebs-Ringer-HEPES
LACZ	Gene da β-galactosidase
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas
LDH	Lactato desidrogenase
LDHA	Lactato desidrogenase A
M	Molar
mA	Miliampère
MDM2/HDM2	*Murine double minute 2/human double minute 2*
µg	Micrograma
mg	Miligrama
µL	Microlitro
mL	Mililitro

mm	Milímetro
mM	Milimolar
NAD	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NADH	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido
NADP	Fosfato de dinucleotideo de nicotinamida e adenina
NADPH	Fosfato de dinucleotideo de nicotinamida e adenina reduzido
nm	Nanômetro
O_2	Oxigênio
PBS	Tampão fosfato-salino
PDK1	Piruvato desidrogenase quinase 1
pH	Potencial hidrogeniônico
PI	Iodeto de propídeo
pmol	Picomol
PMSF	Fenil metil sulfonil fluoreto
PTCD3	Proteína com repetição de domínio pentatricopeptídeo 3
PSF	Fator de *splicing* rico em prolina e glutamina (SFPQ)
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
RNA	Ácido ribonucléico
RNAm	Ácido ribonucléico mensageiro
SFB	Soro bovino fetal
SCO2	Síntese de citocromo c oxidase 2
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida com SDS
SEPro	*Search Engine Processor*
shRNA	*Short hairpin* RNA
TBS	Solução salina tamponada de Tris
TEA	Trietanolamina
TIGAR	Reguladora de glicólise e apoptose induzida por p53
UCP2	Proteína desacopladora 2
V	Volts
x *g*	Aceleração da gravidade
YB1	Fator de transcrição Y-box 1

SUMÁRIO

Resumo i
Abstract ii
Abstracto iii
Lista de figuras iv
Lista de tabelas vi
Abreviaturas e símbolos vii
1. INTRODUÇÃO 1
1.1. Câncer de cabeça e pescoço 1
1.2. Ribonucleoproteína heterogênea nuclear K (hnRNP K) 2
1.3. Mitocôndria 5
1.4. Metabolismo energético no câncer 7
2. OBJETIVOS 11
3. MATERIAIS E MÉTODOS 12
3.1. Linhagens celulares e condições de cultura 12
3.1.1. Superexpressão da proteína hnRNP K em linhagem celular HEK293 12
3.1.2. Redução dos níveis de hnRNP K com *short hairpin* RNA (shRNA) em células HN13 e CAL 27 13
3.2. Ensaios de proliferação celular e ciclo celular 14
3.3. Extração e análise de proteínas 15
3.3.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) 16
3.3.2. Separação de proteínas mitocondriais por SDS-PAGE 16
3.3.3. *Western blotting* 17
3.4. Análise de parâmetros bioenergéticos 18
3.4.1. Níveis celulares de ATP 18
3.4.2. Consumo de oxigênio (O_2) celular 18
3.4.3. Determinação do potencial de membrana mitocondrial 19
3.4.4. Dosagem de lactato 19
3.4.5. Consumo (captação) de glicose celular 20
3.4.6. Atividade dos complexos mitocondriais I, II e V 21
3.5. Análise de co-imunoprecipitação de proteínas 21

3.5.1. Ligação dos anticorpos à proteína G *(cross linking)* 21
3.5.2. Ensaio de co-imunoprecipitação (co-IP) 22
3.6. Análise estatística 23
4. RESULTADOS 24
4.1. Superexpressão de hnRNP K em células HEK293.....24
4.2. Redução no nível da proteína hnRNP K em células HN13 e CAL 27 24
4.3. Avaliação de parâmetros energéticos em células HEK293 com superexpressão de hnRNP K 28
4.3.1. Superexpressão transitória e aguda da proteína hnRNP K em células HEK293 28
4.3.2. Superexpressão estável da proteína hnRNP K em células HEK293 31
4.4. Análise de parâmetros energéticos em células HN13 e CAL 27 com silenciamento de hnRNP K 33
4.5. Perfil de proteínas mitocondriais.....41
4.6. Identificação de potenciais proteínas ligantes à hnRNP K.....42
5. DISCUSSÃO 46
6. CONCLUSÕES 53
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 54
ANEXOS 67

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer de cabeça e pescoço

O câncer de cabeça e pescoço está entre as neoplasias mais comuns em todo o mundo, com cerca de 600.000 casos novos e 300.000 mortes a cada ano (Parkin *et al.*, 2005; Curado e Hashibe, 2009). No Brasil, as estimativas da incidência deste tipo de câncer para o ano de 2014 apontam 4.010 casos novos em mulheres e 11.280 casos novos em homens, representando a quinta neoplasia mais frequente na população masculina, excetuando as neoplasias de pele não melanoma (Ministério Da Saúde, 2013).

O câncer de cabeça e pescoço compreende as lesões localizadas no lábio, nariz, boca, faringe, laringe, glândulas salivares e tireóides. Quando diagnosticado precocemente, esse tipo de câncer apresenta bom prognóstico. Pacientes com lesões em estágios iniciais frequentemente manifestam poucos sintomas, o que resulta no atraso do diagnóstico e na diminuição do tempo de sobrevida. O tratamento de escolha, tanto nesses casos como nos mais avançados, é, em geral, a ressecção cirúrgica, mas também são utilizadas, de forma isolada ou combinadas, a radioterapia e a quimioterapia (Forastiere *et al.*, 2001; Ministério Da Saúde, 2013).

Os principais fatores de risco para as neoplasias de cabeça e pescoço são o uso prolongado de tabaco e álcool (Sturgis, 2013) e as infecções por papilomavírus humano (Ragin, Modugno e Gollin, 2007). O uso concomitante de álcool e tabaco estabelece um sinergismo entre esses fatores de risco, aumentando 30 vezes o risco de desenvolvimento deste tipo de tumor (Ministério Da Saúde, 2013).

Sabe-se que a maioria das células tumorais são derivadas da expansão clonal e crescimento aberrante de uma célula tronco tumoral ou a partir de algumas células iniciadoras de tumor que tenha readquirido a capacidade de auto-renovação (Lobo *et al.*, 2007). Células normais proliferam-se somente quando necessário, como resultado de um equilíbrio delicado entre fatores de promoção e inibição do crescimento sob a influência de sinais bioquímicos fornecidos por células vizinhas e fatores circulantes. No câncer, as células substituem esses mecanismos de controle e ditam seu próprio programa de proliferação, geralmente se multiplicando de forma irrestrita e, ao longo do tempo, passam a escapar de processos de senescência e morte celular. Além disso, conseguem aumentar a sua oferta de oxigênio e nutrientes, pela formação de novos vasos sanguíneos, e adquirem a capacidade de

migrar de seu sítio original, invadindo os tecidos circundantes e promovendo metástases em locais anatômicos distantes. Essas mudanças progressivas no comportamento celular tumoral, da proliferação ligeiramente desregulada para malignidade (metástase), são o resultado do acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas em um conjunto limitado de genes, oncogenes e genes supressores tumorais, duas classes de genes que alterados podem desencadear e promover o crescimento tumoral (Hanahan e Weinberg, 2011).

A atividade e/ou quantidade aumentada ou diminuída de certas moléculas presentes em células de carcinoma de cabeça e pescoço são responsáveis por seu comportamento maligno. Por conseguinte, vários grupos têm explorado o uso de técnicas de proteômica para investigar a natureza das proteínas presentes nesse tipo de câncer. Tal abordagem permitiu a identificação em amostras de carcinoma de língua quando comparado com mucosa normal de proteínas associadas à tumores, tais como proteínas de choque térmico (HSP 60 e HSP27), calgranulina B, ATP sintase β, miosina, tropomiosina e galectina 1 (He *et al.*, 2004). Em outro estudo, várias enzimas glicolíticas, HSPs, antígenos de tumor, proteínas do citoesqueleto, enzimas envolvidas nos sistemas de desintoxicação e anti-oxidantes, proteínas envolvidas em vias de sinalização intracelular e mitocondrial foram consideradas como superexpressos em tumores de cabeça e pescoço. Estes dados indicam que várias vias celulares estão envolvidas no processo de tumorigênese e sugerem uma abordagem de estratégia múltipla para combater a doença (Chen *et al.*, 2004).

1.2. Ribonucleoproteína heterogênea nuclear K (hnRNP K)

O grupo de ribonucleoproteínas heterogêneas nucleares (hnRNP)s constitui uma grande família de proteínas, com aproximadamente 20 membros (Swanson e Dreyfuss, 1988; Matunis, Michael e Dreyfuss, 1992; Dreyfuss, Kim e Kataoka, 2002; Leopoldino *et al.*, 2007). Uma das proteínas mais estudadas é a hnRNP K, uma proteína de 65 quilodaltons (kDa) que contém três domínios homólogos K (KH) onde se ligam moléculas de ácido desoxirribonucléico (DNA) e ácido ribonucléico (RNA) (Siomi *et al.*, 1993), e um domínio de interação proteica (KI) responsável pela associação de hnRNP K com outras proteínas (Makeyev e Liebhaber, 2002), que

contém sítios de ancoragem ricos em prolina que interagem, por exemplo, com domínios SH3 da família de quinases Src (Van Seuningen *et al.*, 1995).

A hnRNP K é uma proteína localizada em múltiplos compartimentos subcelulares, como núcleo, citoplasma e mitocôndria (Ostrowski *et al.*, 2002; Bomsztyk, Denisenko e Ostrowski, 2004; Mikula *et al.*, 2006). A diversidade das interações de hnRNP K sugere seu envolvimento em vários processos que compõem a expressão gênica, como remodelagem de cromatina, transcrição, *splicing*, tradução e estabilidade do RNA mensageiro (RNAm) (Bomsztyk, Denisenko e Ostrowski, 2004).

Vários trabalhos têm mostrado aumento na expressão de hnRNP K em diversos tipos de câncer e o seu papel na regulação da tumorigênese. Esta atividade tumorigênica de hnRNP K parece ser conferida pela sua habilidade de aumentar a proliferação celular (Lynch *et al.*, 2005), seus efeitos antiapoptóticos (Chen *et al.*, 2009), potencial clonogênico (Notari *et al.*, 2006) e capacidade de metástases (Inoue *et al.*, 2007).

Elementos localizados na região promotora de genes importantes na tumorigênese tais como *c-MYC, c-SCR, BRCA*, e timidina quinase são reconhecidos pela hnRNP K (Michelotti *et al.*, 1996; Ritchie *et al.*, 2003; Lynch *et al.*, 2005). Além disto, o gene *BCL-X*, que codifica uma proteína envolvida na regulação de apoptose, possui duas isoformas produzidas por *splicing*, BCL-X_L e BCL-X_S, com atividade anti-apoptótica e pró-apoptótica, respectivamente. Recentemente, hnRNP K foi descrita como participante da regulação negativa da produção da isoforma pro-apoptótica BCL-X_S em células sob estímulo de insulina (Revil *et al.*, 2009).

hnRNP K pode regular a expressão da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) por meio de ligação a sequências regulatórias denominadas acentuadoras de *splicing* exônico (*exonic splicing enhancers* - ESE) ou silenciadoras de *splicing* exônico (*exonic splicing silencers* - ESS). Sob condições de privação de nutrientes, a expressão de hnRNP K é aumentada, o que leva ao aumento de sua ligação à região ESS inibindo o *splicing* de transcritos de G6PD e o acúmulo de seu RNAm (Cyphert *et al.*, 2013). A enzima G6PD participa de várias vias de biossíntese, como a síntese de ácidos graxos, colesterol e aminoácidos, e na manutenção dos níveis de glutationa reduzida. Além disso, regula a taxa de conversão de glicose à ribose-5-fosfato, precursor para a biossíntese de nucleotídeos (Salati e Amir-Ahmady, 2001).

A proteína hnRNP K possui também capacidade de ligar ao promotor do gene do fator de iniciação da tradução eucariótico 4E (*eIF4E*) e ativar sua transcrição. Este fator desempenha importante papel na proliferação celular e sua superexpressão ocorre em vários tumores, incluindo câncer de cabeça e pescoço, mama, cólon, pulmão e vesícula biliar. A transcrição de eIF4E apresenta-se aumentada quando ambos c-Myc e hnRNP K estão superexpressos, sugerindo que a proteína hnRNP K pode cooperar com outras proteínas na indução de genes envolvidos no crescimento do tumor (Lynch *et al.*, 2005).

Estudos recentes mostraram que o aumento da proteína hnRNP K em câncer de próstata é mais evidente na matriz nuclear e é crucial para ativação de várias vias de sinalização envolvidas na carcinogênese (Barboro *et al.*, 2009). Em pacientes com carcinoma de pâncreas foi observado acúmulo citoplasmático de hnRNP K associado a p53 mutante (Zhou *et al.*, 2010). Níveis alterados de expressão de hnRNP K foram descritos em pacientes com carcinoma colorretal, e seu acúmulo no citoplasma foi associado a pior prognóstico nesse tipo de neoplasia (Carpenter *et al.*, 2006). Em câncer de cabeça e pescoço também foi verificada associação significativa entre a expressão de hnRNP K e prognóstico (Matos-Silva, 2009; Matta *et al.*, 2009). Em carcinoma nasofaringeal, a localização citoplasmática aberrante de hnRNP K foi associada com menor sobrevida global e sobrevida livre de metástase (Chen *et al.*, 2008). De acordo com Inoue e cols. (Inoue *et al.*, 2007), seu acúmulo no citoplasma está envolvido na migração celular/metástase e aumenta a resistência das células de carcinoma nasofaringeal a apoptose induzida por hipóxia.

hnRNP K foi identificada como alvo de degradação proteossomal dependente da *murine double minute 2 (*MDM2/HDM2), uma proteína que controla a atividade e o nível da proteína p53 em células não danificadas (Moumen *et al.*, 2005). MDM2 pode atuar como uma ubiquitina ligase E3 para degradar p53. Níveis elevados de MDM2 podem inativar as funções de apoptose e parada do ciclo celular de p53, como acontece em mutações ou deleções de p53, eventos comuns na gênese de muitos tipos de tumores (Iwakuma e Lozano, 2003). Em resposta ao dano no DNA, a regulação negativa de p53 por MDM2 é inibida, o que leva a estabilização e ativação de p53; p53 e hnRNP K são recrutadas para os promotores de genes responsivos a p53 de um modo mutuamente dependente. Acredita-se que a hnRNP K, servindo como um co-fator para p53, facilita a montagem e/ou estabilidade do complexo

promotor de p53 (Moumen *et al.*, 2005) e ajuda a proteína p53 a buscar sítios alvos no genoma, um evento chave na ativação gênica (Prives e Hall, 1999).

O papel da hnRNP K no desenvolvimento e na progressão das neoplasias tem sido bem documentado na literatura, mas ainda existem várias lacunas no conhecimento sobre suas diversas funções. Um estudo de proteômica, por exemplo, mostra uma ampla interação e envolvimento da proteína hnRNP K com proteínas mitocondriais (Mikula *et al.*, 2006), mas pouco se sabe sobre o seu papel na atividade mitocondrial. A ação da proteína hnRNP K no nível da proteína mitocondrial desacopladora 2 (UCP2) foi demonstrada de modo associado a insulina (Ostrowski *et al.*, 2004a). Outro fato importante é que a hnRNP K interage *in vivo* com diversos RNAs nucleares e mitocondriais codificantes e não-codificantes (Klimek-Tomczak *et al.*, 2004), podendo integrar sinais de várias cascatas de sinalização no núcleo, citoplasma e mitocôndria, e esta ligação proteína-RNA é estimulada pela insulina (Dzwonek, Mikula e Ostrowski, 2006). Com base nestas evidências, a investigação do papel de hnRNP K na mitocôndria e em sua função é essencial.

1.3. Mitocôndria

Mitocôndrias são organelas presentes em células eucarióticas superiores e desempenham diversas funções relacionadas à produção de energia e manutenção da vida celular. A principal cascata bioquímica que acontece nessa organela é a fosforilação oxidativa, uma série de reações coordenadas de oxidação e redução, catalisadas por cinco subunidades enzimáticas transportadoras de elétrons incorporadas à membrana mitocondrial interna (complexos I-IV e F_1F_O-ATP sintase) e dois fatores solúveis (citocromo c e coenzima Q10), que funcionam como translocadores de prótrons para o espaço intermembrana, resultando na geração de um gradiente eletroquímico que é dissipado de forma controlada pela ATP sintase para gerar a maior parte do ATP intracelular (Reichert e Neupert, 2004). Vias metabólicas adicionais que ocorrem dentro da mitocôndria incluem o ciclo do ácido tricarboxílico (ciclo de Krebs), β-oxidação de ácidos graxos, biossíntese do heme, esteroidogênese, metabolismo de certos aminoácidos, os passos iniciais do ciclo da uréia e algumas reações de gliconeogênese e cetogênese (Galluzzi *et al.*, 2010).

Alterações nos padrões normais dos componentes mitocondriais podem ocasionar disfunções nessas organelas e consequentemente desencadear doenças como o câncer. Em 2000, Hanahan e Weinberg postularam os *Hallmarks of Cancer* (Hanahan e Weinberg, 2000), que caracterizam a maioria das neoplasias humanas: auto-suficiência em sinais de crescimento; insensibilidade para sinais de inibição de crescimento; evasão da morte celular programada; potencial ilimitado de replicação; angiogênese sustentada; capacidade de invadir tecidos e criar metástases. Mais recentemente, foram incluídas duas características cruciais para a aquisição das anteriores, a instabilidade genômica e a inflamação promovida pelo tumor, e outras características emergentes, como a reprogramação do metabolismo energético e o escape do sistema imune (Hanahan e Weinberg, 2011). É importante ressaltar que várias dessas características podem ser direta ou indiretamente ligadas à mitocôndria (Galluzzi *et al.*, 2010).

O DNA mitocondrial humano (DNAmt) é uma molécula de dupla fita circular com 16,6 quilobases (kb) que codifica 13 polipeptídeos, que inclui sete subunidades do complexo I da cadeia respiratória (*ND1-ND6, ND4L*), uma subunidade do complexo III (*CYTB*), três subunidades do complexo IV (*COI-COIII*), e duas subunidades do complexo V (*ATP6* e *ATP8*); 22 RNA transportadores e dois RNA ribossomais (Attardi e Schatz, 1988). O DNAmt é mais vulnerável a lesões oxidativas que o DNA nuclear, por estar mais exposto a ação de espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas como subprodutos do processo da fosforilação oxidativa; isso pode ser responsável pelo aumento das mutações no DNAmt frequentemente observadas em câncer (Chatterjee, Mambo e Sidransky, 2006). Além disso, uma série de alterações metabólicas associadas com função mitocondrial foram observadas em carcinomas, como aumento da gliconeogênese e glicólise, aumento da expressão de proteínas transportadoras de glicose, redução da oxidação de piruvato e aumento da produção de ácido lático, redução na oxidação de ácidos graxos, modificação no metabolismo do aminoácidos e aumento na atividade da via das pentoses fosfato (Chatterjee, Mambo e Sidransky, 2006).

Em tumores de cabeça e pescoço, estudos mostraram uma freqüência de mutações mitocondriais que variam de 21% a 51% (Lièvre *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2007) e a maioria das mutações mitocondriais ocorrem durante ou após a transição do epitélio pré-neoplásico para carcinoma, indicando que estas alterações são um acontecimento tardio nesta doença (Mithani *et al.*, 2007).

1.4. Metabolismo energético no câncer

A observação de que células tumorais apresentavam diferenças no metabolismo energético comparadas com células normais originou a hipótese de Warburg (Warburg, 1956b). Otto Warburg observou que tecidos tumorais consumiam glicose em níveis mais altos que tecidos normais e criou a seguinte hipótese, conhecida como efeito Warburg (Warburg, 1966):

> *Cancer, above all other diseases, has countless secondary causes. But, even for cancer, there is only one prime cause. Summarized in a few words, is the replacement of the respiration of oxygen in normal body cells by a fermentation of sugar.*

A alta taxa de glicólise aeróbica sob condições normais de oxigênio é devido a uma deficiência na respiração. De fato, a formação de ATP pela via glicolítica tem baixa eficiência, porém acontece de forma mais rápida que a fosforilação oxidativa. Essa geração rápida de energia é benéfica para células em proliferação, pois também fornece intermediários glicolíticos necessários para a biossíntese de ácidos nucleicos, lipídeos e aminoácidos (Deberardinis *et al.*, 2008).

O aumento da glicólise é acompanhado pela produção aumentada de lactato, com a consequente acidificação do microambiente tumoral. Sugere-se que esta acidose lática local serve para degradar o estroma que circunda o tumor, induzindo a apoptose e necrose de células não malignas (Gillies e Gatenby, 2007). No entanto, o metabolismo tumoral é muito complexo para ser explicado por um simples fenótipo metabólico (Nakajima e Van Houten, 2013). Recentes estudos ressaltam a complexidade do metabolismo tumoral, propondo um modelo de simbiose metabólica no microambiente tumoral, em que duas populações metabolicamente distintas se relacionam - quer sejam entre células tumorais ou entre células do tumor e do estroma - e os produtos finais da glicólise de uma serve como metabólitos para a fosforilação oxidativa da segunda população (Sonveaux *et al.*, 2008; Bonuccelli *et al.*, 2010; Migneco *et al.*, 2010).

Embora alguns tipos de câncer tenham uma preferência pela glicose como fonte primária de energia (Sandulache *et al.*, 2011), o consumo de glutamina tem sido apontado como essencial para o crescimento tumoral em alguns tipos de câncer (Wise e Thompson, 2010). O catabolismo da glutamina tem um duplo propósito, de gerar NADPH para funções biossintéticas pela glutaminólise a lactato e fornecer esqueletos de carbono na forma de oxaloacetato (Deberardinis *et al.*, 2008).

O papel da hipóxia no microambiente tumoral também merece destaque. A maioria dos tumores sólidos contém áreas pobremente oxigenadas (Höckel e Vaupel, 2001). A resposta a limitação de oxigênio é mediada em parte pela proteína fator indutor de hipóxia (HIF)-1α, que desencadeia uma série de eventos conduzindo a um rearranjo metabólico, incluindo o aumento da expressão de transportador de glicose 1 (Glut-1), aumento da atividade de enzimas glicolíticas, além de limitar a fosforilação oxidativa, induzindo a expressão de piruvato desidrogenase quinase (PDK1), que leva à redução no consumo de oxigênio e na produção de piruvato, dois substratos importantes para a fosforilação oxidativa (Papandreou *et al.*, 2006).

Alterações genéticas específicas em proteínas chave podem também alterar o metabolismo (Figura 1). Mutações que ativem Akt e inativem p53 são associadas com glicólise aumentada (Nakajima e Van Houten, 2013). O oncogene Akt tem sido descrito como regulador da proliferação e sobrevivência celular (Cheng *et al.*, 1997). A via fosfatidilinositol 3-quinase está frequentemente ativada no tumor, e sua ativação através de Akt aumenta a captação de glicose e sua utilização (Weinberg e Chandel, 2009). A proteína supressora tumoral p53 tem sido mostrada controlando importantes funções metabólicas. p53 não mutada estimula a fosforilação oxidativa pela regulação da proteína síntese de citocromo c oxidase 2 (SCO2). SCO2 é importante para a regulação da citocromo c oxidase, principal local de utilização do oxigênio em células eucarióticas. A diminuição da expressão de p53 resultou na diminuição da expressão da proteína SCO2 e no consumo reduzido de oxigênio, imitando o fenótipo de células deficientes em p53 (Matoba *et al.*, 2006). Além disso, p53 controla a proteína reguladora de glicólise e apoptose induzida por p53 (TIGAR), assim sob condições em que há a perda de função de p53 a regulação diminuída de TIGAR pode estar associada com o aumento de glicólise (Bensaad *et al.*, 2006).

Myc também está envolvida na biogênese mitocondrial. Por exemplo, c-myc é conhecido por ativar a maioria dos genes de enzimas glicolíticas, incluindo lactato desidrogenase-A (LDHA) e GLUT1, no intuito de melhorar tanto a produção de lactato quanto a absorção de glicose (Shim *et al.*, 1997; Osthus *et al.*, 2000). Curiosamente, tem sido sugerido que HIF-1α colabora com c-myc na promoção do fenótipo glicolítico quando c-myc está superexpresso, por meio da indução cooperativa de PDK1, hexoquinase II (HK-II) e LDHA (Dang *et al.*, 2008).

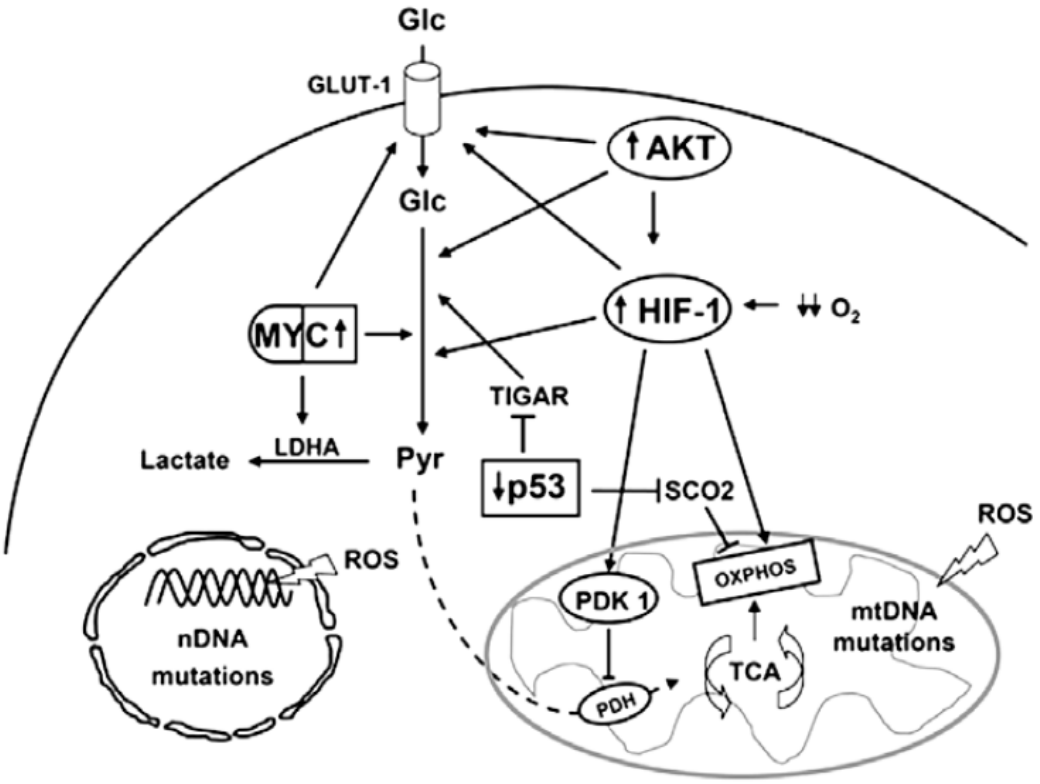

Figura 1. Alterações genéticas envolvidas no fenótipo glicolítico de células tumorais. O diagrama representa a incidência de mutações de ganho de função em oncogenes (símbolos ovais) e perda de função em supressores tumorais (retângulos) na glicólise e na utilização mitocondrial de piruvato em células tumorais. Hipóxia (baixo O_2) induz a estabilização de HIF-1α, que promove a ativação da transcrição do transportador de glicose Glut-1, de genes glicolíticos e PDK1. A expressão de PDK1 resulta na inativação de piruvato-desidrogenase e, portanto, na diminuição da oxidação do piruvato no ciclo do TCA simultaneamente a sua maior redução citoplasmática a lactato pela LDHA. Além disso, HIF-1α reciprocamente regula a expressão de duas isoformas do complexo de citocromo-oxidase c. O oncogene myc também mantém a via glicolítica aumentada pela ativação da transcrição de genes glicolíticos. Altos níveis de c-myc também podem promover a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs/ROS), que podem danificar o DNA nuclear (nDNA) e mitocondrial (mtDNA). A perda de função de p53 promove aumento no fenótipo glicolítico pela repressão da expressão TIGAR. Da mesma forma, a perda de função de p53 diminuiu a expressão de SCO2, um gene necessário para a montagem adequada da citocromo c oxidase, limitando a atividade da mitocôndria em células tumorais. Adaptado de (Ortega *et al.*, 2009).

O aumento do metabolismo celular tumoral leva ao aumento da produção de EROs. A mitocôndria é considerada a principal fonte de EROs celular, tanto em condições fisiológicas (Turrens, 2003; Lambert e Brand, 2009) como no câncer (Pelicano, Carney e Huang, 2004). Quando ocorre aumento da geração de

superóxido ou deficiência nas defesas antioxidantes, EROs acumulam-se, podendo inclusive induzir mais EROs por causar mutação no genoma mitocondrial, dando origem a transportadores de elétrons ineficientes (Penta *et al.*, 2001; Indo *et al.*, 2007). Além disso, EROs tem sido associado ao aumento da sobrevivência celular no câncer, por inibir vias que causam apoptose (Clerkin *et al.*, 2008).

Com base nestas informações, neste trabalho propôs-se identificar novos ligantes de hnRNP K e caracterizar o papel da proteína hnRNP K no metabolismo energético de células tumorais.

2 . Objetivos

2. OBJETIVOS

Objetivos gerais

Entender o papel da proteína hnRNP K na bioenergética celular e identificar novas proteínas ligantes da hnRNP K com impacto na mitocôndria.

Objetivos específicos

1. Avaliar o papel de hnRNP K na bioenergética celular tumoral por meio dos seguintes parâmetros: potencial de membrana mitocondrial, níveis intracelulares de ATP, nível de lactato no meio extracelular, consumo de oxigênio e captação de glicose em células não tumorais superexpressando a proteína e em linhagens tumorais com silenciamento de hnRNP K.

2. Identificar novas proteínas que interagem com hnRNP K em células não tumorais usando estratégias experimentais de co-imunoprecipitação, proteômica e cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS).

3. Validar novas interações hnRNP K-proteína com potencial ação na atividade mitocondrial utilizando técnica de *Western blotting.*

3. Materiais e métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Linhagens celulares e condições de cultura

No presente estudo foram utilizadas as linhagens celulares HEK293 (ATCC® CRL-1573™), WSU-HN13 e CAL 27 (ATCC® CRL-2095™). As células HEK293 foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro (código BCRJ 0009) e as linhagens de câncer de cavidade oral foram doadas gentilmente pelo Dr. J. Silvio Gutkind do *National Dental and Craniofacial Research Institute,* NIH, Bethesda, MD, Estados Unidos da América (EUA).

As células HEK293 derivam de células embrionárias de rim humano e possuem características epiteliais. São células transformadas com o adenovírus tipo 5 e são bastante utilizadas como ferramentas para estudo funcional de proteínas por sua facilidade de transfecção (Graham *et al.*, 1977; Thomas e Smart, 2005).

A linhagem celular HN13 foi derivada de células de carcinoma espinocelular de língua, estadiamento T2N2M0 (Cardinali *et al.*, 1995). São células resistentes a morte por estresse oxidativo (Leopoldino *et al.*, 2012) e por isso incluídas neste trabalho.

As células CAL 27 foram isoladas a partir de uma lesão maligna no meio da língua, com características de células epiteliais, poligonais e com o citoplasma altamente granular, mais próxima de um adenocarcinoma (Gioanni *et al.*, 1988; Jiang *et al.*, 2009). A linhagem CAL 27 é tumorigênica, porém não metastática.

Todas as linhagens foram cultivadas em placas de Petri (100 mm de diâmetro) com superfície tratada para células aderentes utilizando meio de Eagle modificado por Dubelcco (DMEM, D5648; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) com 10% de soro fetal bovino (SFB, 12657-029; Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e agentes antibacteriano e antimicótico (penicilina 100 µg/mL, estreptomicina 100 µg/mL e anfotericina B 250 µg/mL, A5955; Sigma Aldrich) e mantidas em incubadora umidificada a 37°C na presença de 5% de CO_2.

3.1.1. Superexpressão da proteína hnRNP K em linhagem celular HEK293

A superexpressão da proteína hnRNP K em HEK293 foi realizada utilizando o vetor pcDNA3.1/nV5-DEST™ (Invitrogen, Life Technologies) contendo o cDNA total do gene *HNRNPK* (NM_031262.2) isoforma b. O controle utilizado foi o mesmo vetor

contendo o cDNA *LACZ* (Invitrogen, Life Technologies). A transfecção em HEK293 foi realizada com o reagente PolyFect (301107, Qiagen, Hilden, Alemanha) de acordo com o protocolo do fabricante.

Os ensaios foram realizados com as células após 48 horas da transfecção com o plasmídeo contendo hnRNP K, nomeada como superexpressão 'transitória' da proteína hnRNP K; e com a superexpressão 'estável', utilizando geneticina como antibiótico de seleção das células transfectadas com o vetor contendo *LACZ* ou *HNRNPK*. Para a seleção, as células foram mantidas em DMEM com 1,0 mg/mL de geneticina (G8168, Sigma Aldrich) por três semanas e depois mantidas em DMEM sem o antibiótico para a realização dos experimentos. A confirmação da superexpressão das proteínas foi feita por *Western blotting* utilizando anticorpos para a hnRNP K (R8903) e o epítopo V5, produzido em fusão com as proteínas recombinantes (V2260, Sigma Aldrich).

3.1.2. Redução dos níveis de hnRNP K com *short hairpin* RNA (shRNA) em células HN13 e CAL 27

A estratégia escolhida para a redução da proteína hnRNP K nas linhagens tumorais HN13 e CAL 27 foi o silenciamento de RNA usando "*short hairpin RNA"* (shRNA). A redução dos níveis da proteína se dá pela interferência ou silenciamento gênico ocasionado pela interação do "*small interfering RNA"* maduro com o RNAm codificante para a proteína-alvo, levando à não-tradução ou degradação do mesmo (Moore *et al.*, 2010). Três sequências de shRNA para hnRNP K clonadas em vetor plasmidial *MISSION shRNA Plasmid DNA HNRNP K* (TRCN 295994, NM_002140.3 1635s21c1 - clone shK2; TRCN296044, NM_002140.3 1945s21c1 - clone shK3; TRCN 295993,NM_002140.3 1447s21c1 - clone shK4, Sigma Aldrich) foram adquiridas da empresa Sigma Aldrich. Como controle negativo (shCN) foi utilizado o vetor *MISSION TRC2 pLKO.5-puro Non-Mammalian shRNA Control Plasmid DNA* (código SHC002, Sigma Aldrich), contendo uma sequência sem alvos descritos em humanos. Os plasmídeos com shRNA possuem o gene de resistência ao antibiótico puromicina, o que possibilitou a seleção das células.

A transdução das células foi feita com partículas lentivirais produzidas em células HEK293FT (Life Technologies). Para isso foi utilizado kit comercial Virapower Lentiviral Expression System (K5330-00, Invitrogen, Life Technologies). O protocolo

usado foi: 1,0 µg dos vetores plasmidiais contendo o shRNA e 3,0 µg da mistura de plasmídeos provenientes do kit (ViraPower™ Packaging Mix) foram misturados em 12 µL de Lipofectamine™ 2000 e adicionados as células HEK293FT. No dia seguinte o meio foi substituído por DMEM (1,0 mL) adicionado de tampão HEPES (10 mM, pH 7,3), sem soro e antibióticos, sendo suplementado após 9 horas com 2,0 mL de DMEM completo. Após 48 horas da transfecção, o meio de cultura foi recolhido e centrifugado a 5.000 x *g* por 15 minutos a 4°C. Alíquotas de 1,0 mL foram estocadas em criotubos e armazenadas em freezer -80°C até a utilização.

A titulação de partículas infectantes foi determinada utilizando o mesmo vetor do shRNA contendo o cDNA para a proteína verde fluorescente (GFP; código SHC003, Sigma Aldrich) e células HN13. Após determinação da quantidade de partículas, foi definido que nos ensaios para redução da hnRNP K nas linhagens de carcinoma seriam utilizadas 1,0 x 10^5 unidades de partículas infectantes/mL, o que apresentou 90% de eficiência de transdução.

Para o ensaio de transdução foram plaqueadas 1,0 x 10^5 células/poço das linhagens HN13 ou CAL 27 em placas de 6 poços. Após 16 horas, a suspensão de partículas virais foi diluída na concentração descrita acima em meio DMEM completo sem antibióticos adicionado de brometo de hexadimetrina (10 µg/mL, H9268, Sigma Aldrich). Em cada poço da placa foi adicionado 1,0 mL de meio e a placa foi mantida em estufa por 18 horas. O meio foi descartado, as células foram lavadas com tampão fosfato-salino (PBS; NaCl 137mM, KCl 2,7 mM, Na_2HPO_4 9,1mM, KH_2PO_4 1,8 mM, pH 7,4) e meio DMEM completo novo foi adicionado. Após 72 horas de transdução, o meio de cultura das células foi trocado por DMEM contendo 1,0 µg/mL do antibiótico puromicina (P8833, Sigma Aldrich) para seleção das células contendo o shRNA. A seleção com puromicina foi mantida por uma semana, com a substituição do meio de cultura a cada 48 horas. Para confirmar a redução estável da proteína hnRNP K, os extratos protéicos das células foram analisados por *Western Blotting* usando anticorpo para hnRNP K.

3.2. Ensaios de proliferação celular e ciclo celular

A análise do conteúdo de DNA pode ser útil para definir em qual fase do ciclo celular a célula se encontra. A análise pode ser feita pela marcação do DNA com iodeto de propídeo (PI) e a deconvolução em histogramas de frequência, que

distribui as células nas três principais fases do ciclo celular (G1, S e G2/M) além de ser possível detectar células apoptóticas com DNA fragmentado (Pozarowski e Darzynkiewicz, 2004). Em conjunto com a análise do conteúdo de DNA celular, foi feita a detecção da incorporação de 5'-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU), que é seletivamente incorporado ao DNA celular durante a fase S do ciclo celular.

As células foram plaqueadas em placas de 12 poços (1,0 x 10^5 células/poço) e mantidas com meio DMEM sem soro por 24 horas. A seguir as células foram incubadas com uma solução de BrdU 40 µM em DMEM completo por duas horas no escuro. As células foram tripsinizadas, lavadas com PBS e incubadas em etanol 70% gelado por pelo menos 2 horas a 4°C. Foi realizada uma centrifugação (250 x *g* por 5 minutos) para retirada do etanol; as células foram ressuspendidas em tampão de diluição (PBS com Triton X-100 0,1% e BSA 0,5% (m/v)) contendo 100µg/mL de RNAse A (R4642, Sigma Aldrich) e incubadas por 30 minutos a 37°C. Centrifugou-se novamente as células, o *pellet* foi ressuspendido em ácido clorídrico 2,0 M e mantido por 10 minutos. O ácido foi neutralizado com tampão de borato de sódio 0,1 M pH 8,5 e as células foram centrifugadas e lavadas com tampão de diluição. Procedeu-se a incubação das células com anticorpo anti-BrdU marcado com fluoresceína (anti-BrdU-FITC, diluição 1:1.000, ab74545, Abcam) por uma hora a temperatura ambiente. As células foram lavadas novamente com tampão de diluição e ressuspendidas em tampão contendo 5,0 µg/mL de PI (P4170, Sigma Aldrich). A análise das células foi feita no citômetro Guava easyCyte HT (Millipore) utilizando o *software* InCyte.

3.3. Extração e análise de proteínas

Para a obtenção de lisados protéicos, as células aderidas foram lavadas com PBS e lisadas com tampão de lise (Tris 20 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, Triton X-100 1% ou tampão comercial CelLytic™ M, C2978, Sigma Aldrich) suplementado com inibidores de proteases e fosfatases (P8340, Sigma Aldrich). Os lisados foram submetidos a sonicação por três pulsos de dez segundos na potência 50% do aparelho Sonic Dismembrator (Modelo 100, *Fisher Scientific*) e centrifugados a 14.000 x *g* por 10 minutos a 4°C para retirada de debris celulares.

Adicionalmente, foi realizado o fracionamento subcelular de proteínas utilizando kit comercial (Cell Fractionation Kit Standard, ab109719, Abcam,

Cambridge, MA, EUA) segundo instruções do fabricante. O fracionamento consistiu na incubação das células, após tripsinização e lavagem com PBS, em tampão *A* acrescido de detergentes específicos para separação de proteínas citoplasmáticas (detergente I), mitocondriais (detergente II) e nucleares (*pellet* final, sem adição de detergente), seguidos de centrifugações (5.000 x *g* por um minuto a 4°C) para a separação das frações.

A concentração de proteínas dos extratos totais e subcelulares foi determinada por reação de Bradford utilizando o reagente *Bio-Rad protein assay* (500-0006, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA), segundo instruções do fabricante, e os lisados foram armazenados em freezer -80ºC até a execução dos ensaios.

3.3.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

Amostras de proteínas (10 µg) foram separadas por SDS-PAGE em gel 10% segundo Laemmli (Laemmli, 1970). Foi utilizado o sistema vertical de eletroforese Mini-PROTEAN® (Bio-Rad Laboratories) conforme instruções do fabricante. Foi utilizado padrão de massa molecular para proteínas *Spectra Multicolor Broad Range ladder* (26634, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). As seguintes condições de eletroforese foram configuradas: amperagem constante de 12 mA/gel e voltagem limite de 110 V durante 90 a 120 minutos. A corrida foi feita em tampão de eletroforese Tris-glicina (Tris 25 mM, glicina 250 mM, SDS 0,1%, pH 8,3). Em seguida as proteínas foram eletrotransferidas para membranas de PVDF (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, Reino Unido).

3.3.2. Separação de proteínas mitocondriais por SDS-PAGE

Proteínas mitocondriais (10 µg) foram separadas por SDS-PAGE em gel 12% em sistema vertical de eletroforese (Hoefer miniVE, GE Healthcare). As condições de corrida foram as mesmas estabelecidas na seção anterior. Depois, o gel foi fixado em solução de etanol 40% e ácido acético 10% por 30 minutos, corado com solução de Coomassie Brilliant Blue G-250 (27815, Sigma Aldrich) 0,12% durante a noite e a seguir foi lavado com água MilliQ até descoloração do gel e visualização das

bandas. A captura das imagens e análise das linhas através de histogramas foram feitos em *ChemiDoc™ MP imager* (Bio-Rad Laboratories).

3.3.3. *Western blotting*

Após a separação das proteínas por SDS-PAGE as proteínas foram eletrotransferidas para membrana de PVDF (GE Healthcare, EUA), com tampão de transferência (bicarbonato de sódio 10 mM e carbonato de sódio 3,0 mM, pH 9,9) por 1,5 hora a 350 mA/gel. Após a transferência, a membrana foi incubada em solução de bloqueio (solução de leite 5% em solução salina tamponada de Tris (TBS/T) - Tris.Cl 25 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, Tween-20 0,1%) por uma hora a temperatura ambiente. Após bloqueio, a membrana foi lavada com TBS/T e incubada com o anticorpo primário em TBS/T, na diluição específica para cada anticorpo (Tabela 1) *overnight* a 4°C. A seguir, a membrana foi novamente lavada com TBS/T durante 5 minutos, três vezes, e incubada por uma hora com o anticorpo secundário conjugado a peroxidase diluído em solução de bloqueio, seguido de lavagem com TBS/T e visualização de quimioluminescência utilizando solução de luminol (Tris 0,1 M pH 8,5, ácido p-coumárico 400 µM, luminol 2,5 mM) acrescido de 0,009% de peróxido de hidrogênio. A membrana de PVDF foi exposta a filme de autoradiografia ou analisada em equipamento *ChemiDoc™ MP imager* (Bio-Rad Laboratories) para a verificação da imunomarcação. A quantificação das bandas foi realizada por densitometria usando o software ImageLab™(Bio-Rad Laboratories).

Tabela 1. Lista de anticorpos usados no trabalho e suas respectivas diluições.

Anticorpo	Código	Origem	Diluição	Fabricante
Anti-hnRNP K	R8903	Camundongo	1:100.000	Sigma Aldrich
Anti-β actina	sc-47778	Camundongo	1:5.000	Santa Cruz
Anti-YB1	4202S	Coelho	1:1.000	Cell Signaling
Anti-PSF	P2860	Camundongo	1:1.000	Sigma Aldrich
Anti-PTCD3	sc-162048	Cabra	1:500	Santa Cruz
Anti-COX IV	4850S	Coelho	1:2500	Cell Signaling
Anti-camundongo	04-18-06	Cabra	1:50.000	KPL
Anti-coelho	65-6120	Cabra	1:10.000	Invitrogen
Anti-cabra	14-13-06	Coelho	1:5.000	KPL

3.4. Análise de parâmetros bioenergéticos

3.4.1. Níveis celulares de ATP

Para determinar os níveis celulares de ATP foi realizado ensaio comercial de bioluminescência (FLAA, Sigma Aldrich). Células (1,0 x 10^5 células) foram tratadas com 10 µg/mL de oligomicina (O4876, Sigma Aldrich) ou 10 µM de carbonil cianeto m-clorofenil hidrazona (CCCP, C2759, Sigma Aldrich) por duas horas e lisadas com tampão de lise (CelLytic™ M, Sigma Aldrich) adicionado de inibidores de proteases (P8340, Sigma Aldrich). Em seguida os lisados protéicos foram incubados por dois minutos a 100ºC para inibir a ação de ATPases, centrifugados a 14.000 x *g* por 10 minutos e mantidos em freezer -20ºC até a análise. A concentração de proteínas foi determinada e utilizados 10 µg de proteínas de cada amostra, que foram pipetadas em placas de 96 poços branca, e o volume acertado para 100 µL. Uma curva padrão de ATP também foi preparada para o cálculos dos valores das amostras. O reagente de ensaio (*ATP assay mix*) foi diluído 100 vezes em tampão e adicionados 100 µL desta solução em cada poço. A leitura foi feita imediatamente em luminômetro de placas (AutoLumat LB 953, Berthold Technologies, Bad Wildbad, Alemanha). Os resultados foram expressos em µM de ATP/10 µg proteínas.

3.4.2. Consumo de oxigênio (O_2) celular

Inicialmente, o consumo de O_2 celular foi determinado em células HEK293 com superexpressão transitória de hnRNP K utilizando oxígrafo equipado com eletrodo de Clark (Oxytherm, Hansatech Instruments, Norfolk, Inglaterra). Posteriormente, nas células com superexpressão estável de hnRNP K e nas linhagens tumorais foi utilizado um respirômetro de alta resolução *Oxygraph-2k* (OROBOROS Instruments Corp, Innsbruck, Áustria). Para ambas análises, as células foram retiradas da placa de cultura utilizando tripsina (T4174, Sigma Aldrich), contadas e ressuspendidas em meio DMEM sem vermelho fenol (D5030, Sigma Aldrich) suplementado com 0,75 mM de glicose (G7021, Sigma Aldrich), 1,0 mM de piruvato de sódio (S8636, Sigma Aldrich) e 10% de SFB. Cerca de 1,0 x 10^6 células foram transferidas para câmara com capacidade para 2,0 mL e mantidas a 37°C sob agitação de 200 rpm. Soluções estoque de oligomicina (1,0 mg/mL) e CCCP (5,0 mM) foram preparadas em etanol absoluto e mantidas em freezer -20°C. Após

estabelecimento da linha de base do consumo de O_2 foram realizadas medições: na presença de oligomicina (concentração final de 1,0 µg/mL) e de CCCP (concentração final de 5,0 µM para linhagem HEK293 e 10 µM para as linhagens tumorais). Os resultados do fluxo de O_2 foram apresentados em nmol/L (análise em oxígrafo Hansatech) e em pmol/segundos vezes milhões de células (pmol/(s*mill), respirômetro Oroboros).

3.4.3. Determinação do potencial de membrana mitocondrial

O potencial de membrana mitocondrial foi avaliado utilizando iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3' tetraetil benzimidazolil carbocianina (JC-1), que se liga seletivamente à mitocôndria formando agregados na membrana polarizada, conferindo uma emissão de luz em comprimento de onda de 590 nm (vermelha), enquanto que sua forma monomérica (não ligada à membrana mitocondrial) emite luz de intensidade verde (emissão em comprimento de onda de 530 nm).

As células foram plaqueadas em placas de 96 poços (1,0 x 10^4 células/poço). No dia seguinte foram tratadas por uma hora com CCCP (10 µM) ou valinomicina (1,0 µM, Sigma Aldrich) diluídos em DMEM completo. Em seguida as células foram incubadas com uma solução 5,0 µM de JC-1 (T3168, Invitrogen, Life Technologies) em DMEM livre de vermelho de fenol por 30 minutos a 37°C. Procedeu-se a lavagem dos poços com PBS e as células foram mantidas com 100 µL de PBS por poço. A fluorescência foi determinada usando o fluorímetro de placas Synergy 2 Multi-Mode Microplate Reader (Biotek, Winooski, VT, EUA), com os filtros de excitação e emissão indicados acima. Os dados foram apresentados como a razão entre as intensidades de fluorescência de agregados por monômeros.

3.4.4. Dosagem de lactato

A determinação da liberação de lactato para o meio extracelular foi realizada baseado na conversão de lactato a piruvato pela desidrogenase láctica (LDH) com produção de NADH, que pode ser determinado em comprimento de onda de 340 nm (Marbach e Weil, 1967). Células foram plaqueadas em placas de 12 poços (1,0 x 10^5) e após 16 horas o meio foi substituído por DMEM completo livre de vermelho fenol (1,0 mL por poço). O meio foi recolhido após 24 horas e armazenado em

freezer -20°C até a realização do experimento. A reação para determinação de lactato foi realizada em placa de 96 poços utilizando 10 µL do sobrenadante e 200 µL do reagente de trabalho (10 mg de NAD (N7004), 0,1 mL de LDH (L3916), 2,0 mL de tampão glicina 0,6M/hidrazina 0,5 M pH 9,2 e 4,0 mL água milli Q, todos os reagentes da empresa Sigma Aldrich). A placa foi incubada a 37°C por 15 minutos e a leitura feita em leitor de microplacas (Bio-Rad Laboratories). Os resultados foram calculados a partir de uma curva padrão de lactato (0,25-8,0 mM; L7022, Sigma Aldrich), normalizados pela quantidade de proteínas das células aderidas à placa e expressos em quantidade de lactato em mM/100 µg de proteínas.

3.4.5. Consumo (captação) de glicose celular

O ensaio foi realizado segundo protocolo descrito por Yamamoto e cols. (Yamamoto *et al.*, 2006). A captação de glicose pelas células foi medida utilizando 2-desoxi-glicose (2DG), que ao ser captado é fosforilado a 2-desoxi-glicose-6-fosfato (2DG6P) e se acumula nas células, sendo possível sua quantificação. Células em placas de 24 poços (1,0 x 10^5 células) foram incubadas com solução 2,0 mM de 2DG (D6134, Sigma Aldrich) em tampão KRH estéril (Krebs-Ringer-HEPES: Hepes 20 mM pH 7,4, NaCl 136 mM, KCl 4,7 mM, $CaCl_2$ 1,0 mM, $MgSO_4$ 1,0 mM, KH_2PO_4 5,0 mM e BSA 0,1% (m/v)) durante 20 minutos (células HEK293) ou uma hora (células HN13 e CAL 27). Em seguida as células foram lavadas duas vezes com tampão KRH e lisadas com 100 µL de hidróxido de sódio 0,1 M. A degradação de NAD(P) e NAD(P)H e inativação de enzimas endógenas foram feitas por aquecimento (85°C por 60 minutos) e em seguida as amostras foram neutralizadas com 100 µL de ácido clorídrico 0,1 M e 100 µL de tampão trietanolamina (TEA 200 mM pH 8,1, KCl 200 mM). O ensaio foi realizado em placa de 96 poços, adicionando 100 µL da amostra e 100 µL de solução de reação (TEA 50 mM pH 8,1, BSA 0,02 % (m/v), NADP 0,1 mM (N8035), resazurina 25 µM (R7017), glicose-6-fosfato desidrogenase 20 U/mL (G6PDH, G8529), diaforase 0,2 U/mL (D5540, todos Sigma Aldrich). Uma curva de 2DG6P (sc-220734, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA) diluída em tampão TEA 50 mM pH 8,1 foi utilizada para o cálculo dos níveis de 2DG6P presentes nas células. A placa foi incubada por uma hora a 37ºC e a leitura foi realizada usando fluorímetro de placas Synergy 2 Multi-Mode Microplate Reader (Biotek), utilizando comprimentos de excitação de 530-570 nm e emissão 590-620 nm. Os resultados

foram normalizados pela quantidade de proteínas das amostras após neutralização e apresentados como quantidade de 2DG6P em µM/100 µg de proteínas.

3.4.6. Atividade dos complexos mitocondriais I, II e V

Para analisar a atividade dos complexos da cadeia respiratória foram utilizados kits comerciais (Novagen, Madison WI, EUA) para os complexos I (AAMT001), II (AAMT002) e V (AAMT005) em células HN13/shCN e HN13/shK2.

Na análise da atividade do complexo I (NADH desidrogenase) foram utilizadas 50 µg de proteínas em cada reação. O ensaio se baseia na oxidação de NADH a NAD^+ e redução de um corante, o que leva ao aumento da absorvância em 450 nm. A determinação de atividade do complexo II (succinato-coenzima Q redutase) foi feita a partir da produção de ubiquinol acompanhada pela redução do corante 2,6-diclorofenolindofeno (DCPIP) e diminuição da absorvância a 600 nm. Para o ensaio foram utilizadas 60 µg de proteínas em cada reação.

O complexo ATP sintase (complexo V) foi analisado pela reação de hidrólise de ATP a ADP e fosfato; o ADP gerado leva à oxidação de NADH a NAD^+, que é monitorada pela redução da absorvância a 340 nm. Para a realização da reação foram utilizadas 50 µg de proteínas.

Células HN13/shCN e HN13/shK2 foram tripsinizadas, lavadas e mantidas em PBS. A concentração de proteínas foi determinada e as células foram lisadas com detergente proveniente dos kits. O lisado celular foi incubado em placas de 96 poços contendo anticorpos adsorvidos e específicos para cada um dos complexos por 2-3 horas em temperatura ambiente. Em seguida os poços foram lavados, a solução de reação foi adicionada e procedeu-se o ensaio cinético com leitura em intervalos de um minuto em leitor de microplacas (Bio-Rad Laboratories).

3.5. Análise de co-imunoprecipitação de proteínas

3.5.1. Ligação dos anticorpos à proteína G (*cross linking*)

Inicialmente, os anticorpos foram ligados à proteína G de maneira covalente para evitar a contaminação das amostras com o anticorpo após a imunoprecipitação das proteínas. Para o ensaio foram incubados 50 µL da proteína G ligada a esfera de agarose (17-0618-01, GE Healthcare) com 10 µg de solução de anticorpo por

uma hora sob agitação para a ligação proteína G-anticorpo. Em seguida foram lavados três vezes com tampão de ligação (Na_2HPO_4 10mM, NaCl 150mM, pH 7,2) e incubados em solução de 1,0 mM de dissuccinimidil suberato (DSS, S1885, Sigma Aldrich) diluído em tampão de ligação por uma hora sob agitação. Os complexos proteína G-anticorpo foram centrifugados brevemente e adicionou-se tampão de eluição (hidróxido de amônio (NH_4OH), pH 11) para verificar o *cross linking*. Novamente foram lavados duas vezes com tampão de ligação, seguido por duas lavagens com tampão de lise para co-imunoprecipitação gelado. Em seguida procedeu-se o protocolo de imunoprecipitação.

3.5.2. Ensaio de co-imunoprecipitação (co-IP)

A imunoprecipitação foi feita segundo protocolo descrito previamente (Chen e Gingras, 2007) com modificações. Resumidamente, células HEK293 cultivadas em placas de 100mm foram lisadas (tampão HEPES-NaOH 50mM pH 8,0, KCl 100 mM, etilenodiaminotetracético (EDTA) 2,0 mM, Igepal 0,1%, glicerol 10%, fenil metil sulfonil fluoreto (PMSF) 1,0 mM, ditiotreitol (DTT) 1,0 mM, coquetel inibidor de proteases - P8340, Sigma Aldrich) em gelo e centrifugadas a 12.000 x *g* por 10 minutos a 4°C. O extrato protéico foi incubado com anticorpo anti-hnRNP K previamente ligado a proteína G, *overnight* a 4ºC. Para o controle negativo foi utilizada imunoglobulina (IgG) normal de camundongo (12-371, Millipore, Billerica, MA, EUA). As esferas de agarose foram lavadas com tampão de lise seguido de centrifugação por três vezes, e com tampão bicarbonato de amônio (NH_4HCO_3 50 mM, KCl 75 mM, pH 8,0), duas vezes. As proteínas ligadas foram eluídas com 150 µL de solução de NH_4OH (200-500 µL em 5,0 mL de água milliQ, pH 11) por 15 minutos em gelo e liofilizadas. Este procedimento foi repetido mais duas vezes. Em seguida procedeu-se o protocolo de digestão segundo Fischer e cols (Fischer *et al.*, 2010). As amostras foram dissolvidas em tampão NH_4HCO_3 0,4M/uréia 8,0 M; a cada 100 µg adicionou-se 5,0 µL de DTT 0,1 M e 5,0 µL de iodoacetoamina 0,4M para redução e alquilação das proteínas, respectivamente. As amostras foram diluídas com água milli Q para reduzir a concentração da uréia a 1,0 M e procedeu-se a digestão com tripsina (V5280, Promega, Madison, WI, EUA) na proporção de 1/50 (m/m) de enzima/substrato, com incubação a 37°C por 18-24 horas. A reação foi parada com 20 µL de ácido fórmico 10% (v/v). Após a digestão, os peptídeos

foram dessalinizados utilizando StageTips (Thermo Scientific). Os peptídeos eluídos foram carregados em Orbitrap XL (Thermo Scientific) para separação cromatográfica (resina de forte troca iônica) e análise de espectrometria de massas em tandem. As amostras foram identificadas usando o programa ProLuCID e os resultados foram filtrados e organizados usando o programa SEPro (Carvalho *et al.*, 2012). As análises das proteínas encontradas foram feitas com o programa PatternLab (Carvalho, Yates Iii e Barbosa, 2010) utilizando os módulos *Approximately Area-Proportional Venn Diagram* (AAPVD) e *Gene Ontology Explorer* (GOEx). O ensaio foi feito em duplicata e foram consideradas apenas as proteínas encontradas nos dois experimentos. O ensaio foi feito em colaboração com os pesquisadores Paulo Costa Carvalho e Juliana de Saldanha da Gama Fischer, do Instituto Carlos Chagas da Fundação Osvaldo Cruz, Curitiba, Paraná.

3.6. Análise estatística

As análises estatísticas e os gráficos foram feitos com o programa GraphPad Prism 5. O teste estatístico utilizado foi o teste *t* não pareado.

4. Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Superexpressão de hnRNP K em células HEK293

O aumento no nível da proteína hnRNP K em células HEK293 foi confirmado por *Western blotting* ao se comparar os níveis da proteína nas células controle (HEK293/LacZ) e HEK293/hnRNP K (Figura 2). A confirmação da expressão das proteínas LacZ e hnRNP K a partir do vetor pcDNA3.1 em HEK293 foi feita utilizando anticorpo para o epítopo V5 (peptídeo em fusão com as proteínas de interesse) (Figura 2A). A análise da intensidade das bandas, realizada no *software ImageLab* demonstrou aumento de 57±35 % no nível da proteína hnRNP K comparado às células controle (Figura 2B). A análise da localização celular da proteína hnRNP K nas células HEK293/hnRNP K mostrou aumento de 47% da proteína na fração nuclear (Figura 2C).

4.2. Redução no nível da proteína hnRNP K em células HN13 e CAL 27

A redução da proteína hnRNP K após silenciamento de RNA (shRNA) em células HN13 e CAL 27 foi confirmada por *Western blotting* (Figura 3). A análise da intensidade das bandas demonstrou em células HN13 redução de 52% do nível da proteína hnRNP K em células shK2, 5% em células shK3 e 10% em células shK4, comparados ao controle negativo shCN (Figura 3A). Em células CAL 27 shK2, shK3 e shK4 os níveis de hnRNP K mostraram-se reduzidos em 33%, 10% e 5%, respectivamente, quando comparado ao controle negativo (shCN) (Figura 3B).

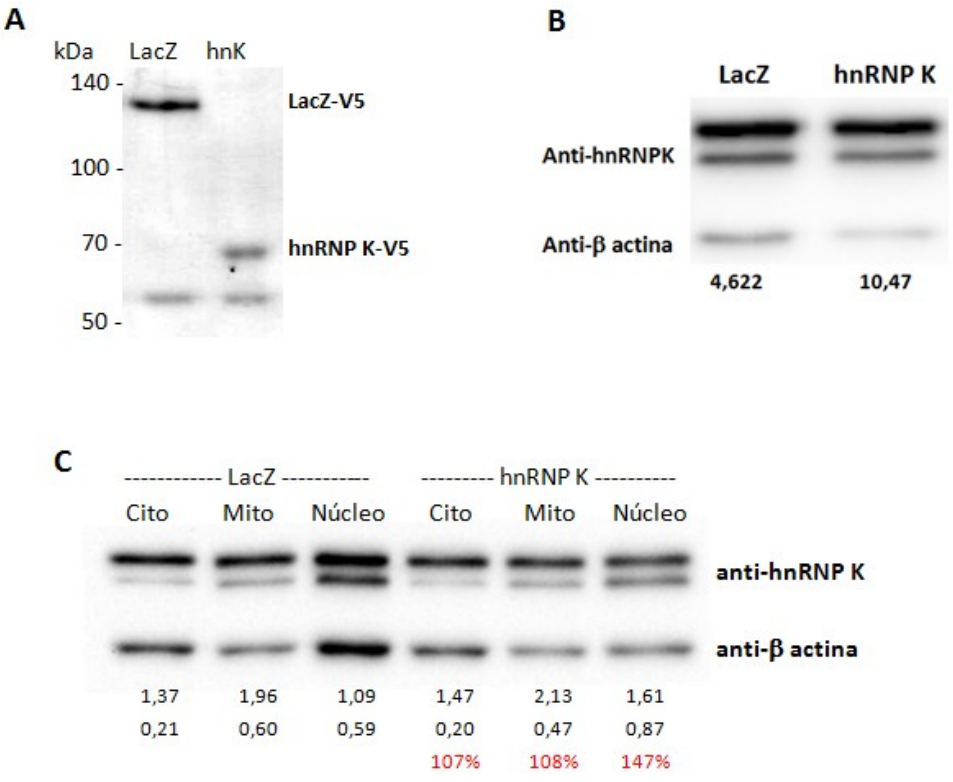

Figura 2. Análise do nível e da localização celular da proteína hnRNP K em células HEK293/hnRNP K. A superexpressão da proteína foi confirmada por *Western blotting* utilizando (A) anticorpo anti-V5 e (B) anti-hnRNP K em lisados totais de células HEK293/LacZ ou HEK293/hnRNP K. A proteína β actina foi utilizada para o cálculo da porcentagem relativa do aumento de hnRNP K (valores discriminados abaixo de cada banda). Em (C) estão mostrados os níveis de hnRNP K nas frações subcelulares citoplasmática (Cito), mitocondrial (Mito) e nuclear (Núcleo). Os valores em preto abaixo das bandas correspondem à razão da hnRNP K pela β actina e o aumento da intensidade da banda em relação a respectiva fração de LacZ está representado em vermelho. Imagens representativas de três experimentos independentes.

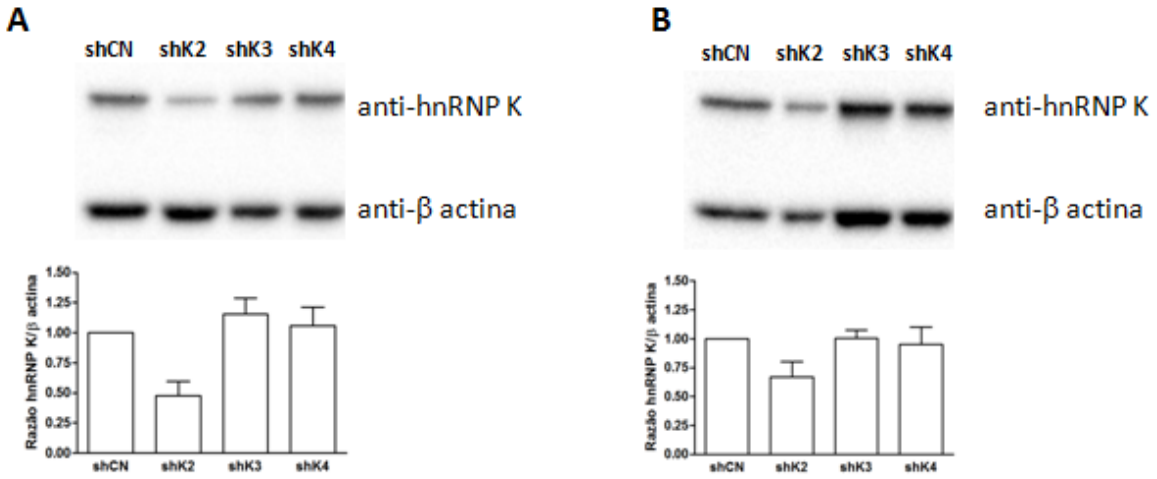

Figura 3. Redução nos níveis da proteína hnRNP K em células (A) HN13 e (B) CAL 27 usando silenciamento de RNA. A redução no nível da proteína hnRNP K foi observado por *Western blotting* utilizando o anticorpo para hnRNP K. A proteína β actina foi utilizada para o cálculo da porcentagem relativa da proteína hnRNP K nas células HN13 (A) e CAL 27 (B). A análise das bandas foi realizada no *software ImageLab*. Imagens representativas de três experimentos independentes.

Após confirmação da eficiência da redução no nível da proteína hnRNP K nas células HN13 e CAL 27 usando shRNA, foi realizado o ensaio de proliferação celular por incorporação de BrdU (Figuras 4A e 4B). A redução de hnRNPK não alterou significativamente a proliferação celular na linhagem HN13 (35,67±4,82% para shCN, 50,44±4,94% para shK2 e 47,86±5,47% para shK4) e apresentou uma leve tendência a redução da proliferação na linhagem CAL 27 (74,82±1,97% para shCN, 71,53±4,67% para shK2 e 67,61±4,35% para shK3).

Além do ensaio de proliferação celular, foi realizada a análise do ciclo celular, com o intuito de verificar a porcentagem de células nas diferentes fases do ciclo celular e a população em sub-G1. Embora houvesse um aumento de células em sub-G1 nas linhagens HN13 (shCN: 22,63±7,19% *vs* shK2: 19,57±4,46% e shK4: 38,69±14,64%) e CAL 27 (shCN: 28,72±1,74% *vs* shK2: 35,16±6,81% e shK3: 35,67±4,82%) com redução de hnRNP K, esse aumento não foi significativo. A distribuição das células nas diferentes fases do ciclo celular não foi alterada significativamente nas linhagens HN13 (Figura 4C) e CAL 27 (Figura 4D) com shK analisadas.

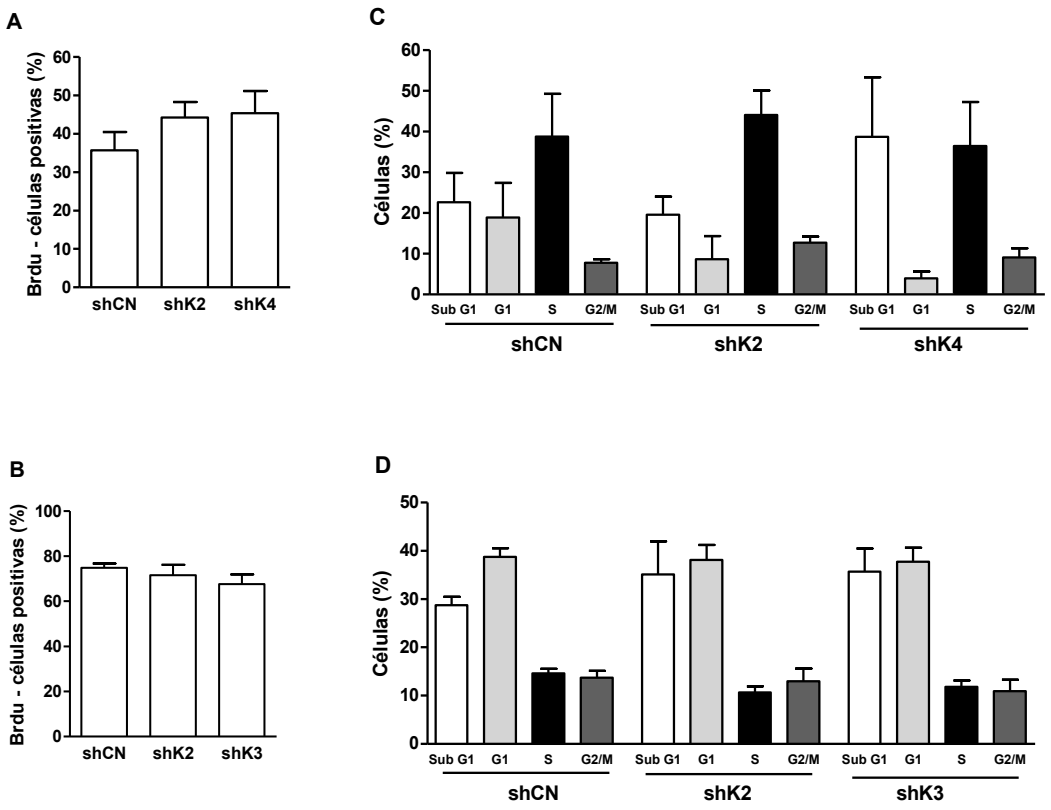

Figura 4. Análise de proliferação, ciclo celular e fase sub-G1 em células HN13 e CAL 27 com redução da hnRNP K. Ensaio de incorporação de BrdU em células (A) HN13 shCN, shK2 e shK4 e (B) CAL 27 shCN, shK2 e shK3. Distribuição das células (C) HN13 e (D) CAL 27 nas diferentes fases do ciclo celular após incorporação de iodeto de propídeo. As células foram adquiridas em citômetro de fluxo e analisadas no *software InCyte*. Os resultados são mostrados como média±EPM de três experimentos independentes.

4.3. Avaliação de parâmetros energéticos em células HEK293 com superexpressão de hnRNP K

A influência da proteína hnRNP K em parâmetros energéticos foi avaliada devido a evidências prévias de que esta proteína se liga a RNAm mitocondriais (Klimek-Tomczak *et al.*, 2004) e interage com proteínas mitocondriais (Dzwonek, Mikula e Ostrowski, 2006). Seu papel potencial na função mitocondrial com ênfase em parâmetros energéticos foi analisado por meio da determinação dos níveis de ATP, consumo de O_2 por células intactas, potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi m$) e liberação de lactato para o meio extracelular.

Uma primeira avaliação das células HEK293 foi realizada com o aumento transitório e agudo da proteína hnRNP K, ou seja, 48 horas após a transfecção do plasmídeo contendo o cDNA codificante para hnRNP K. Em seguida, verificou-se o efeito do aumento estável da proteína nas células em um intervalo maior que 48 horas, quando as células HEK293 transfectadas com o plasmídeo que possui sequencia codificante para a proteína hnRNP K foram selecionadas com antibiótico geneticina por três semanas para depois realizar os ensaios. Tal procedimento, além de selecionar apenas as células contendo o plasmídeo com o cDNA de interesse, permite avaliar o efeito adaptativo das células ao acúmulo da proteína.

4.3.1. Superexpressão transitória e aguda da proteína hnRNP K em células HEK293

Após 48 horas de transfecção, as células com o plasmídeo contendo o cDNA codificante para hnRNP K apresentaram os níveis de ATP significativamente aumentados quando comparadas com o controle (6,86±0,23 μM *vs* 3,84±0,19 μM, $p<0,0001$, Figura 5A) e após o tratamento com oligomicina (2,89±0,12 μM *vs* 4,67±0,48 μM, $p<0,01$, Figura 5A). O tratamento com CCCP em células com superexpressão de hnRNP K não reduziu os níveis de ATP, o que sugere a participação da proteína na manutenção do ATP e um possível desvio no metabolismo para produção de energia pela glicólise anaeróbica.

Em contrapartida, o consumo basal de O_2 por células HEK293 intactas mostrou-se significativamente reduzido nas células superexpressando hnRNP K quando comparadas ao controle (4,66±0,60 nmol/L *vs* 8,29±0,19 nmol/L, $p<0,01$,

Figura 5B). Na presença de oligomicina a HEK293/hnRNP K mostrou uma diminuição menos expressiva no consumo de O_2 do que a HEK293 controle (3,61±0,73 nmol/L *vs* 1,51±0,51 nmol/L, $p<0,05$, Figura 5B), mas quando estimulada com o desacoplador foi capaz de aumentar significativamente o consumo de O_2 (CCCP, 8,12±0,56 *vs* 7,86±0,51 nmol/L, Figura 5B).

O potencial de membrana mitocondrial apresentou uma redução discreta, porém significativa, nas células com superexpressão da hnRNP K comparado com o controle (razões: 2,25±0,11 *vs* 2,79±0,21, $p<0,05$, Figura 5C) e ambas responderam ao desacoplador (CCCP).

A superexpressão de hnRNP K em HEK293 não alterou a quantidade de lactato liberado pela célula em relação ao controle (4,22±0,21mM *vs* 4,09±0,13 mM, Figura 5D, primeira e segunda colunas), mas houve um aumento de 23% na captação de glicose (192,4±29,59 ng/µL *vs* 236,9±25,32 ng/µL de 2DG6P/100µg proteínas, Figura 5D, terceira e quarta colunas). Este resultado reforça o potencial papel da hnRNP K no desvio do metabolismo para glicólise anaeróbica.

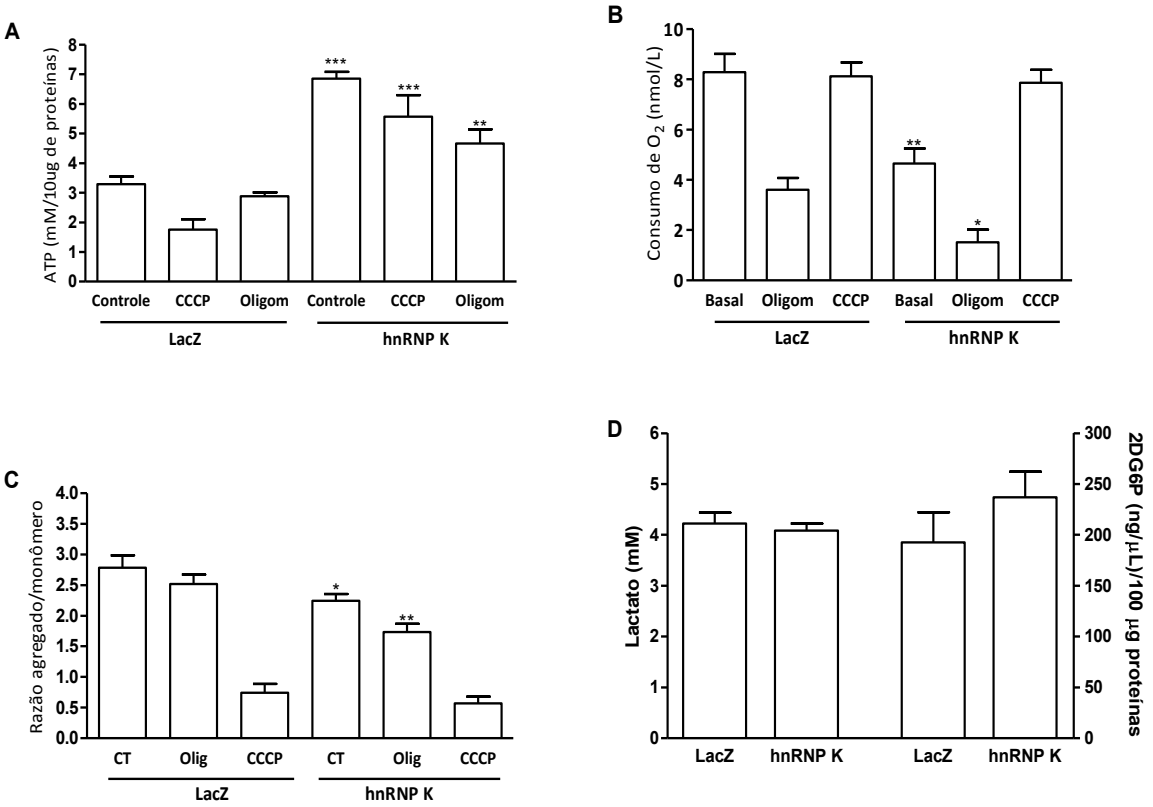

Figura 5. Análise de parâmetros energéticos de células HEK293/hnRNP K. (A) Determinação dos níveis de ATP. (B) Medida do consumo de O_2 pelas células. (C) Análise do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi m$) utilizando sonda JC-1. Os valores representam a razão da média de fluorescência de agregados/monômeros. (D) Quantidade de lactato liberado para o meio extracelular (primeira e segunda colunas) e de glicose captada (terceira e quarta colunas) por células HEK293/hnRNP K. *p<0,05, **p<0,01 e *** p<0,0001, comparado com controle (LacZ), teste *t* não pareado. Os resultados são mostrados como média±EPM de três experimentos independentes.

4.3.2. Superexpressão estável da proteína hnRNP K em células HEK293

Nas células com superexpressão estável da hnRNP K também foi observado o aumento nos níveis de ATP de forma significativa quando comparado com o controle (Tabela 2). Diferentemente do resultado anterior, nestas células a superexpressão de hnRNP K em HEK293 induziu aumento na quantidade de lactato liberado pela célula que foi acompanhado de aumento na captação de glicose (Tabela 2).

Tabela 2. Níveis de ATP celular, liberação de lactato para o meio extracelular e captação de glicose em células HEK293 controle (LacZ) ou hnRNP K.

	LacZ	hnRNP K	*p*
ATP celular (µM/10µg proteínas)	2,51±0,25	3,41±0,21	0,012
Lactato (mM/10µg proteínas)	16,63±2,13	25,06±3,24	0,0473
Glicose captada (µM/100µg proteínas)	50,85±4,42	56,91±5,40	0,41

Da mesma maneira, o consumo de O_2 por células intactas mostrou-se significativamente reduzido nas células superexpressando hnRNP K (215,2±11,40 *vs* 175,6±7,94 pmol/(s*Mill), *p*=0,0215, Figura 6). Como esperado, o tratamento com oligomicina reduziu significativamente o consumo de O_2 de ambas as células, porém não houve diferença significativa entre os valores de células controle e superexpressando hnRNP K (135,7±19,74 *vs* 105,6±15,88 pmol/(s*Mill), Figura 6). Já o tratamento com o desacoplador CCCP aumentou o consumo celular de O_2, mas não houve variação significativa entre os dois grupos (225,5±21,62 *vs* 207,1±25,79 pmol/(s*Mill), Figura 6).

O potencial de membrana mitocondrial apresentou diminuição significativa nas células com superexpressão de hnRNP K comparado com o controle (0,65±0,04, *vs* 1,0±0,04, *p*<0,0001, Figura 7). Após tratamento com CCCP houve redução significativa do potencial de membrana mitocondrial de HEK293 controle (*p*=0,0082), no entanto células HEK293/hnRNP K tratadas com CCCP não tiveram redução significativa do potencial de membrana mitocondrial (*p*=0,118). Este dado reforça a diferença entre o potencial eletroquímico na mitocôndria das duas células analisadas, o que pode indicar uma menor atividade das cadeias transportadoras de elétrons.

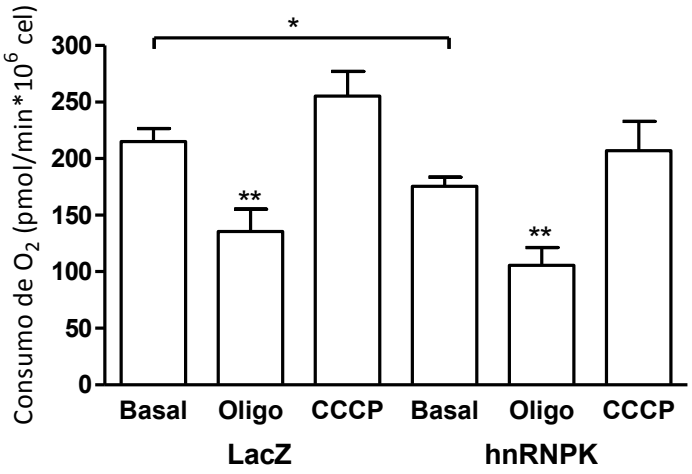

Figura 6. Análise do consumo de O_2 pelas células HEK293/hnRNP K e HEK293 controle (LacZ). Os resultados são mostrados como média±EPM de três experimentos independentes. *p<0,05, comparado com LacZ; **p<0,01, comparados com seus respectivos controles (consumo basal), teste *t* não pareado.

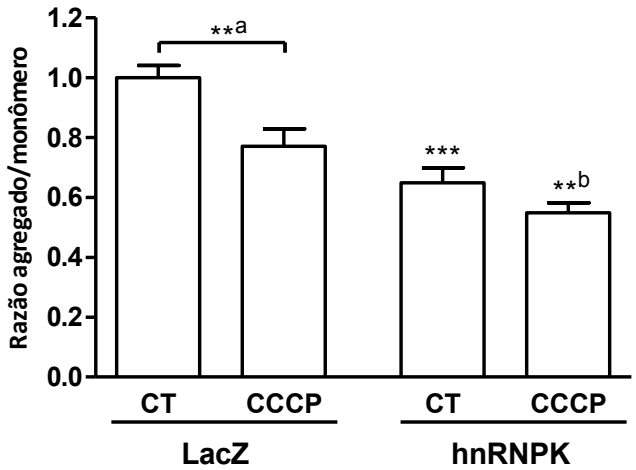

Figura 7. Potencial de membrana mitocondrial em células HEK293 com superexpressão de hnRNP K. Os valores obtidos representam a razão da média de fluorescência de agregados/monômeros e normalizados em relação ao controle (LacZ). Os resultados são mostrados como média±EPM de três experimentos independentes. $^{**a}p$=0,0082, comparado com controle; $^{**b}p$=0,034, ***p<0,0001, comparados com LacZ (controle ou CCCP), teste *t* não pareado.

4.4. Análise de parâmetros energéticos em células HN13 e CAL 27 com silenciamento de hnRNP K

As análises dos parâmetros energéticos de células HN13 e CAL 27 com redução de hnRNP K são mostradas a seguir. Observa-se que, apesar de serem duas linhagens tumorais, estas células apresentaram respostas diferentes nos ensaios realizados. Esta diferença representa a diversidade encontrada em tumores de cabeça e pescoço e em outros tipos de câncer.

Os níveis de ATP em células CAL 27 não tiveram alterações significativas comparando os grupos shRNA para hnRNP K com células controle (shCN: 0,90±0,087 μM; shK2: 0,69±0,104 μM; shK3: 0,85±0,121μM; shK4 0,83±0,119μM, Figura 8). Diferente da anterior, nas células HN13 observa-se redução nos níveis de ATP de forma significativa em células HN13/shK2 (1,79±0,095 μM) e HN13/shK4 (2,15±0,12 μM) quando comparadas com o controle shCN (3,14±0,36 μM, p=0,0028 e p=0,0202, respectivamente, Figura 8). A redução dos níveis de ATP intracelular foi proporcional à redução da proteína hnRNP K, ou seja, foi menor na linhagem HN13/shK2, que possui expressão menor de hnRNP K. A linhagem HN13/shK3 apresentou redução de ATP intracelular, porém não significativa (2,44±0,37μM, p=0,1969).

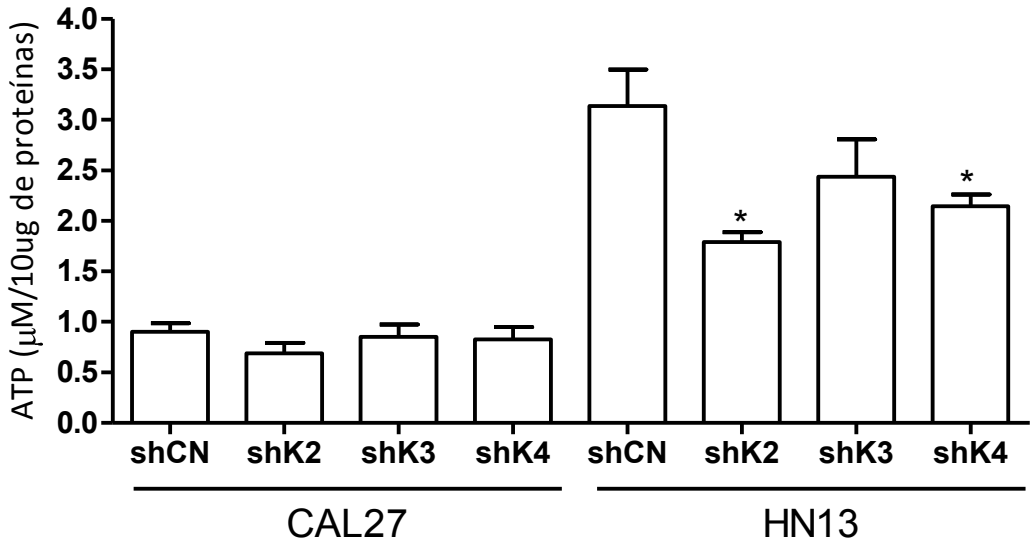

Figura 8. Níveis de ATP em células CAL 27 e HN13 com redução de hnRNP K. Ambas linhagens HN13 e Cal 27 foram selecionadas com três shRNAs diferentes (shK2, shK3 e shK4) e com controle negativo (shCN). *p<0,05, comparado com o controle HN13/shCN, teste *t* não pareado. Os resultados são mostrados como média±EPM de três experimentos independentes.

As células CAL 27/shK3 e CAL 27/shK4 tiveram aumento significativo no potencial de membrana mitocondrial em relação ao controle (shK3: 1,16±0,04, p=0,004; shK4: 1,17±0,06, p=0,006), mas as células CAL 27/shK2 não mostraram alterações (0,96±0,05; Figura 9A).

No entanto, pode-se observar uma redução significativa do potencial de membrana mitocondrial nas células HN13/shK3 e HN13/shK4 comparado com o controle (shK3: 0,75±0,07, p=0,005 e shK4: 0,73±0,05, p=0,007, Figura 9B), mas sem alterações no potencial das células HN13/shK2 (0,95±0,08, p=0,62). Após tratamento com CCCP, o potencial de membrana mitocondrial das células CAL 27 reduziu significativamente, com exceção nas células CAL 27/shK3, que apresenta redução porém não significativa (0,88±0,12). Diferentemente, as células HN13 não tiveram redução no potencial de membrana em nenhum dos grupos shRNA; por isso, outro desacoplador foi utilizado, a valinomicina. Com esse tratamento o potencial de membrana foi reduzido em todas as linhagens, porém não houve variação entre os valores obtidos quando comparadas as células shRNA/hnRNPK em relação às células shCN (shCN: 0,22±0,04; shK2: 0,198±0,04; shK3: 0,197±0,04; shK4: 0,188±0,04).

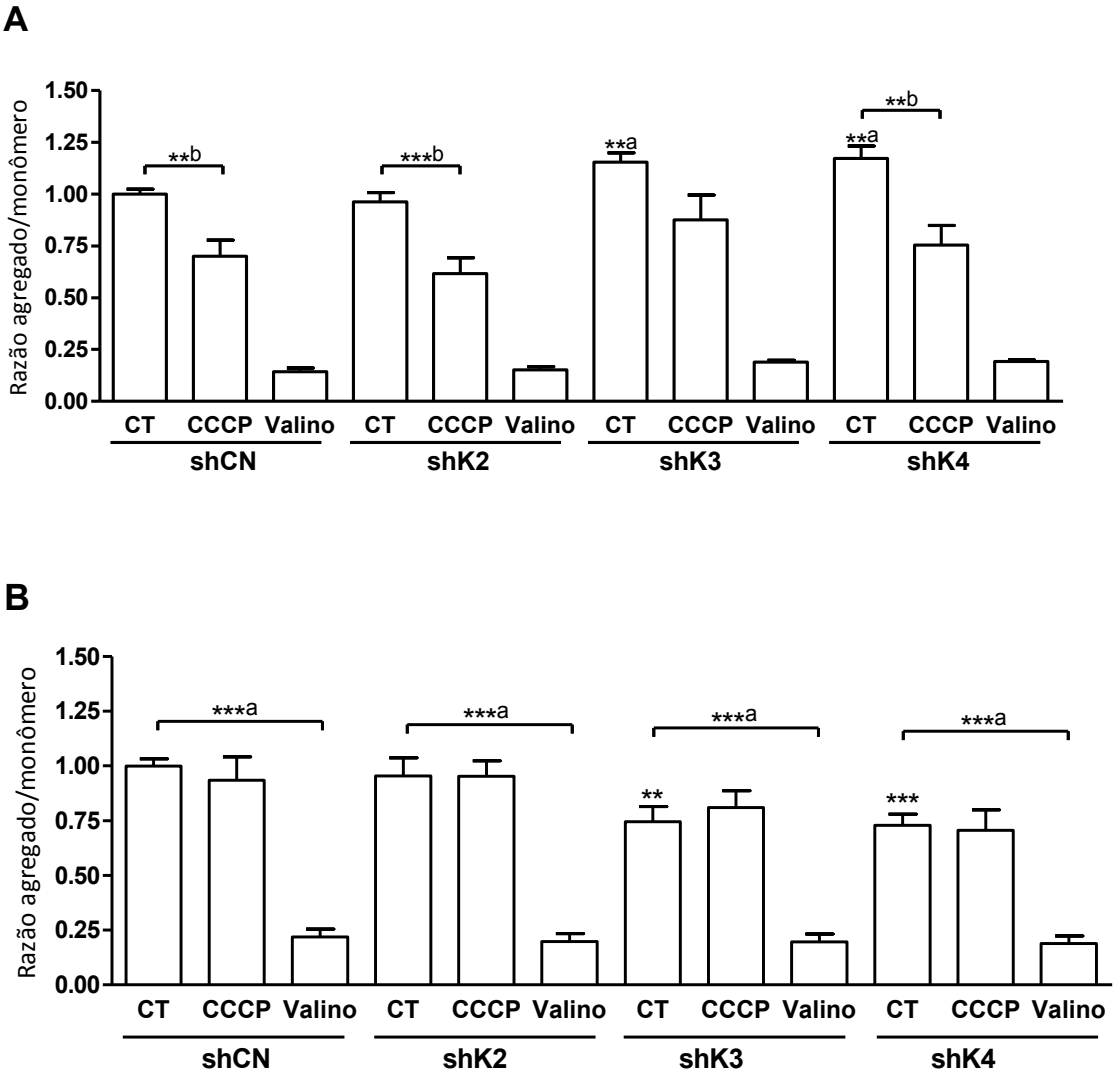

Figura 9. Potencial de membrana mitocondrial de células (A) CAL 27 e (B) HN13 com redução de hnRNP K. Os valores obtidos representam a razão da média de fluorescência de agregados/monômeros e normalizados em relação ao controle (shCN/CT). Os resultados são mostrados como média±EPM de três experimentos independentes. CT=controle; Valino=valinomicina. Em A: $^{**a}p<0,01$, comparado com controle (shCN/CT); $^{**b}p<0,01$, $^{***b}p<0,0001$, comparados com controle, teste *t* não pareado. Em B: $^{**}p<0,01$, $^{***}p<0,0001$ comparados com controle (shCN/CT), $^{***a}p<0,0001$, comparados com controle, teste *t* não pareado.

Com relação à liberação de lactato pela célula para o meio extracelular, embora possa se observar uma redução nos valores dos grupos CAL 27/shRNA hnRNP K em relação ao controle, esta redução não foi significativa (shCN: 25,50±3,35 mM; shK2: 20,36±4,86 mM; shK3: 16,37±1,47 mM; shK4: 18,05±3,13mM, Figura 10). Nas células HN13 houve uma redução nos grupos shK2 e shK4, também de maneira proporcional à redução de hnRNP K, em relação ao controle shCN (shK2: 12,92±1,11 mM, *p*=0,0365 e shK4: 13,44±0,83 mM, *p*=0,0451 *vs* shCN: 18,95±2,36 mM, Figura 10), sem alterações significativas no grupo shK3 (16,26±1,90 mM).

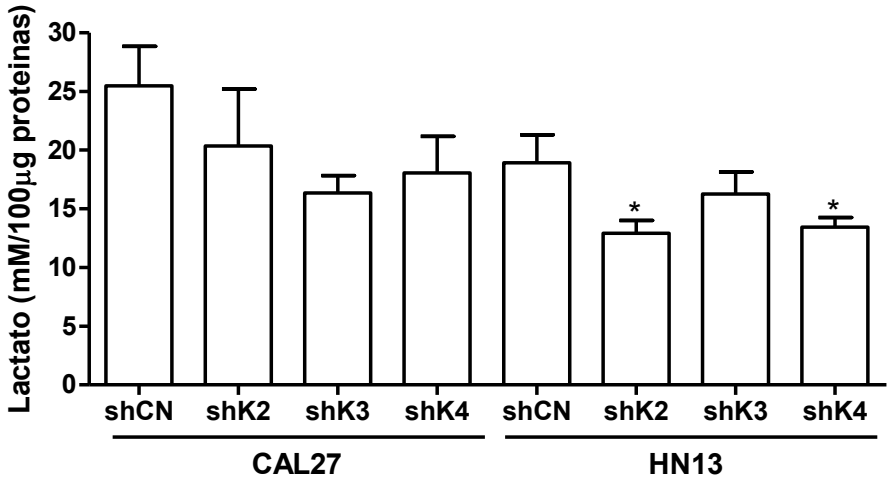

Figura 10. Determinação de lactato liberado para o meio extracelular por células CAL 27 e HN13 com expressão de hnRNP K reduzida. Células foram plaqueadas, incubadas com DMEM completo sem vermelho fenol e 24 horas depois o meio foi recolhido para análise. Os resultados são mostrados como média±EPM de três experimentos independentes. **p*<0,05, comparado com o controle HN13/shCN, teste *t* não pareado.

A Figura 11 apresenta o perfil de captação de glicose das células CAL 27 e HN13 com redução de hnRNP K. As células CAL 27 com shRNA/hnRNPK tiveram um leve aumento na captação de glicose comparadas com o grupo controle, no entanto não houve diferença significativa entre os valores (shCN: 4,51±1,43 µM de 2DG6P; shK2: 3,94±0,65 µM de 2DG6P; shK3: 5,29±0,89 µM de 2DG6P; shK4: 9,97±2,63 µM de 2DG6P).

Em contrapartida, as células HN13 apresentaram perfil diferente no ensaio, sendo que células HN13/shK2 tiveram redução da captação de glicose (13,13±1,20

μM de 2DG6P, *p*=0,0469) enquanto que células HN13/shK4 mostraram aumento desta captação (22,44±1,80 μM de 2DG6P, *p*=0,0309), quando comparadas com as células controle (16,99±1,20 μM de 2DG6P, Figura 11). Não houve diferença entre os valores de HN13/shK3 (12,65±1,88 μM de 2DG6P).

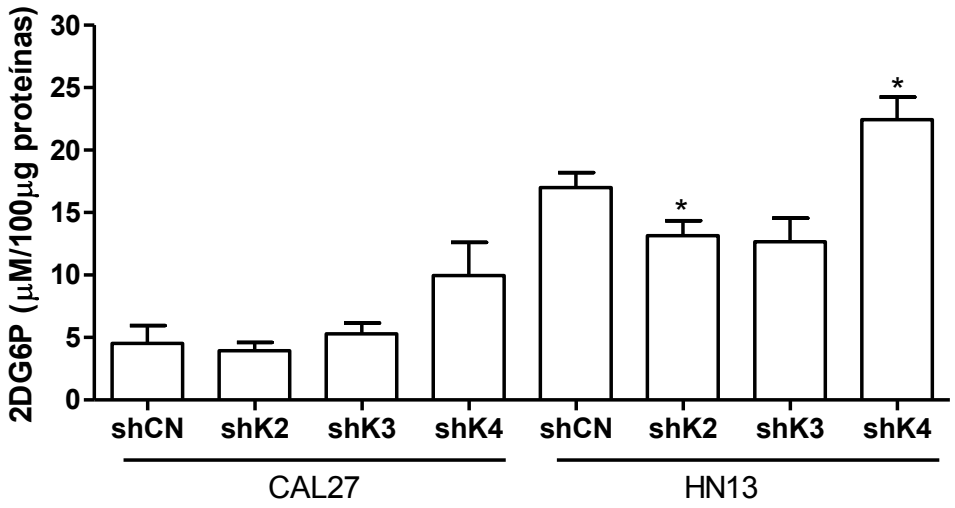

Figura 11. Captação de glicose por células CAL 27 e HN13 com redução de hnRNP K. As células foram tratadas com 2-desoxi-glicose por uma hora e em seguida procedeu-se o protocolo descrito no item 3.4.5 de Materiais e métodos. Os resultados são mostrados como média±EPM de três experimentos independentes. **p*<0,05, comparado com o controle HN13/shCN, teste *t* não pareado.

O ensaio de consumo de O_2 por células intactas foi realizado apenas com os grupos CAL 27/shK2, CAL 27/shK3, HN13/shK2 e HN13/shK4, tendo em vista que essas células apresentaram comportamentos diferentes das células controle em relação aos parâmetros anteriores. Análises realizadas em células CAL 27 não mostraram diferenças significativas entre o grupo controle shCN e as células shRNA/hnRNP K (Figura 12A).

Células HN13/shK2 apresentaram maior consumo de O_2 no estado basal (135,2±0,76 pmol/(s*Mill), *p*<0,0001, Figura 12B) e após estímulo com oligomicina (86,07±2,64 pmol/(s*Mill), *p*=0,0008) e CCCP (183,0±2,76 pmol/(s*Mill), *p*=0,002) quando comparados com as células controle (basal: 74,06±0,35 pmol/(s*Mill); oligomicina: 39,51±20,3 pmol/(s*Mill); CCCP: 101,8±6,17 pmol/(s*Mill)). De modo diferente, as células HN13/shK4 não mostraram alterações significativas no consumo basal (94,60±11,38 pmol/(s*Mill) e após estímulo com CCCP (127,5±11,76

pmol/(s*Mill), comparadas com células controle, mas o consumo após adição de oligomicina apresentou leve aumento (63,17±7,42 pmol/(s*Mill), *p*=0,03) comparado com o mesmo estímulo nas células controle.

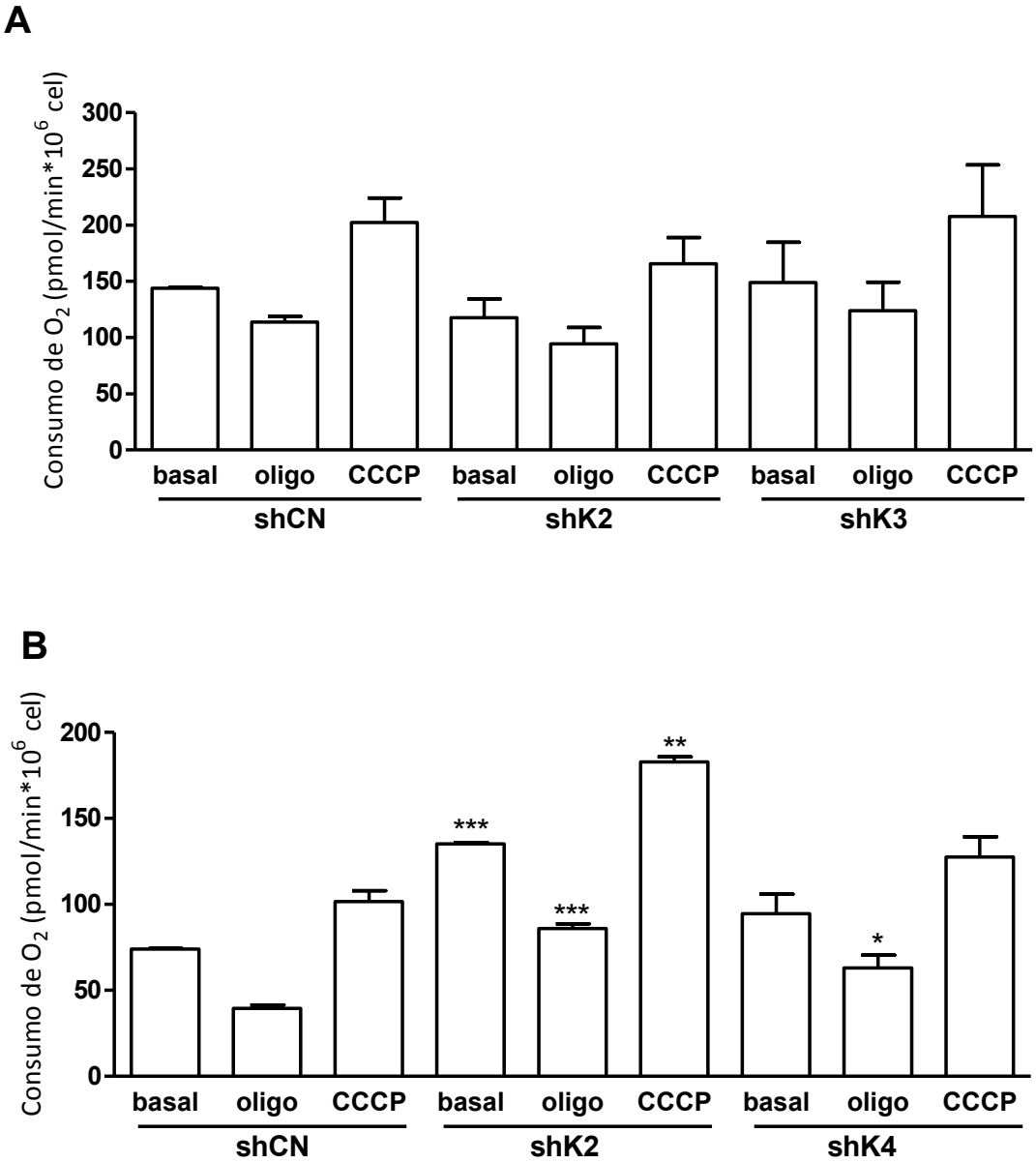

Figura 12. Consumo de O_2 em células (A) CAL 27 e (B) HN13 com redução de hnRNP K. Os resultados são mostrados como média±EPM de três experimentos independentes. oligo=oligomicina. ***p<0,0001, comparado com seus respectivos controles shCN; **p<0,01, comparados com shCN/CCCP; *p<0,05, comparado com shCN/oligo, teste *t* não pareado.

A atividade dos complexos I, II e V da cadeia respiratória mitocondrial foi determinada em células HN13 controle e com silenciamento de hnRNP K (clone 2; shK2). Este clone foi escolhido por ser o que teve maiores variações em relação à célula shCN. Observou-se uma redução significativa na atividade dos três complexos em células HN13/shK2 em relação ao controle (complexo I: 3,48±0,16 *vs 2,65*±0,16 ∆mOD/min, *p*=0,006; complexo II: 5,68 *vs* 5,01 ∆mOD/min, *p*=0,0051; complexo V: 5,98±0,3 *vs 5,03*±0,07 ∆mOD/min, *p*=0,0165, Figura 13).

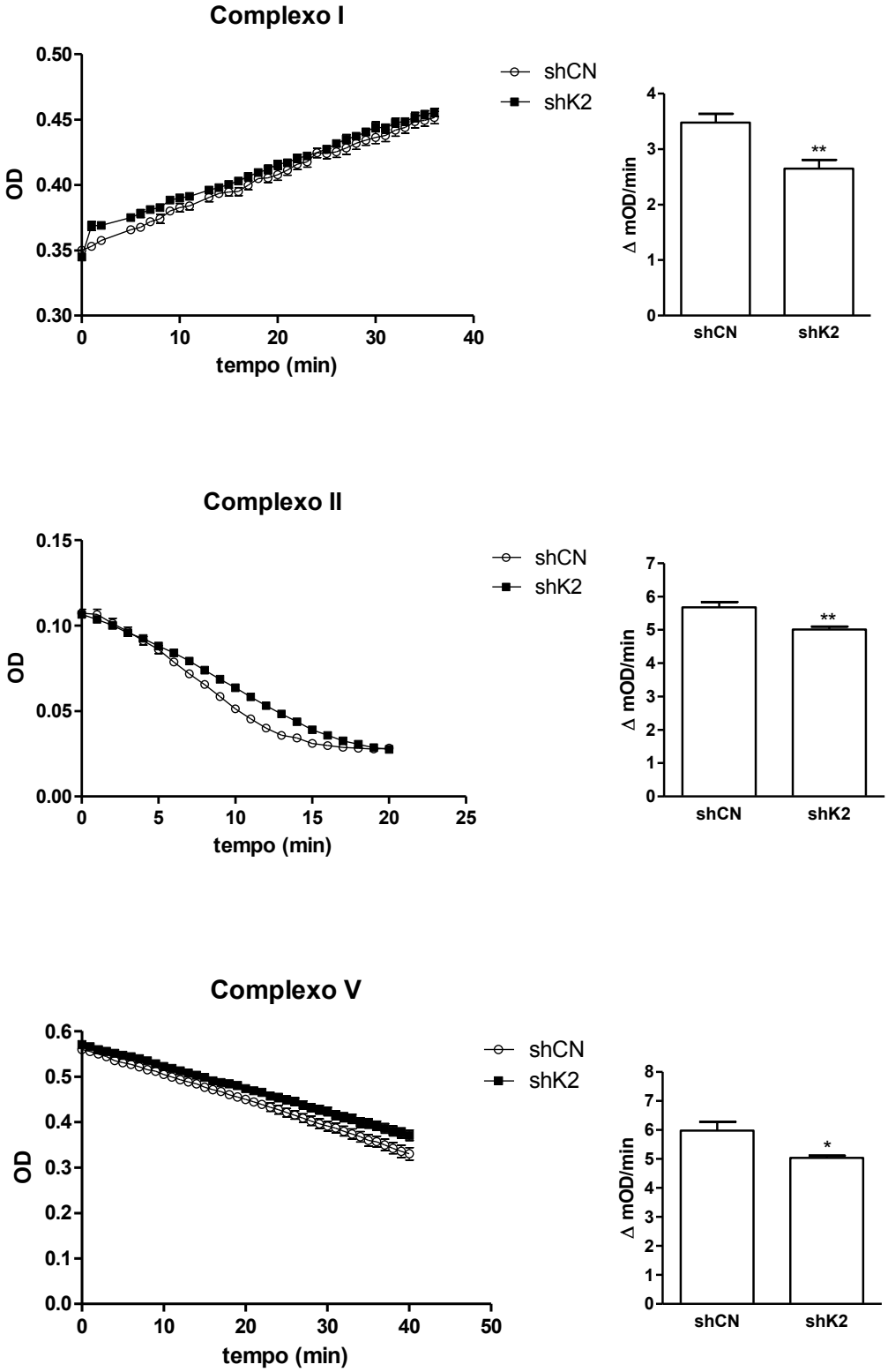

Figura 13. Determinação da atividade dos complexos I, II e V da cadeia respiratória mitocondrial em células HN13 com silenciamento de hnRNP K. Os gráficos representam a cinética de cada ensaio (curvas de variação da absorbância - OD) e a variação da aborvância em ΔmOD/min (barras). Os experimentos foram feitos em triplicata. *p<0,05, **p<0,01, comparado com controle, teste *t* não pareado.

4.5. Perfil de proteínas mitocondriais

As proteínas da fração mitocondrial foram analisadas por SDS-PAGE para identificar potenciais alterações nos níveis de proteína entre as células estudadas. As proteínas foram coradas com Coomassie G-250 (Figura 14). Foram observadas algumas diferenças entre as células HEK293, HN13 e CAL 27 e pequenas diferenças entre células controle e superexpressão ou redução de hnRNP K. Esta estratégia mostra o impacto de hnRNP K no nível de diferentes proteínas mitocondriais e também diferenças entre as linhagens celulares, principalmente entre HEK293 *vs* HN13 e CAL 27.

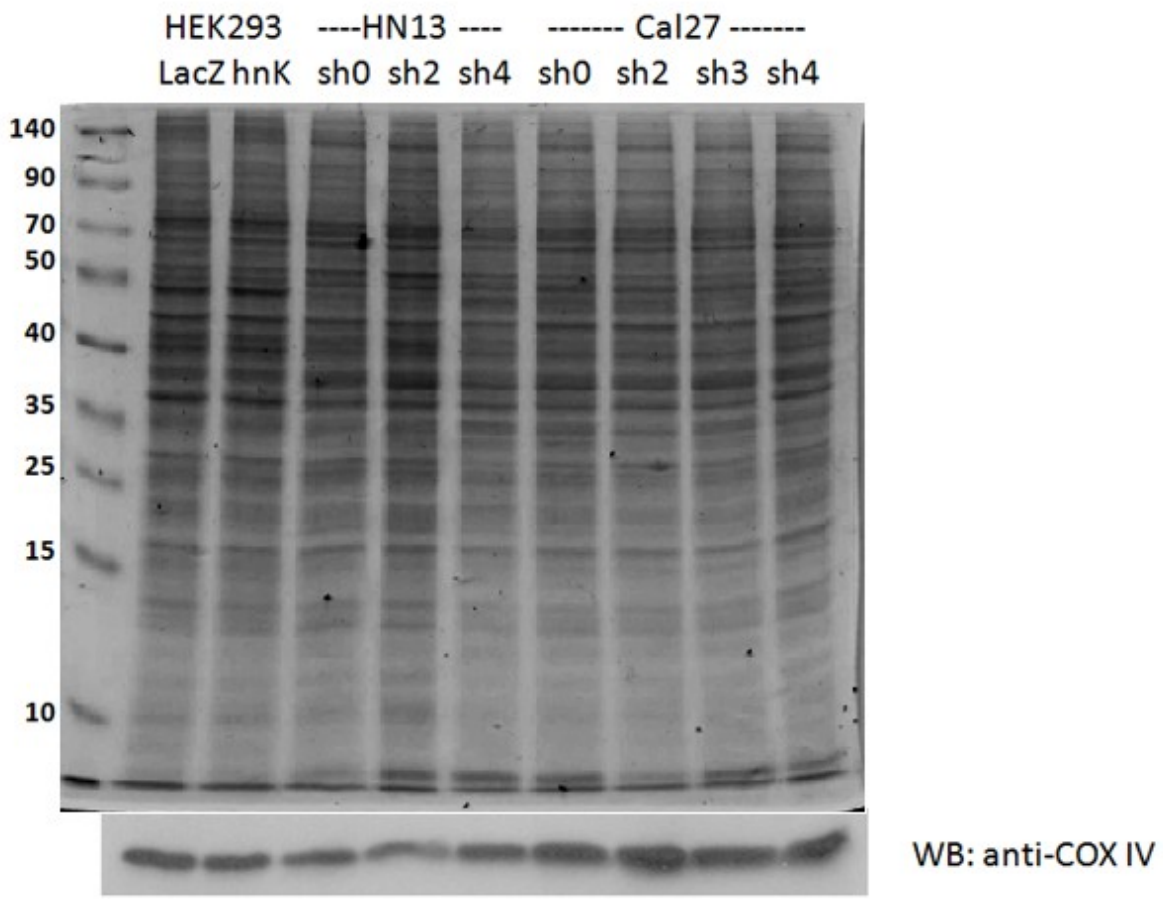

Figura 14. Imagem representativa de proteínas mitocondriais separadas por SDS-PAGE e coradas com coomassie G-250. Células HEK293 superexpressando Lacz ou hnRNPK e células HN13 e CAL 27 com redução de hnRNP K foram lisadas e as proteínas extraídas com kit de fracionamento subcelular. As frações de proteínas mitocondriais foram resolvidas em 12% SDS-PAGE e coradas com solução de coomassie-G250 0,12%. As amostras foram também imunomarcadas com o anticorpo para COX IV por ensaio de *Western blotting* (inferior).

4.6. Identificação de potenciais proteínas ligantes à hnRNP K

Inicialmente, buscou-se identificar novas interações proteína-proteína da hnRNP K. A análise por espectrometria de massas de amostras obtidas de ensaio de co-IP com anti-hnRNP K identificou 159 proteínas como potenciais ligantes da hnRNP K, excluindo contaminantes como BSA e proteína G (Tabela S1, em anexos). Para eliminar interações inespecíficas do ensaio foi realizada co-IP utilizando imunoglobulina normal de camundongo (controle negativo), e deste foram identificadas 130 proteínas. As proteínas encontradas em ambas as amostras (controle e co-IP) foram desconsideradas e ao final foram analisadas 57 proteínas que se ligam especificamente a hnRNP K (Tabela S2, em anexos). Algumas das proteínas identificadas no trabalho foram descritas como ligantes de hnRNP K, como histonas e outras ribonucleoproteínas, como mostra a Tabela 3. Outras proteínas ainda não haviam sido descritas como parceiras de hnRNP K, como por exemplo granulina, proteína associada a receptor de hormônio da tireóide (THRAP3), fator de transcrição associada a BCL-2 1 (BTF), proteína transportadora de proteína SEC16A, proteína com repetição de domínio pentatricopeptídeo 3 (PTCD3), proteína ácido solúvel de cérebro 1 (BASP1), proteína contendo domínio zinc finger CCCH 4 (ZC3H4) e outras ribonucleoproteínas e proteínas ribossomais (Tabela 3).

Análises das proteínas imunoprecipitadas em relação à localização celular e funções moleculares, utilizando a ferramenta GOEx, está representada na Figura 15.

Tabela 3. Lista resumida de proteínas que se ligam especificamente à hnRNP K identificadas através de ensaio de co-IP no presente trabalho. Células HEK293 foram lisadas e co-IP utilizando o anticorpo anti-hnRNP K. Proteínas eluídas foram digeridas com tripsina e analisadas por espectrometria de massa. Os resultados foram analisados utilizando o software SEPro e comparados com a co-IP utilizando IgG normal (controle negativo). O ensaio foi feito em duplicata e foram consideradas apenas as proteínas encontradas nos dois experimentos. A lista abaixo representa proteínas encontradas apenas na co-IP hnRNP K, seu sinal total (número de vezes que peptídeos da proteína foram identificados) e trabalhos que já descreveram tais interações.

Proteínas parceiras de hnRNP K		Sinal total	Referências
Thyroid hormone receptor-associated protein 3 (THRAP3)		28	*
Bcl-2 associated transcription factor 1 (BTF) (2 isoformas)		22	*
hnRNP L		19	Kim *et al.*, 2000
Zinc finger CCCH domain-containing protein 4 (ZC3H4)		11	*
hnRNP H2		10	*
DEAD Box protein 17 (DDX17) (2 isoformas)		10	Mikula *et al.*, 2006
60S ribosomal	Proteina P1	8	*
	Proteina L6 (2 isoformas)	6	*
	Proteina L3 (4 isoformas)	5	*
	Proteina L31 (6 isoformas)	4	Mikula *et al.*, 2006
Serine/arginine-rich splicing factor 1 (SRSF1)		8	*
Granulin (GRN)		7	*
28S ribossomal, mitocondrial	Protein S31	7	*
	Protein S29 (3 isoformas)	4	*
Pentatricopeptide repeat-containig protein 3, mitocondrial (PTCD3)		7	*
Histona H2A (12 subtipos)		6	Mikula *et al.*, 2006
40S ribosomal proteina S9		6	*
Actina	Cytoplasmic (5 isoformas)	5	Mikula *et al.*, 2006
	Skeletal muscle (2 isoformas)	5	Mikula *et al.*, 2006
	Cardiac muscle (2 isoformas)	5	*
	Smooth muscle (2 isoformas)	5	*
Protein transport protein SEC16A (3 isoformas)		5	*
Brain acid soluble protein 1 (BASP1)		5	*
Splicing factor proline- and glutamine- rich (SFPQ)		4	Mikula *et al.*, 2006

* Essas proteínas não foram identificadas em trabalhos prévios.

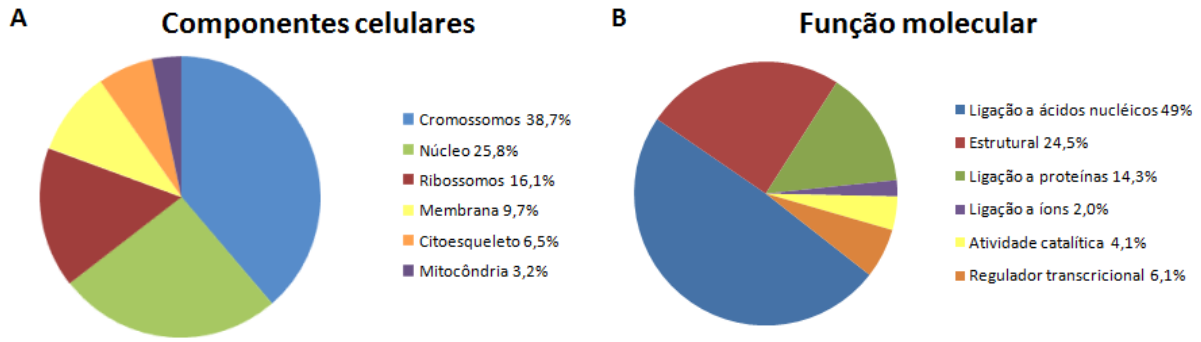

Figura 15. Análise das proteínas identificadas como ligantes de hnRNP K utilizando o programa PatternLab. Os diagramas representam as proteínas divididas de acordo com (A) localização celular e (B) função molecular, como determinado pelo módulo *Gene Ontology Explorer*.

Para validar os resultados obtidos na análise proteômica foram feitos ensaios de imunodetecção das amostras de co-IP com os anticorpos para hnRNP K, fator de transcrição Y-box 1 (YB1), fator de *splicing* rico em prolina e glutamina (SFPQ/PSF) e PTCD3. As duas primeiras proteínas foram selecionadas devido às suas funções em transcrição e *splicing* cujas funções são também associadas a hnRNP K com grande impacto na tumorigênese, enquanto PTCD3 foi escolhido por ser um novo parceiro de hnRNP K. As amostras imunoprecipitadas com os anticorpos anti-YB1, anti-PSF e anti-PTCD3 tiveram marcação positiva para a proteína hnRNP K (Figura 16A); da mesma forma, amostras de co-IP com anti-hnRNP K também tiveram marcação positiva para as proteínas YB1, PSF e PTCD3, tanto em células HEK293 (Figura 16B) quanto em linhagem tumoral HN13 (Figura 16C), confirmando a interação proteína-proteína destas com a hnRNP K.

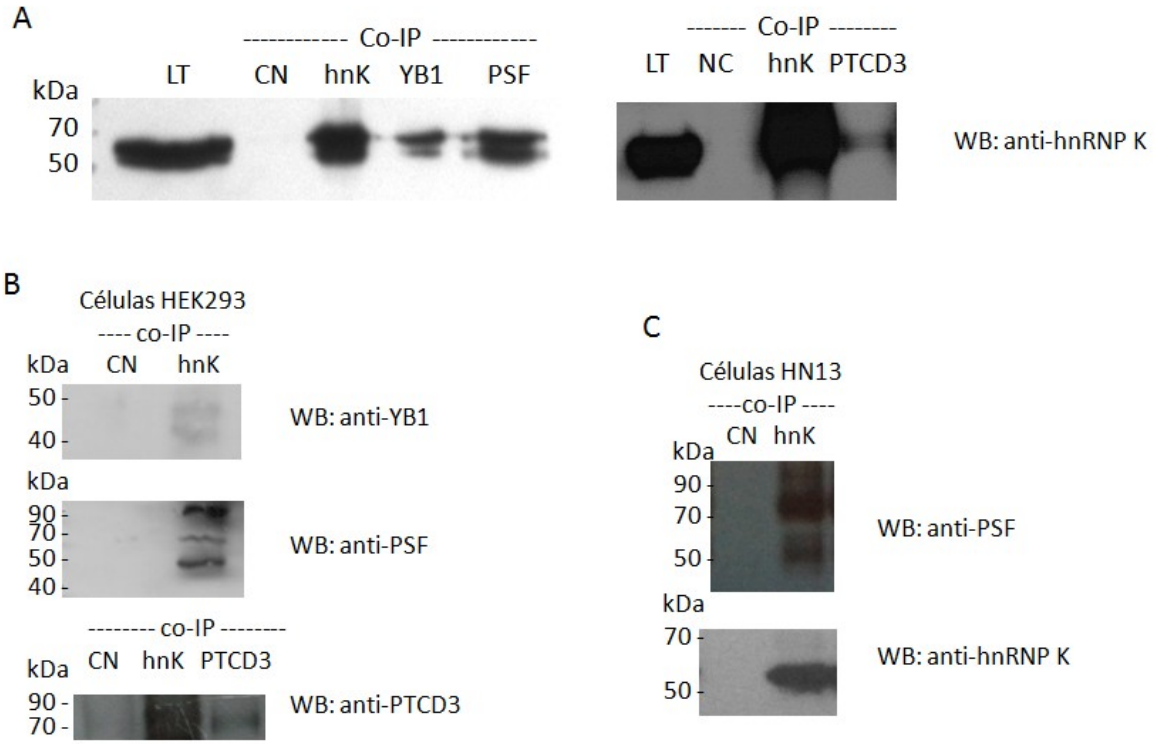

Figura 16. Imunomarcação de proteínas identificadas por espectrometria de massa como ligantes de hnRNP K. (A) Proteínas das células HEK293 foram imunoprecipitadas com imunoglobulina normal de camundongo (CN) ou com anticorpos para hnRNP K (hnK), YB1, PSF e PTCD3, e as proteínas eluídas da co-IP foram imunomarcadas com o anticorpo para hnRNP K. Uma amostra de lisado total protéico (LT, 10µg) serviu como controle da imunomarcação. (B) Co-IP em células HEK293 utilizando anticorpo para hnRNP K e imunomarcação com os anticorpos para PSF, YB1 e PTCD3. (C) Co-IP em células HN13 utilizando anticorpo para hnRNP K e imunomarcação com os anticorpos para PSF e para hnRNP K.

5. Discussão

5. DISCUSSÃO

Dados anteriores do nosso grupo mostraram diminuição na proliferação de células de carcinoma de cabeça e pescoço com redução de hnRNP K usando *small interference* RNA e o corante brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT) (Matos-Silva, 2009). Entretanto, no presente estudo não obtivemos alteração significativa na proliferação celular usando ensaio de BrdU em células de câncer de cabeça e pescoço com shRNA para hnRNP K, o que sugere uma potencial ação da hnRNP K na mitocôndria, visto que o MTT depende da atividade de enzimas óxido redutase dependentes de NAD(P)H e da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial (Berridge e Tan, 1993).

Éxistem lacunas no conhecimento sobre o papel de hnRNP K na mitocôndria e no desenvolvimento e progressão do câncer de cabeça e pescoço, sendo assim buscamos no presente trabalho evidências do efeito do acúmulo da hnRNP K em parâmetros mitocondriais relacionados a energética. Para atingir o objetivo foram utilizadas células não tumorais com expressão aumentada de hnRNP K e linhagens de câncer de cabeça e pescoço com redução nos níveis protéicos de hnRNP K. Este é o primeiro estudo a mostrar que a superexpressão da hnRNP K em células não tumorais altera parâmetros mitocondriais (Tabela 4), o que sugere seu papel no desvio do metabolismo energético de oxidativo para anaeróbico, como proposto por Warburg em câncer (Warburg, 1966).

Para analisar o impacto da redução de hnRNP K em células tumorais foram utilizadas três diferentes sequências de shRNAs, que tiveram eficiência diferente no silenciamento de hnRNP K. As duas linhagens tumorais com hnRNP K reduzida utilizadas no trabalho apresentaram diferentes comportamentos mitocondriais, mas isto é esperado uma vez que cada linhagem contém mutações e alterações específicas que podem levar a diferentes respostas (Tabela 4). A linhagem CAL 27, por exemplo, não apresentou diferenças significativas nos parâmetros avaliados, com exceção do potencial de membrana mitocondrial, que se mostrou aumentado em relação ao controle apenas nas células com redução leve no nível da hnRNP K. Diferentemente, a linhagem HN13 com silenciamento de hnRNP K apresentou redução no nível de ATP e de lactato liberado, de forma proporcional à redução da hnRNP K na célula. Além disso, células HN13 com maior redução dos níveis de hnRNP K apresentaram maior redução na captação de glicose, aumento no

consumo de O_2 e menor atividade dos complexos mitocondriais (Tabela 4). Estes dados confirmam mais uma vez o efeito do acúmulo da hnRNP K na mitocôndria, com impacto na energética da célula tumoral.

Tabela 4. Parâmetros bioenergéticos determinados em células com aumento ou redução de hnRNP K, em relação a seus respectivos controles. Foram analisadas células HEK293 com superexpressão de hnRNP K (HEK293/hnK) e células HN13 e CAL 27 com redução de hnRNP K (HN13/shK2; HN13/shK4; CAL 27/shK2; CAL 27/shK3). As linhas indicam a expressão da proteína hnRNP K, níveis celulares de ATP, potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi m$), consumo de O_2, liberação de lactato para o meio extracelular, captação de glicose e atividade dos complexos mitocondriais I, II e V.

	HEK293/hnK	HN13/shK2	HN13/shK4	CAL 27/shK2	CAL 27/shK3
hnRNP K (proteína)	↑	↓↓	↓	↓↓	↓
ATP	↑	↓↓	↓	ns	ns
$\Delta\Psi m$	↓	ns	↓	ns	↑
O_2	↓	↑	ns	ns	ns
Lactato	↑	↓↓	↓	ns	ns
Glicose	ns	↓	↑	ns	ns
Ativ. complexos mit.	-	↓	-	-	-

Símbolos representam: ↑ aumentado; ↓ reduzido; ns: sem alteração significativa; - : não foi realizado o ensaio.

Os nossos resultados mostraram uma associação positiva entre o nível de hnRNP K e o nível de ATP na célula. Níveis alterados de ATP intracelular têm sido encontrados em alguns tipos de tumores. Por exemplo, células de carcinoma de cólon quimiorresistentes apresentam glicólise aeróbica aumentada, com níveis mais elevados de ATP intracelular e aumento da expressão de HIF-1α, apesar da produção ineficiente de ATP pela mitocôndria, Esses dados sugerem que o acúmulo de ATP nas células tumorais apresenta uma função protetora contra o estresse genotóxico (Zhou *et al.*, 2012). Ainda, o bloqueio da glicólise pode diminuir a progressão e invasão tumoral e aumentar a eficiência de agentes quimioterápicos e radioterápicos (Xu *et al.*, 2005; Furtado *et al.*, 2012).

Sob condições de estresse utilizando os agentes puromicina, arsenito e sorbitol, observou-se que a depleção de hnRNP K por RNA de interferência promove redução dos níveis de ATP celular de maneira dose dependente. O efeito protetor de hnRNP K possivelmente se dá por meio da ligação da proteína a RNAs alvo que são necessários para a manutenção dos níveis celulares de ATP sob condições de estresse (Fukuda *et al.*, 2009).

Warburg observou que tecidos neoplásicos apresentam uma taxa respiratória relativamente baixa comparados com tecidos normais, e associou o metabolismo

aeróbico anormal no câncer ao comprometimento de funções energéticas da mitocôndria, sugerindo que esta mudança metabólica seria um importante evento para a tumorigênese (Warburg, 1956a; b). Assim, a redução no fluxo de O_2 nas células superexpressando hnRNP K pode estar associada a essas características, tendo em vista que células tumorais com redução na expressão de hnRNP K (HN13/shK2) tiveram aumento no consumo de O_2.

Estudos anteriores relataram redução do genoma mitocondrial em estágios avançados de carcinoma de próstata, que resultou na diminuição do consumo de O_2 e no seu acúmulo no interior das células (Cook *et al.*, 2012). Em neuroblastoma, foi descrito redução na atividade de todas as enzimas da cadeia respiratória, também associada à diminuição nas quantidades de DNA mitocondrial (Feichtinger *et al.*, 2010). Uma redução significativa no conteúdo de DNA mitocondrial e no número de mitocôndrias foram observados em células de hepatocarcinoma, revelando uma repressão na biogênese mitocondrial, embora em carcinoma renal e de cólon essas alterações não foram observadas (Cuezva *et al.*, 2002). Como hnRNP K modula os níveis de transcritos mitocondriais, reduzindo o tempo de meia-vida (Dzwonek, Mikula e Ostrowski, 2006), propomos que a alteração do consumo de O_2 observada no presente estudo está associada à expressão de hnRNP K nas células HEK293 e HN13. Tais evidências sugerem uma redução global no metabolismo aeróbico, que pode ser decorrente de redução do DNA e/ou RNA, mas não da massa mitocondrial (Feichtinger *et al.*, 2010). Essas observações poderiam justificar a pequena alteração no perfil de proteínas mitocondriais nas linhagens analisadas com níveis diferentes de hnRNP K, apesar das mudanças no perfil energético celular. Entretanto, há alteração evidente entre o perfil de proteínas mitocondriais entre HEK293 e células tumorais, o que deve suportar o comportamento mitocondrial diferente entre as linhagens.

A redução no potencial de membrana mitocondrial em células HEK293/hnRNP K, conforme observado no presente estudo, pode ter um papel protetor em células tumorais. Perda no potencial de membrana mitocondrial tem sido frequentemente associada com mudanças no status energético das células (Dimroth, Kaim e Matthey, 2000; Jeong *et al.*, 2004). Além disso, a mitocôndria é considerada importante fonte de espécies reativas de oxigênio (EROs) celular, inclusive no câncer (Pelicano, Carney e Huang, 2004). O vazamento induzido de prótons tem sido proposto como um dos principais mecanismos de ajuste do

potencial de membrana para o controle da produção de EROs mitocondrial. Assim, por meio de um leve desacoplamento, a mitocôndria pode evitar o excesso de elétrons e/ou equivalentes redutores nos complexos respiratórios e minimizar a redução parcial do O_2 (Mailloux e Harper, 2011). Nesse sentido, UCP2, que é regulada pela hnRNP K (Ostrowski *et al.*, 2004b), promove tal vazamento de elétrons, diminuindo assim a emissão de EROs pela mitocôndria e conferindo uma ação anti-apoptótica em células de carcinoma pulmonar (Deng *et al.*, 2012).

Células de leucemia co-cultivadas com células de estroma mesenquimal derivadas de medula óssea mostraram aumento da glicólise e da produção de lactato, e redução do potencial de membrana mitocondrial, acompanhado de aumento da expressão de UCP2. No entanto, a capacidade de consumo de O_2 de células leucêmicas não foi afetada, além delas se mostrarem menos sensíveis aos efeitos de dissipação do potencial de membrana por oligomicina (Samudio *et al.*, 2008). Embora nossos dados tenham mostrado redução no consumo de O_2 de células HEK293 superexpressando hnRNP K, em associação com maior expressão de UCP2 (dado não mostrado), esses dados poderiam explicar o comportamento de células HEK293/hnRNP K tratadas com oligomicina, as quais não apresentaram redução significativa no consumo de O_2 em relação ao consumo basal, e de células HN13 com leve redução na expressão de hnRNP K (clone shK4), as quais, apesar de não mostrarem alteração no consumo basal de O_2 quando comparadas com o controle, apresentaram menor queda no consumo de O_2 após exposição à oligomicina.

Em nossos estudos observamos uma correlação entre expressão de hnRNP K e liberação de lactato para o meio extracelular em células HEK293 e HN13. Nesse sentido, é bem documentada a associação existente entre níveis de lactato e pior prognóstico clínico em vários tipos de tumor (Dhup *et al.*, 2012). Além disso, altas concentrações de lactato estão associadas ao desenvolvimento de metástase em pacientes com câncer de cabeça e pescoço. Esse fenótipo mais agressivo pode implicar em resistência à radioterapia e estar associada à regulação positiva na expressão de genes associados a metástase (Brizel *et al.*, 2001).

O transporte de lactato na membrana celular em células tumorais é realizado por meio do transportador de monocarboxilato (MCT), principalmente pelas isoformas MCT1 e MCT4. A expressão de uma ou outra isoforma depende do perfil celular; estudos relatam expressão preferencial de MCT1 em células normóxicas

com potenciais oxidativos e de MCT4 em células glicolíticas/hipóxicas (Dhup *et al.*, 2012). Hipóxia pode conduzir o metabolismo celular à glicólise e produção de lactato, enquanto que períodos de oxigenação podem permitir que células tumorais utilizem o lactato em alta concentração. Assim, o tumor deve ser reconhecido como um ecossistema em evolução, adaptando-se constantemente à disponibilidade de oxigênio e nutrientes (Nakajima e Van Houten, 2013).

Em estudo utilizando três linhagens de câncer de mama com perfis de agressividade diferentes (não tumorigênica, tumorigênica e metastática), a produção de lactato e o consumo de glicose mostraram uma forte correlação positiva com agressividade; por outro lado, a atividade mitocondrial das linhagens mostrou uma tendência oposta. De forma interessante, os níveis celulares de ATP mantiveram-se elevados nas três linhagens, sugerindo que células com menor eficiência glicolítica compensam com maior metabolismo mitocondrial (Zancan *et al.*, 2010). Em nossos estudos observamos uma tendência ao aumento do consumo de glicose em células HEK293 com expressão aumentada de hnRNP K, assim como uma redução da captação de glicose em células HN13/shK2, o que sugere que hnRNP K apresenta um papel relevante no consumo de glicose em células tumorais.

Células em proliferação preferem a via glicolítica para produção de ATP devido à abundante oferta de glicose no meio extracelular. Nesse caso, embora a produção de ATP por glicose consumida seja baixa, o fluxo glicolítico pode ser rápido o suficiente para exceder a taxa de produção pela fosforilação oxidativa (Guppy, Greiner e Brand, 1993). O aumento da captação de glicose constitui uma vantagem para o crescimento tumoral (Kroemer e Pouyssegur, 2008). Além disso, o processo de glicólise fornece às células substratos intermediários para síntese de nucleotídeos, lipídeos e proteínas. Assim, o efeito Warburg beneficia tanto a bioenergética quanto a biossíntese celular (Deberardinis *et al.*, 2008).

A atividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial I, II e V na linhagem celular HN13 com shRNA para hnRNP K (HN13/shK2) mostrou-se diminuída nos três complexos analisados. Este é o primeiro relato que o acúmulo de hnRNP K em câncer de cavidade oral pode regular a cadeia de transporte de elétrons mitocondrial e ter potenciais implicações na sobrevivência das células e desenvolvimento de câncer. Portanto, utilizamos ensaios de co-imunoprecipitação para encontrar novas proteínas mitocondriais parceiras de hnRNPK que poderiam justificar esses achados.

São descritos mais de cem ligantes de hnRNP K, diretos ou indiretos, em várias organelas, tais como membrana plasmática, mitocôndria, citoplasma e núcleo (Bomsztyk, Denisenko e Ostrowski, 2004; Mikula *et al.*, 2006). O repertório de proteínas encontradas neste estudo com variadas funções demonstra o envolvimento da hnRNP K nos processos de expressão gênica em múltiplos níveis, tais como transcrição, *splicing* e estabilidade de RNA e tradução (Bomsztyk, Denisenko e Ostrowski, 2004). Algumas das proteínas identificadas no presente estudo já foram descritas como ligantes de hnRNP K, tais como YB1 (Shnyreva *et al.*, 2000), histonas (Mikula *et al.*, 2006) e outras ribonucleoproteínas (Kim *et al.*, 2000; Shnyreva *et al.*, 2000). A interação da hnRNP K foi identificada e confirmada no presente estudo, o que reforça a qualidade e a especificidade dos dados obtidos por co-IP e espectrometria de massas.

O fator de *splicing* rico em prolina e glutamina (PSF/SFPQ), um polipeptídeo de 100 kDa que possui especificidade por trechos de polipirimidina, foi previamente identificado por espectrometria de massas (Mikula *et al.*, 2006), mas ainda não validado como ligante de hnRNP K. A interação entre hnRNP K e PSF foi confirmada usando co-IP e *Western blotting*, o que validou a estratégia de identificação usada no presente trabalho e reforça o potencial das novas proteínas identificadas serem novos parceiros ou ligantes de hnRNP K.

A proteína com repetição de domínio pentatricopeptídeo 3 (PTCD3) foi identificada como um novo ligante de hnRNP K e validada a interação usando *Western blotting*. PTCD3 é uma proteína de 79 kDa associada à subunidade menor de ribossomos da mitocôndria (Koc e Spremulli, 2003; Koc *et al.*, 2013). A associação de PTCD3 com a subunidade menor é considerada importante na tradução de proteínas mitocondriais (Davies *et al.*, 2009). Além disso, PTCD3 é uma das proteínas que interagem com o fator de iniciação mitocondrial 3 (Haque *et al.*, 2011). A diminuição no nível de PTCD3 leva a uma redução na tradução de proteínas codificadas na mitocôndria e a um declínio na atividade dos complexos III e IV da cadeia de transporte de elétrons, e consequentemente a uma redução na respiração mitocondrial (Davies et al, 2009). Nossa hipótese é que a interação hnRNP K-PTCD3 influencia a função de PTCD3. De fato, quando hnRNP K foi silenciada em células HN13, foi encontrada diminuição da atividade dos complexos mitocondriais I, II e V, o que sugere uma relação direta entre as duas proteínas com ação na atividade da cadeia respiratória.

O efeito Warburg em células tumorais pode ser explicado pelo mecanismo de adaptação celular ao microambiente de hipóxia onde se desenvolve o tumor, envolvendo efeitos diretos ou indiretos de HIF-1α sobre a bioenergética mitocondrial, ou ainda por mutações em oncogenes e proteínas relacionadas com as vias de transdução de sinal (myc, Akt e mTOR), as quais promovem mudanças na expressão de genes envolvidos no metabolismo energético celular (Ortega *et al.*, 2009). Levando-se em consideração que hnRNP K pode estar envolvida nos processos de expressão gênica e estabilidade de RNAm de proteínas tais como c-myc (Notari *et al.*, 2006) e p53 (Moumen *et al.*, 2005; Moumen *et al.*, 2013), as alterações observadas no presente estudo podem envolver alterações nos níveis e atividades dessas proteínas, cujo status deverá ser objeto de futuros estudos.

6. Conclusões

6. CONCLUSÕES

O dados obtidos neste estudo permitem as seguintes conclusões:

1. A proteína hnRNP K influencia o metabolismo, favorecendo a glicólise em relação à fosforilação oxidativa;
2. Novos potenciais ligantes da hnRNP K foram identificados por co-imunoprecipitação e espectrometria de massas, sendo dois deles validados por *Western blotting*: PSF e PTCD3;
3. hnRNP K regula o nível e atividade dos complexos I, II e V da cadeia respiratória mitocondrial e a interação hnRNP K-PTCD3 pode ter um importante papel nesta ação.

7. Referências bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ATTARDI, G.; SCHATZ, G. Biogenesis of mitochondria. **Annu Rev Cell Biol,** v. 4, p. 289-333, 1988. ISSN 0743-4634. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2461720 >.

BARBORO, P. et al. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K: altered pattern of expression associated with diagnosis and prognosis of prostate cancer. **Br J Cancer,** v. 100, n. 10, p. 1608-16, May 19 2009. ISSN 1532-1827 (Electronic). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19401687 >.

BENSAAD, K. et al. TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis. **Cell,** v. 126, n. 1, p. 107-20, Jul 2006. ISSN 0092-8674. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16839880 >.

BERRIDGE, M. V.; TAN, A. S. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. **Arch Biochem Biophys,** v. 303, n. 2, p. 474-82, Jun 1993. ISSN 0003-9861. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8390225 >.

BOMSZTYK, K.; DENISENKO, O.; OSTROWSKI, J. hnRNP K: one protein multiple processes. **Bioessays,** v. 26, n. 6, p. 629-38, Jun 2004. ISSN 0265-9247. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15170860 >.

BONUCCELLI, G. et al. Ketones and lactate "fuel" tumor growth and metastasis: Evidence that epithelial cancer cells use oxidative mitochondrial metabolism. **Cell Cycle,** v. 9, n. 17, p. 3506-14, Sep 2010. ISSN 1551-4005. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20818174 >.

BRIZEL, D. M. et al. Elevated tumor lactate concentrations predict for an increased risk of metastases in head-and-neck cancer. **Int J Radiat Oncol Biol Phys,** v. 51, n. 2, p. 349-53, Oct 2001. ISSN 0360-3016. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11567808 >.

CARDINALI, M. et al. Tyrosine phosphorylation as a marker for aberrantly regulated growth-promoting pathways in cell lines derived from head and neck malignancies. **Int J Cancer,** v. 61, n. 1, p. 98-103, Mar 29 1995. ISSN 0020-7136 (Print). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7705939 >.

CARPENTER, B. et al. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K is over expressed, aberrantly localised and is associated with poor prognosis in colorectal cancer. **British Journal of Cancer,** v. 95, n. 7, p. 921-927, Oct 2006. ISSN 0007-0920. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000241079700022 >.

CARVALHO, P. C. et al. Search engine processor: Filtering and organizing peptide spectrum matches. **Proteomics,** v. 12, n. 7, p. 944-9, Apr 2012. ISSN 1615-9861. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22311825 >.

CARVALHO, P. C.; YATES III, J. R.; BARBOSA, V. C. Analyzing shotgun proteomic data with PatternLab for proteomics. **Curr Protoc Bioinformatics,** v. Chapter 13, p. Unit 13.13.1-15, Jun 2010. ISSN 1934-340X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20521246 >.

CHATTERJEE, A.; MAMBO, E.; SIDRANSKY, D. Mitochondrial DNA mutations in human cancer. **Oncogene,** v. 25, n. 34, p. 4663-74, Aug 2006. ISSN 0950-9232. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16892080 >.

CHEN, G. I.; GINGRAS, A. C. Affinity-purification mass spectrometry (AP-MS) of serine/threonine phosphatases. **Methods,** v. 42, n. 3, p. 298-305, Jul 2007. ISSN 1046-2023. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17532517 >.

CHEN, J. et al. Proteomics of buccal squamous cell carcinoma: the involvement of multiple pathways in tumorigenesis. **Proteomics,** v. 4, n. 8, p. 2465-75, Aug 2004. ISSN 1615-9853. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15274141 >.

CHEN, L. C. et al. Heterogeneous ribonucleoprotein K and thymidine phosphorylase are independent prognostic and therapeutic markers for nasopharyngeal carcinoma. **Clinical Cancer Research,** v. 14, n. 12, p. 3807-3813, Jun 2008. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000256779100026 >.

_____. Thymidine phosphorylase mRNA stability and protein levels are increased through ERK-mediated cytoplasmic accumulation of hnRNP K in nasopharyngeal carcinoma cells. **Oncogene,** v. 28, n. 17, p. 1904-15, Apr 2009. ISSN 1476-5594. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19330019 >.

CHENG, J. Q. et al. Transforming activity and mitosis-related expression of the AKT2 oncogene: evidence suggesting a link between cell cycle regulation and

oncogenesis. **Oncogene,** v. 14, n. 23, p. 2793-801, Jun 1997. ISSN 0950-9232. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9190895 >.

CLERKIN, J. S. et al. Mechanisms of ROS modulated cell survival during carcinogenesis. **Cancer Lett,** v. 266, n. 1, p. 30-6, Jul 2008. ISSN 0304-3835. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18372105 >.

COOK, C. C. et al. Consumption of oxygen: a mitochondrial-generated progression signal of advanced cancer. **Cell Death Dis,** v. 3, p. e258, 2012. ISSN 2041-4889. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22258408 >.

CUEZVA, J. M. et al. The bioenergetic signature of cancer: a marker of tumor progression. **Cancer Res,** v. 62, n. 22, p. 6674-81, Nov 2002. ISSN 0008-5472. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12438266 >.

CURADO, M. P.; HASHIBE, M. Recent changes in the epidemiology of head and neck cancer. **Curr Opin Oncol,** v. 21, n. 3, p. 194-200, May 2009. ISSN 1531-703X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19363341 >.

CYPHERT, T. J. et al. Starvation actively inhibits splicing of glucose-6-phosphate dehydrogenase mRNA via a bifunctional ESE/ESS element bound by hnRNP K. **Biochim Biophys Acta,** v. 1829, n. 9, p. 905-15, Sep 2013. ISSN 0006-3002. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23631859 >.

DANG, C. V. et al. The interplay between MYC and HIF in cancer. **Nat Rev Cancer,** v. 8, n. 1, p. 51-6, Jan 2008. ISSN 1474-1768. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18046334 >.

DAVIES, S. M. K. et al. Pentatricopeptide repeat domain protein 3 associates with the mitochondrial small ribosomal subunit and regulates translation. **Febs Letters,** v. 583, n. 12, p. 1853-1858, Jun 2009. ISSN 0014-5793. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000267797800007 >.

DEBERARDINIS, R. J. et al. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. **Cell Metab,** v. 7, n. 1, p. 11-20, Jan 2008. ISSN 1550-4131. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18177721 >.

DENG, S. et al. UCP2 inhibits ROS-mediated apoptosis in A549 under hypoxic conditions. **PLoS One,** v. 7, n. 1, p. e30714, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22292025 >.

DHUP, S. et al. Multiple biological activities of lactic acid in cancer: influences on tumor growth, angiogenesis and metastasis. **Curr Pharm Des,** v. 18, n. 10, p. 1319-30, 2012. ISSN 1873-4286. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22360558 >.

DIMROTH, P.; KAIM, G.; MATTHEY, U. Crucial role of the membrane potential for ATP synthesis by F(1)F(o) ATP synthases. **J Exp Biol,** v. 203, n. Pt 1, p. 51-9, Jan 2000. ISSN 0022-0949. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10600673 >.

DREYFUSS, G.; KIM, V. N.; KATAOKA, N. Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry. **Nat Rev Mol Cell Biol,** v. 3, n. 3, p. 195-205, Mar 2002. ISSN 1471-0072. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11994740 >.

DZWONEK, A.; MIKULA, M.; OSTROWSKI, J. The diverse involvement of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K in mitochondrial response to insulin. **FEBS Lett,** v. 580, n. 7, p. 1839-45, Mar 2006. ISSN 0014-5793. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16519889 >.

FEICHTINGER, R. G. et al. Low aerobic mitochondrial energy metabolism in poorly- or undifferentiated neuroblastoma. **BMC Cancer,** v. 10, p. 149, 2010. ISSN 1471-2407. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20398431 >.

FISCHER, J. E. S. et al. Dynamic proteomic overview of glioblastoma cells (A172) exposed to perillyl alcohol. **J Proteomics,** v. 73, n. 5, p. 1018-27, Mar 2010. ISSN 1876-7737. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20083244 >.

FORASTIERE, A. et al. Head and neck cancer. **N Engl J Med,** v. 345, n. 26, p. 1890-900, Dec 2001. ISSN 0028-4793. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11756581 >.

FUKUDA, T. et al. hnRNP K interacts with RNA binding motif protein 42 and functions in the maintenance of cellular ATP level during stress conditions. **Genes Cells,** v. 14, n. 2, p. 113-28, Feb 2009. ISSN 1365-2443. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19170760 >.

FURTADO, C. M. et al. Clotrimazole preferentially inhibits human breast cancer cell proliferation, viability and glycolysis. **PLoS One,** v. 7, n. 2, p. e30462, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22347377 >.

GALLUZZI, L. et al. Mitochondrial gateways to cancer. **Mol Aspects Med,** v. 31, n. 1, p. 1-20, Feb 2010. ISSN 1872-9452. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19698742 >.

GILLIES, R. J.; GATENBY, R. A. Adaptive landscapes and emergent phenotypes: why do cancers have high glycolysis? **J Bioenerg Biomembr,** v. 39, n. 3, p. 251-7, Jun 2007. ISSN 0145-479X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17624581 >.

GIOANNI, J. et al. Two new human tumor cell lines derived from squamous cell carcinomas of the tongue: establishment, characterization and response to cytotoxic treatment. **Eur J Cancer Clin Oncol,** v. 24, n. 9, p. 1445-55, Sep 1988. ISSN 0277-5379. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3181269 >.

GRAHAM, F. L. et al. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. **J Gen Virol,** v. 36, n. 1, p. 59-74, Jul 1977. ISSN 0022-1317. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/886304 >.

GUPPY, M.; GREINER, E.; BRAND, K. The role of the Crabtree effect and an endogenous fuel in the energy metabolism of resting and proliferating thymocytes. **Eur J Biochem,** v. 212, n. 1, p. 95-9, Feb 1993. ISSN 0014-2956. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8444168 >.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell,** v. 100, n. 1, p. 57-70, Jan 2000. ISSN 0092-8674. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10647931 >.

_____. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell,** v. 144, n. 5, p. 646-74, Mar 2011. ISSN 1097-4172. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21376230 >.

HAQUE, M. E. et al. Contacts between mammalian mitochondrial translational initiation factor 3 and ribosomal proteins in the small subunit. **Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics,** v. 1814, n. 12, p. 1779-1784, Dec 2011. ISSN 1570-9639. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000298363200021 >.

HE, Q. Y. et al. Identification of tumor-associated proteins in oral tongue squamous cell carcinoma by proteomics. **Proteomics,** v. 4, n. 1, p. 271-8, Jan 2004. ISSN 1615-9853. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14730689 >.

HÖCKEL, M.; VAUPEL, P. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. **J Natl Cancer Inst,** v. 93, n. 4, p. 266-76, Feb 2001. ISSN 0027-8874. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11181773 >.

INDO, H. P. et al. Evidence of ROS generation by mitochondria in cells with impaired electron transport chain and mitochondrial DNA damage. **Mitochondrion,** v. 7, n. 1-2, p. 106-18, 2007 Feb-Apr 2007. ISSN 1567-7249. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17307400 >.

INOUE, A. et al. Loss-of-function screening by randomized intracellular antibodies: identification of hnRNP-K as a potential target for metastasis. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 104, n. 21, p. 8983-8, May 2007. ISSN 0027-8424. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17483488 >.

IWAKUMA, T.; LOZANO, G. MDM2, an introduction. **Mol Cancer Res,** v. 1, n. 14, p. 993-1000, Dec 2003. ISSN 1541-7786. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14707282 >.

JEONG, D. W. et al. Modification of glycolysis affects cell sensitivity to apoptosis induced by oxidative stress and mediated by mitochondria. **Biochem Biophys Res Commun,** v. 313, n. 4, p. 984-91, Jan 2004. ISSN 0006-291X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14706639 >.

JIANG, L. et al. CAL 27 is an oral adenosquamous carcinoma cell line. **Oral Oncol,** v. 45, n. 11, p. e204-7, Nov 2009. ISSN 1368-8375. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19631575 >.

KIM, J. H. et al. Protein-protein interaction among hnRNPs shuttling between nucleus and cytoplasm. **Journal of Molecular Biology,** v. 298, n. 3, p. 395-405, May 2000. ISSN 0022-2836. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000086985100005 >.

KLIMEK-TOMCZAK, K. et al. Characterization of hnRNP K protein-RNA interactions. **J Mol Biol,** v. 342, n. 4, p. 1131-41, Sep 2004. ISSN 0022-2836. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15351640 >.

KOC, E. C. et al. Identification and characterization of CHCHD1, AURKAIP1, and CRIF1 as new members of the mammalian mitochondrial ribosome. **Front Physiol,** v. 4, p. 183, 2013. ISSN 1664-042X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23908630 >.

KOC, E. C.; SPREMULLI, L. L. RNA-binding proteins of mammalian mitochondria. **Mitochondrion,** v. 2, n. 4, p. 277-91, Mar 2003. ISSN 1567-7249. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16120328 >.

KROEMER, G.; POUYSSEGUR, J. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. **Cancer Cell,** v. 13, n. 6, p. 472-82, Jun 2008. ISSN 1878-3686. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18538731 >.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature,** v. 227, n. 5259, p. 680-5, Aug 1970. ISSN 0028-0836. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5432063 >.

LAMBERT, A. J.; BRAND, M. D. Reactive oxygen species production by mitochondria. **Methods Mol Biol,** v. 554, p. 165-81, 2009. ISSN 1064-3745. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19513674 >.

LEOPOLDINO, A. M. et al. Sequence and transcriptional study of HNRPK pseudogenes, and expression and molecular modeling analysis of hnRNP K isoforms. **Genome,** v. 50, n. 5, p. 451-462, May 2007. ISSN 0831-2796. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000248591300004 >.

_____. SET protein accumulates in HNSCC and contributes to cell survival: Antioxidant defense, Akt phosphorylation and AVOs acidification. **Oral Oncol**, Jun 2012. ISSN 1368-8375. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22739068 >.

LIÈVRE, A. et al. Clinicopathological significance of mitochondrial D-Loop mutations in head and neck carcinoma. **Br J Cancer,** v. 94, n. 5, p. 692-7, Mar 2006. ISSN 0007-0920. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16495928 >.

LOBO, N. A. et al. The biology of cancer stem cells. **Annu Rev Cell Dev Biol,** v. 23, p. 675-99, 2007. ISSN 1081-0706. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17645413 >.

LYNCH, M. et al. hnRNP K binds a core polypyrimidine element in the eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) promoter, and its regulation of eIF4E contributes to neoplastic transformation. **Mol Cell Biol,** v. 25, n. 15, p. 6436-53, Aug 2005. ISSN 0270-7306. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16024782 >.

MAILLOUX, R. J.; HARPER, M. E. Uncoupling proteins and the control of mitochondrial reactive oxygen species production. **Free Radic Biol Med,** v. 51, n. 6,

p. 1106-15, Sep 2011. ISSN 1873-4596. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21762777 >.

MAKEYEV, A. V.; LIEBHABER, S. A. The poly(C)-binding proteins: a multiplicity of functions and a search for mechanisms. **RNA,** v. 8, n. 3, p. 265-78, Mar 2002. ISSN 1355-8382. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12003487 >.

MARBACH, E. P.; WEIL, M. H. Rapid enzymatic measurement of blood lactate and pyruvate. Use and significance of metaphosphoric acid as a common precipitant. **Clin Chem,** v. 13, n. 4, p. 314-25, Apr 1967. ISSN 0009-9147. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6036716 >.

MATOBA, S. et al. p53 regulates mitochondrial respiration. **Science,** v. 312, n. 5780, p. 1650-3, Jun 2006. ISSN 1095-9203. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16728594 >.

MATOS-SILVA, F. A. **Estudos das proteínas hnRNP K, SET e MARK3 como potenciais marcadores de prognóstico em câncer epidermóide de cabeça e pescoço (HNSCC).** 2009. (Dissertação (Mestrado)). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto/SP.

MATTA, A. et al. Heterogeneous ribonucleoprotein K is a marker of oral leukoplakia and correlates with poor prognosis of squamous cell carcinoma. **Int J Cancer,** v. 125, n. 6, p. 1398-406, Sep 2009. ISSN 1097-0215. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19548310 >.

MATUNIS, M. J.; MICHAEL, W. M.; DREYFUSS, G. Characterization and primary structure of the poly(C)-binding heterogeneous nuclear ribonucleoprotein complex K protein. **Mol Cell Biol,** v. 12, n. 1, p. 164-71, Jan 1992. ISSN 0270-7306. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1729596 >.

MICHELOTTI, E. F. et al. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K is a transcription factor. **Mol Cell Biol,** v. 16, n. 5, p. 2350-60, May 1996. ISSN 0270-7306 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8628302 >.

MIGNECO, G. et al. Glycolytic cancer associated fibroblasts promote breast cancer tumor growth, without a measurable increase in angiogenesis: evidence for stromal-epithelial metabolic coupling. **Cell Cycle,** v. 9, n. 12, p. 2412-22, Jun 2010. ISSN 1551-4005. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20562527 >.

MIKULA, M. et al. Landscape of the hnRNP K protein-protein interactome. **Proteomics,** v. 6, n. 8, p. 2395-2406, Apr 2006. ISSN 1615-9853. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000237398700009 >.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, I. N. D. C. I. **Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro 2013. Disponível em < http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/estimativa-24042014.pdf >.

MITHANI, S. K. et al. Mitochondrial mutations are a late event in the progression of head and neck squamous cell cancer. **Clin Cancer Res,** v. 13, n. 15 Pt 1, p. 4331-5, Aug 2007. ISSN 1078-0432. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17671113 >.

MOORE, C. B. et al. Short hairpin RNA (shRNA): design, delivery, and assessment of gene knockdown. **Methods Mol Biol,** v. 629, p. 141-58, 2010. ISSN 1940-6029. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20387148 >.

MOUMEN, A. et al. ATM-dependent phosphorylation of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K promotes p53 transcriptional activation in response to DNA damage. **Cell Cycle,** v. 12, n. 4, p. 698-704, Feb 2013. ISSN 1551-4005. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23343766 >.

_____. hnRNP K: an HDM2 target and transcriptional coactivator of p53 in response to DNA damage. **Cell,** v. 123, n. 6, p. 1065-78, Dec 2005. ISSN 0092-8674. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16360036 >.

NAKAJIMA, E. C.; VAN HOUTEN, B. Metabolic symbiosis in cancer: refocusing the Warburg lens. **Mol Carcinog,** v. 52, n. 5, p. 329-37, May 2013. ISSN 1098-2744. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22228080 >.

NOTARI, M. et al. A MAPK/HNRPK pathway controls BCR/ABL oncogenic potential by regulating MYC mRNA translation. **Blood,** v. 107, n. 6, p. 2507-2516, Mar 2006. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000236014200047 >.

ORTEGA, A. D. et al. Glucose avidity of carcinomas. **Cancer Lett,** v. 276, n. 2, p. 125-35, Apr 2009. ISSN 1872-7980. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18790562 >.

OSTHUS, R. C. et al. Deregulation of glucose transporter 1 and glycolytic gene expression by c-Myc. **J Biol Chem,** v. 275, n. 29, p. 21797-800, Jul 2000. ISSN 0021-9258. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10823814 >.

OSTROWSKI, J. et al. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K enhances insulin-induced expression of mitochondrial UCP2 protein. **J Biol Chem,** v. 279, n. 52, p. 54599-609, Dec 24 2004a. ISSN 0021-9258 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15485813 >.

_____. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K enhances insulin-induced expression of mitochondrial UCP2 protein. **Journal of Biological Chemistry,** v. 279, n. 52, p. 54599-54609, Dec 2004b. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000225793600086 >.

_____. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K protein associates with multiple mitochondrial transcripts within the organelle. **Journal of Biological Chemistry,** v. 277, n. 8, p. 6303-6310, Feb 2002. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000173989200081 >.

PAPANDREOU, I. et al. HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. **Cell Metab,** v. 3, n. 3, p. 187-97, Mar 2006. ISSN 1550-4131. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16517406 >.

PARKIN, D. M. et al. Global cancer statistics, 2002. **CA Cancer J Clin,** v. 55, n. 2, p. 74-108, 2005 Mar-Apr 2005. ISSN 0007-9235. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15761078 >.

PELICANO, H.; CARNEY, D.; HUANG, P. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. **Drug Resist Updat,** v. 7, n. 2, p. 97-110, Apr 2004. ISSN 1368-7646. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15158766 >.

PENTA, J. S. et al. Mitochondrial DNA in human malignancy. **Mutat Res,** v. 488, n. 2, p. 119-33, May 2001. ISSN 0027-5107. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11344040 >.

POZAROWSKI, P.; DARZYNKIEWICZ, Z. Analysis of cell cycle by flow cytometry. **Methods Mol Biol,** v. 281, p. 301-11, 2004. ISSN 1064-3745. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15220539 >.

PRIVES, C.; HALL, P. A. The p53 pathway. **J Pathol,** v. 187, n. 1, p. 112-26, Jan 1999. ISSN 0022-3417. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10341712 >.

RAGIN, C. C.; MODUGNO, F.; GOLLIN, S. M. The epidemiology and risk factors of head and neck cancer: a focus on human papillomavirus. **J Dent Res,** v. 86, n. 2, p. 104-14, Feb 2007. ISSN 0022-0345. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17251508 >.

REICHERT, A. S.; NEUPERT, W. Mitochondriomics or what makes us breathe. **Trends Genet,** v. 20, n. 11, p. 555-62, Nov 2004. ISSN 0168-9525. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15475115 >.

REVIL, T. et al. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K represses the production of the pro-apoptotic Bcl-xS splice isoform. **J Biol Chem**, Jun 11 2009. ISSN 0021-9258 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19520842 >.

RITCHIE, S. A. et al. Identification of the SRC pyrimidine-binding protein (SPy) as hnRNP K: implications in the regulation of SRC1A transcription. **Nucleic Acids Res,** v. 31, n. 5, p. 1502-13, Mar 1 2003. ISSN 1362-4962 (Electronic). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12595559 >.

SALATI, L. M.; AMIR-AHMADY, B. Dietary regulation of expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase. **Annu Rev Nutr,** v. 21, p. 121-40, 2001. ISSN 0199-9885. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11375432 >.

SAMUDIO, I. et al. The warburg effect in leukemia-stroma cocultures is mediated by mitochondrial uncoupling associated with uncoupling protein 2 activation. **Cancer Res,** v. 68, n. 13, p. 5198-205, Jul 2008. ISSN 1538-7445. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18593920 >.

SANDULACHE, V. C. et al. Glucose, not glutamine, is the dominant energy source required for proliferation and survival of head and neck squamous carcinoma cells. **Cancer,** v. 117, n. 13, p. 2926-38, Jul 2011. ISSN 1097-0142. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21692052 >.

SHIM, H. et al. c-Myc transactivation of LDH-A: implications for tumor metabolism and growth. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 94, n. 13, p. 6658-63, Jun 1997. ISSN 0027-8424. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9192621 >.

SHNYREVA, M. et al. Interaction of two multifunctional proteins - Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K and Y-box-binding protein. **Journal of Biological Chemistry,** v. 275, n. 20, p. 15498-15503, May 2000. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000087128300097 >.

SIOMI, H. et al. The pre-mRNA binding K protein contains a novel evolutionarily conserved motif. **Nucleic Acids Res,** v. 21, n. 5, p. 1193-8, Mar 1993. ISSN 0305-1048. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8464704 >.

SONVEAUX, P. et al. Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. **J Clin Invest,** v. 118, n. 12, p. 3930-42, Dec 2008. ISSN 0021-9738. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19033663 >.

STURGIS, E. M. International head and neck cancer epidemiology consortium: Update no. 14. **Head Neck**, Nov 2013. ISSN 1097-0347. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24243765 >.

SWANSON, M. S.; DREYFUSS, G. Classification and purification of proteins of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particles by RNA-binding specificities. **Mol Cell Biol,** v. 8, n. 5, p. 2237-41, May 1988. ISSN 0270-7306. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3386636 >.

THOMAS, P.; SMART, T. G. HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins. **J Pharmacol Toxicol Methods,** v. 51, n. 3, p. 187-200, 2005 May-Jun 2005. ISSN 1056-8719. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15862464 >.

TURRENS, J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **J Physiol,** v. 552, n. Pt 2, p. 335-44, Oct 2003. ISSN 0022-3751. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14561818 >.

VAN SEUNINGEN, I. et al. The K protein domain that recruits the interleukin 1-responsive K protein kinase lies adjacent to a cluster of c-Src and Vav SH3-binding sites. Implications that K protein acts as a docking platform. **J Biol Chem,** v. 270, n. 45, p. 26976-85, Nov 1995. ISSN 0021-9258. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7592945 >.

WARBURG, O. On respiratory impairment in cancer cells. **Science,** v. 124, n. 3215, p. 269-70, Aug 1956a. ISSN 0036-8075. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13351639 >.

_____. On the origin of cancer cells. **Science,** v. 123, n. 3191, p. 309-14, Feb 1956b. ISSN 0036-8075. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13298683 >.

WARBURG, O. H. **The prime cause and prevention of cancer - Part 1** 1966. Disponível em: < http://healingtools.tripod.com/primecause1.html/ >.

WEINBERG, F.; CHANDEL, N. S. Mitochondrial metabolism and cancer. **Ann N Y Acad Sci,** v. 1177, p. 66-73, Oct 2009. ISSN 1749-6632. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19845608 >.

WISE, D. R.; THOMPSON, C. B. Glutamine addiction: a new therapeutic target in cancer. **Trends Biochem Sci,** v. 35, n. 8, p. 427-33, Aug 2010. ISSN 0968-0004. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20570523 >.

XU, R. H. et al. Inhibition of glycolysis in cancer cells: a novel strategy to overcome drug resistance associated with mitochondrial respiratory defect and hypoxia. **Cancer Res,** v. 65, n. 2, p. 613-21, Jan 2005. ISSN 0008-5472. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15695406 >.

YAMAMOTO, N. et al. A nonradioisotope, enzymatic assay for 2-deoxyglucose uptake in L6 skeletal muscle cells cultured in a 96-well microplate. **Anal Biochem,** v. 351, n. 1, p. 139-45, Apr 2006. ISSN 0003-2697. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16442489 >.

ZANCAN, P. et al. Differential expression of phosphofructokinase-1 isoforms correlates with the glycolytic efficiency of breast cancer cells. **Mol Genet Metab,** v. 100, n. 4, p. 372-8, Aug 2010. ISSN 1096-7206. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20483646 >.

ZHOU, R. et al. Increased expression of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K in pancreatic cancer and its association with the mutant p53. **Int J Cancer,** v. 126, n. 2, p. 395-404, Jan 2010. ISSN 1097-0215. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19609950 >.

ZHOU, S. et al. Frequency and phenotypic implications of mitochondrial DNA mutations in human squamous cell cancers of the head and neck. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 104, n. 18, p. 7540-5, May 2007. ISSN 0027-8424. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17456604 >.

ZHOU, Y. et al. Intracellular ATP levels are a pivotal determinant of chemoresistance in colon cancer cells. **Cancer Res,** v. 72, n. 1, p. 304-14, Jan 2012. ISSN 1538-7445. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22084398 >.

Anexos

Tabela S1. Proteínas que se ligam a hnRNP K identificadas por co-IP e espectrometria de massas. Células HEK293 foram lisadas e co-IP utilizando o anticorpo anti-hnRNP K. Proteínas eluídas foram analisadas por espectrometria de massac usando softwares Sepro e PatternLab. As proteínas listados abaixo foram que encontradas apenas em co-IP hnRNP K, em experimento feito em duplicata. A lista mostra o número IPI proteína, o peso molecular (Da) e o número de vezes que peptídeos da proteina foram identificados (sinal total).

Locus (IPI)	Pmol. (Da)	Sinal total	Descrição
IPI00216049.1	50926,4	93	HNRNPK Isoform 1 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K
IPI00216746.1	50978,4	93	HNRNPK Isoform 2 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K
IPI00396378.3	37388,7	75	HNRNPA2B1 Isoform B1 of Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1
IPI00215965.3	38705	58	HNRNPA1 Isoform A1-B of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1
IPI00304925.5	69991	58	HSPA1B;HSPA1A Heat shock 70 kDa protein 1A/1B
IPI00465365.4	34157,2	58	HNRNPA1 Isoform A1-A of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1
IPI00797148.1	29350,2	58	HNRNPA1 Isoform 2 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1
IPI00845339.1	69977	58	HSPA1B;HSPA1A cDNA FLJ54370, highly similar to Heat shock 70 kDa protein 1
IPI01021093.1	33116,8	58	HNRNPA1 33 kDa protein
IPI01021324.1	34184,3	58	HNRNPA1 34 kDa protein
IPI01022801.1	32641,7	58	HNRNPA1 33 kDa protein
IPI00013070.2	95661,3	54	HNRNPUL1 Isoform 1 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 1
IPI00167147.1	90217,8	54	HNRNPUL1 Isoform 2 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 1
IPI00013881.6	49180,4	51	HNRNPH1 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H
IPI00479191.2	51179,2	51	HNRNPH1 51 kDa protein
IPI00807545.1	48514,2	50	HNRNPK Isoform 3 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K
IPI00414696.1	35965,9	48	HNRNPA2B1 Isoform A2 of Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1
IPI00220327.4	65981	42	KRT1 Keratin, type II cytoskeletal 1
IPI00008529.1	11639,8	35	RPLP2 60S acidic ribosomal protein P2
IPI00294619.2	43403,2	35	TFG Protein TFG
IPI00788849.1	42976	35	TFG protein TFG isoform 2
IPI00019359.4	62008,8	34	KRT9 Keratin, type I cytoskeletal 9
IPI00908896.2	47039,4	33	HNRNPH1 Uncharacterized protein
IPI00031812.3	35884,7	32	YBX1 Nuclease-sensitive element-binding protein 1
IPI00641384.2	251719,5	30	SEC16A protein transport protein Sec16A
IPI00296713.4	63481,8	29	GRN Isoform 1 of Granulins
IPI00104050.3	108583	28	THRAP3 Thyroid hormone receptor-associated protein 3
IPI00297452.5	88596,6	26	TFG Tyrosine-protein kinase receptor

Continua

Locus (IPI)	Pmol. (Da)	Sinal total	Descrição
IPI00009865.4	58773,7	25	KRT10 Keratin, type I cytoskeletal 10
IPI00221354.1	53304,7	25	FUS Isoform Short of RNA-binding protein FUS
IPI00260715.5	53326,8	25	FUS Fus-like protein (Fragment)
IPI00645208.3	53147,7	25	FUS RNA-binding protein FUS isoform 3
IPI00909890.1	44767,1	25	FUS cDNA FLJ58049, highly similar to RNA-binding protein FUS
IPI00003881.5	45624,8	22	HNRNPF Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F
IPI00006079.1	106040,8	22	BCLAF1 Isoform 1 of Bcl-2-associated transcription factor 1
IPI00007765.5	73616,8	22	HSPA9 Stress-70 protein, mitochondrial
IPI00413671.1	105866,7	22	BCLAF1 Isoform 2 of Bcl-2-associated transcription factor 1
IPI00883857.2	90510	22	HNRNPU Isoform Long of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U
IPI00966238.2	72338	22	HSPA9 cDNA FLJ51907, highly similar to Stress-70 protein, mitochondrial
IPI00031801.4	40048	21	CSDA Isoform 1 of DNA-binding protein A
IPI00219147.4	31910	21	CSDA Isoform 2 of DNA-binding protein A
IPI00643351.1	41975	21	YBX1 Protein
IPI00031242.9	235588,7	20	SEC16A Isoform 5 of Protein transport protein Sec16A
IPI00215637.5	73180	20	DDX3X ATP-dependent RNA helicase DDX3X
IPI00984839.1	73093	20	DDX3X ATP-dependent RNA helicase DDX3X isoform 2
IPI00027834.3	64074,4	19	HNRNPL Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L
IPI00220740.1	29428,2	19	NPM1 Isoform 2 of Nucleophosmin
IPI00549248.4	32536,8	19	NPM1 Isoform 1 of Nucleophosmin
IPI00658013.1	28364,7	19	NPM1 nucleophosmin isoform 3
IPI00419373.1	39552,6	18	HNRNPA3 Isoform 1 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3
IPI00455134.1	36988,2	18	HNRNPA3 Isoform 2 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3
IPI00939124.2	34150	18	HNRNPA3 cDNA FLJ58832, highly similar to Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3
IPI00479217.1	88906,1	17	HNRNPU Isoform Short of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U
IPI00644224.2	86788,3	17	HNRNPU cDNA FLJ54020, highly similar to Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U
IPI00645452.1	47718	17	TUBB Uncharacterized protein
IPI00930688.1	50101,6	17	TUBA1B Tubulin alpha-1B chain
IPI01019113.1	49621	17	TUBB Tubulin beta chain
IPI01020686.1	48469,6	17	- 49 kDa protein
IPI01022164.1	48411,6	17	- 48 kDa protein
IPI00180675.4	50085,6	16	TUBA1A Tubulin alpha-1A chain
IPI00218343.4	49845,5	16	TUBA1C Tubulin alpha-1C chain

Continua

Locus (IPI)	Pmol. (Da)	Sinal total	Descrição
IPI01010852.1	37213,8	16	HNRNPF cDNA FLJ57121, highly similar to Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F
IPI01022358.1	46249,8	16	TUBA1A 46 kDa protein
IPI00219148.2	36980,6	15	CSDA Isoform 3 of DNA-binding protein A
IPI00985384.1	71292,9	14	DDX3X ATP-dependent RNA helicase DDX3X isoform 3
IPI00003362.3	72270,4	13	HSPA5 78 kDa glucose-regulated protein
IPI00028888.1	38392,3	13	HNRNPD Isoform 1 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0
IPI00220684.1	32796,1	13	HNRNPD Isoform 3 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0
IPI00012074.3	70881,2	12	HNRNPR Isoform 1 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R
IPI00013877.2	36885,1	12	HNRNPH3 Isoform 1 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3
IPI00216492.1	35198,4	12	HNRNPH3 Isoform 2 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3
IPI00856037.1	59897,8	12	HNRNPR heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R isoform 3
IPI00908651.1	24850	12	HNRNPH3 cDNA FLJ57726, highly similar to Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3
IPI00910614.1	59626,7	12	HNRNPR heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R isoform 4
IPI00941649.1	71251,5	12	HNRNPR Uncharacterized protein
IPI00018140.3	69541,6	11	SYNCRIP Isoform 1 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q
IPI00187011.4	140151,5	11	ZC3H4 Zinc finger CCCH domain-containing protein 4
IPI00385511.7	182669	11	TNRC6B Uncharacterized protein
IPI00402182.2	65623,6	11	SYNCRIP Isoform 2 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q
IPI00402183.2	62599,3	11	SYNCRIP Isoform 3 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q
IPI00402184.4	58681,3	11	SYNCRIP Isoform 4 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q
IPI00444262.3	65904,5	11	NCL cDNA FLJ45706 fis, clone FEBRA2028457, highly similar to Nucleolin
IPI00604620.3	76550,3	11	NCL Nucleolin
IPI00873067.2	184099,8	11	TNRC6B Uncharacterized protein
IPI00930205.1	62471,3	11	SYNCRIP heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q isoform 5
IPI00940033.2	193865,3	11	TNRC6B Isoform 1 of Trinucleotide repeat-containing gene 6B protein
IPI00983581.1	50600,9	11	SYNCRIP SYNCRIP protein (Fragment)
IPI00008524.1	70607,9	10	PABPC1 Isoform 1 of Polyadenylate-binding protein 1
IPI00026230.1	49214,3	10	HNRNPH2 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2
IPI00410017.1	61124	10	PABPC1 Isoform 2 of Polyadenylate-binding protein 1
IPI00651653.2	80389,1	10	DDX17 probable ATP-dependent RNA helicase DDX17 isoform 3
IPI01022656.1	80998,8	10	DDX17 DEAD box polypeptide 17 isoform p82 variant (Fragment)

Continua

Locus (IPI)	Pmol. (Da)	Sinal total	Descrição
IPI00011274.3	46391,1	9	HNRPDL Isoform 1 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like
IPI00045498.4	27156,6	9	HNRPDL Isoform 3 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like
IPI00845282.1	33550,1	9	HNRPDL Isoform 2 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like
IPI00008527.3	11488,7	8	RPLP1 60S acidic ribosomal protein P1
IPI00009841.6	68904,9	8	EWSR1 RNA-binding protein EWS isoform 1
IPI00065554.4	62451	8	EWSR1 RNA-binding protein EWS isoform 4
IPI00215884.4	27709,8	8	SRSF1 Isoform ASF-1 of Serine/arginine-rich splicing factor 1
IPI00383417.1	13053,8	8	- FUS-CHOP protein (Fragment)
IPI00872855.1	68417,7	8	EWSR1 Isoform EWS of RNA-binding protein EWS
IPI00879242.1	64871	8	EWSR1 Ewing sarcoma breakpoint region 1
IPI00879259.1	68330,7	8	EWSR1 RNA-binding protein EWS isoform 3
IPI00003865.1	70836,2	7	HSPA8 Isoform 1 of Heat shock cognate 71 kDa protein
IPI00182138.4	46939,7	7	GRN Isoform 2 of Granulins
IPI00294242.2	45272,5	7	MRPS31 28S ribosomal protein S31, mitochondrial
IPI00783302.1	78481,7	7	PTCD3 Isoform 1 of Pentatricopeptide repeat-containing protein 3, mitochondrial
IPI00909378.2	67078	7	PABPC1 cDNA FLJ59219, highly similar to Poly(A)-binding protein 1
IPI00977833.1	65688,5	7	PABPC1 Uncharacterized protein
IPI00981943.1	68745,2	7	HSPA8 Uncharacterized protein
IPI00026272.2	14108,9	6	HIST1H2AE;HIST1H2AB;HIST1H2AD;HIST1H2AI;HIST1H2AJ;HIST1H2AK;HIST1H2AM;HIST1H2AL;HIST1H2AG Histone H2A type 1-B/E
IPI00031562.3	14094,9	6	HIST3H2A Histone H2A type 3
IPI00045109.3	14206,9	6	HIST1H2AA Histone H2A type 1-A
IPI00081836.3	13879,8	6	HIST1H2AI;HIST1H2AJ;HIST1H2AK;HIST1H2AM;HIST1H2AL;HIST1H2AG;HIST1H2AH Histone H2A type 1-H
IPI00216456.5	14078,9	6	HIST1H2AC Histone H2A type 1-C
IPI00216457.7	14068,9	6	HIST2H2AA4;HIST2H2AA3 Histone H2A type 2-A
IPI00219037.5	15117,4	6	H2AFX Histone H2A.x
IPI00220855.3	13992,9	6	H2AFJ Isoform 1 of Histone H2A.J
IPI00221088.5	22559,5	6	RPS9 40S ribosomal protein S9
IPI00255316.5	14080,9	6	HIST1H2AD Histone H2A type 1-D
IPI00291764.5	14064,9	6	HIST1H2AI;HIST1H2AJ;HIST1H2AK;HIST1H2AM;HIST1H2AL;HIST1H2AG Histone H2A type 1
IPI00339274.5	13961,8	6	HIST2H2AC Histone H2A type 2-C
IPI00552873.2	13909,8	6	HIST1H2AI;HIST1H2AJ;HIST1H2AK;HIST1H2AM;HIST1H2AL;HIST1H2AG Histone H2A type 1-J
IPI00790342.2	32852,7	6	RPL6 60S ribosomal protein L6
IPI00844578.1	140851,1	6	DHX9 ATP-dependent RNA helicase A

Continua

Locus (IPI)	Pmol. (Da)	Sinal total	Descrição
IPI00867533.1	32703,6	6	RPL6 60S ribosomal protein L6
IPI00008603.1	41963,8	5	ACTA2 Actin, aortic smooth muscle
IPI00021428.1	42005,8	5	ACTA1 Actin, alpha skeletal muscle
IPI00021439.1	41691,7	5	ACTB Actin, cytoplasmic 1
IPI00021440.1	41747,8	5	ACTG1 Actin, cytoplasmic 2
IPI00023006.1	41973,9	5	ACTC1 Actin, alpha cardiac muscle 1
IPI00025416.3	41831,8	5	ACTG2 Actin, gamma-enteric smooth muscle
IPI00166487.3	231090,5	5	SEC16A Isoform 3 of Protein transport protein Sec16A
IPI00219314.5	228710,3	5	SEC16A Isoform 2 of Protein transport protein Sec16A
IPI00299024.9	22662	5	BASP1 Isoform 1 of Brain acid soluble protein 1
IPI00514530.5	32235,9	5	ACTA1 Uncharacterized protein
IPI00550021.4	46061,7	5	LOC653881;SNORD43;RPL3 60S ribosomal protein L3
IPI00651660.1	40108,6	5	LOC653881;SNORD43;RPL3 60S ribosomal protein L3 isoform b
IPI00877635.1	40223,6	5	LOC653881;SNORD43;RPL3 Ribosomal protein L3, isoform CRA_b
IPI00877787.1	31205,6	5	LOC653881;SNORD43;RPL3 Uncharacterized protein
IPI00878173.1	37781,8	5	ACTA1 cDNA FLJ39583 fis, clone SKMUS2004897, highly similar to ACTIN, ALPHA SKELETAL MUSCLE
IPI00896436.1	230974,3	5	SEC16A Isoform 4 of Protein transport protein Sec16A
IPI00922693.1	38536,1	5	ACTB cDNA FLJ53662, highly similar to Actin, alpha skeletal muscle
IPI00930226.1	39755,7	5	ACTG1 cDNA FLJ57283, highly similar to Actin, cytoplasmic 2
IPI00930343.1	42001,9	5	ACTC1 cDNA FLJ78096, highly similar to Homo sapiens actin, alpha, cardiac muscle (ACTC), mRNA
IPI01011107.1	37749,9	5	ACTC1 Uncharacterized protein
IPI01011344.1	37364,6	5	ACTG1 Uncharacterized protein
IPI01018925.1	37306,6	5	ACTB cDNA FLJ58286, highly similar to Actin, cytoplasmic 2
IPI00010740.1	76083,6	4	SFPQ Isoform Long of Splicing factor, proline- and glutamine-rich
IPI00018120.1	45519,6	4	DAP3 28S ribosomal protein S29, mitochondrial
IPI00026302.3	14435,9	4	RPL31 60S ribosomal protein L31
IPI00848331.1	14605,1	4	RPL31 60S ribosomal protein L31 isoform 2
IPI00856058.1	13968,8	4	RPL31 60S ribosomal protein L31 isoform 3
IPI00910684.2	41628,8	4	DAP3 28S ribosomal protein S29, mitochondrial isoform 2
IPI00915795.1	13309,4	4	RPL31 Uncharacterized protein
IPI00916315.1	13928,6	4	RPL31 cDNA FLJ58908, highly similar to 60S ribosomal protein L31
IPI00916572.1	12788,1	4	RPL31 Protein
IPI00917298.1	15091,2	4	RPL31 cDNA FLJ57527, highly similar to 60S ribosomal protein L31
IPI00984662.1	41000,4	4	DAP3 28S ribosomal protein S29, mitochondrial isoform 3

Tabela S2. Proteínas que se ligam especificamente a hnRNP K identificadas por co-IP e espectrometria de massas. Células HEK293 foram lisadas e co-IP utilizando o anticorpo anti-hnRNP K. Proteínas eluídas foram analisadas por espectrometria de massac usando softwares Sepro e PatternLab. Os resultados foram comparados com a co-IP utilizando IgG normal (controle negativo). As proteínas listados abaixo foram que encontradas apenas em co-IP hnRNP K, em experimento feito em duplicata. A lista mostra o número IPI proteína, o peso molecular (Pmol. (Da)) e o número de vezes que peptídeos da proteina foram identificados (sinal total).

Locus (IPI)	Pmol. (Da)	Sinal total	Descrição
IPI00104050.3	108134.8	28	THRAP3 Thyroid hormone receptor-associated protein 3
IPI00006079.1	105595.6	22	BCLAF1 Isoform 1 of Bcl-2-associated transcription factor 1
IPI00413671.1	105421.5	22	BCLAF1 Isoform 2 of Bcl-2-associated transcription factor 1
IPI00027834.3	63698.2	19	HNRNPL Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L
IPI00187011.4	139660.3	11	ZC3H4 Zinc finger CCCH domain-containing protein 4
IPI00026230.1	48768.1	10	HNRNPH2 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2
IPI00651653.2	80389.1	10	DDX17 probable ATP-dependent RNA helicase DDX17 isoform 3
IPI01022656.1	80998.8	10	DDX17 DEAD box polypeptide 17 isoform p82 variant (Fragment)
IPI00008527.3	11024.5	8	RPLP1 60S acidic ribosomal protein P1
IPI00215884.4	27234.6	8	SRSF1 Isoform ASF-1 of Serine/arginine-rich splicing factor 1
IPI00182138.4	46396.4	7	GRN Isoform 2 of Granulins
IPI00294242.2	44733.3	7	MRPS31 28S ribosomal protein S31, mitochondrial
IPI00783302.1	78094.5	7	PTCD3 Isoform 1 of Pentatricopeptide repeat-containing protein 3, mitochondrial
IPI00026272.2	13705.8	6	HIST1H2AB;HIST1H2AE;HIST1H2AD;HIST1H2AG;HIST1H2AK;HIST1H2AI;HIST1H2AL;HIST1H2AM;HIST1H2AJ Histone H2A type 1-B/E
IPI00031562.3	13691.7	6	HIST3H2A Histone H2A type 3
IPI00045109.3	13773.7	6	HIST1H2AA Histone H2A type 1-A
IPI00081836.3	13462.6	6	HIST1H2AH;HIST1H2AG;HIST1H2AK;HIST1H2AI;HIST1H2AL;HIST1H2AM;HIST1H2AJ Histone H2A type 1-H
IPI00216456.5	13675.7	6	HIST1H2AC Histone H2A type 1-C
IPI00216457.7	13665.7	6	HIST2H2AA3;HIST2H2AA4 Histone H2A type 2-A
IPI00219037.5	14607.2	6	H2AFX Histone H2A.x
IPI00220855.3	13559.7	6	H2AFJ Isoform 1 of Histone H2A.J
IPI00221088.5	22087.4	6	RPS9 40S ribosomal protein S9
IPI00255316.5	13677.7	6	HIST1H2AD Histone H2A type 1-D
IPI00291764.5	13661.7	6	HIST1H2AG;HIST1H2AK;HIST1H2AI;HIST1H2AL;HIST1H2AM;HIST1H2AJ Histone H2A type 1
IPI00339274.5	13528.6	6	HIST2H2AC Histone H2A type 2-C
IPI00552873.2	13462.6	6	HIST1H2AG;HIST1H2AK;HIST1H2AI;HIST1H2AL;HIST1H2AM;HIST1H2AJ Histone H2A type 1-J
IPI00790342.2	32404.5	6	RPL6 60S ribosomal protein L6
IPI00867533.1	32255.4	6	RPL6 60S ribosomal protein L6
IPI00008603.1	41479.7	5	ACTA2 Actin, aortic smooth muscle

Continua

Locus (IPI)	Pmol. (Da)	Sinal total	Descrição
IPI00021428.1	41521.7	5	ACTA1 Actin, alpha skeletal muscle
IPI00021439.1	41195.6	5	ACTB Actin, cytoplasmic 1
IPI00021440.1	41237.6	5	ACTG1 Actin, cytoplasmic 2
IPI00023006.1	41489.7	5	ACTC1 Actin, alpha cardiac muscle 1
IPI00025416.3	41347.7	5	ACTG2 Actin, gamma-enteric smooth muscle
IPI00166487.3	230635.2	5	SEC16A Isoform 3 of Protein transport protein Sec16A
IPI00219314.5	228255.1	5	SEC16A Isoform 2 of Protein transport protein Sec16A
IPI00299024.9	22216.8	5	BASP1 Isoform 1 of Brain acid soluble protein 1
IPI00514530.5	31751.8	5	ACTA1 Uncharacterized protein
IPI00550021.4	45715.6	5	SNORD43;RPL3;LOC653881 60S ribosomal protein L3
IPI00651660.1	39762.5	5	SNORD43;RPL3;LOC653881 60S ribosomal protein L3 isoform b
IPI00877635.1	39863.4	5	SNORD43;RPL3;LOC653881 Ribosomal protein L3, isoform CRA_b
IPI00877787.1	30753.5	5	SNORD43;RPL3;LOC653881 Uncharacterized protein
IPI00878173.1	37297.7	5	ACTA1 cDNA FLJ39583 fis, clone SKMUS2004897, highly similar to ACTIN, ALPHA SKELETAL MUSCLE
IPI00896436.1	230519.1	5	SEC16A Isoform 4 of Protein transport protein Sec16A
IPI00922693.1	38051.9	5	ACTB cDNA FLJ53662, highly similar to Actin, alpha skeletal muscle
IPI00930226.1	39245.6	5	ACTG1 cDNA FLJ57283, highly similar to Actin, cytoplasmic 2
IPI00930343.1	41517.7	5	ACTC1 cDNA FLJ78096, highly similar to Homo sapiens actin, alpha, cardiac muscle (ACTC), mRNA
IPI01011107.1	37265.7	5	ACTC1 38 kDa protein
IPI01011344.1	36854.5	5	ACTG1 37 kDa protein
IPI01018925.1	37306.6	5	ACTB cDNA FLJ58286, highly similar to Actin, cytoplasmic 2
IPI00010740.1	75562.4	4	SFPQ Isoform Long of Splicing factor, proline- and glutamine-rich
IPI00018120.1	44981.4	4	DAP3 28S ribosomal protein S29, mitochondrial
IPI00026302.3	13990.8	4	RPL31 60S ribosomal protein L31
IPI00848331.1	14219	4	RPL31 60S ribosomal protein L31 isoform 2
IPI00856058.1	13556.5	4	RPL31 60S ribosomal protein L31 isoform 3
IPI00910684.2	41090.5	4	DAP3 28S ribosomal protein S29, mitochondrial isoform 2
IPI00915795.1	12832.2	4	RPL31 Uncharacterized protein
IPI00916315.1	13461.4	4	RPL31 cDNA FLJ58908, highly similar to 60S ribosomal protein L31
IPI00916572.1	12249.8	4	RPL31 Protein
IPI00917298.1	14624	4	RPL31 cDNA FLJ57527, highly similar to 60S ribosomal protein L31
IPI00984662.1	40462.1	4	DAP3 28S ribosomal protein S29, mitochondrial isoform 3