

FRANCISCA NATHÁLIA DE LUNA VITORINO

**ANÁLISE EM LARGA ESCALA GLOBAL E DE COMPARTIMENTOS
CELULARES UTILIZANDO ABORDAGENS PROTEÔMICAS E
MOLECULARES PARA AVALIAR O EFEITO ANTIPROLIFERATIVO DE
FGF2 EM CÉLULAS Y1**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof(a) Dr(a). Julia Pinheiro Chagas da Cunha

Versão corrigida. A versão original eletrônica, encontra-se disponível tanto na Biblioteca no ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

RESUMO

VITORINO, F. N. L. **Análise em larga escala global e de compartimentos celulares utilizando abordagens proteômicas e moleculares para avaliar o efeito antiproliferativo de FGF2 em células Y1.** 2022. 206f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

O fator de crescimento de fibroblastos 2 (FGF2) apesar de induzir proliferação celular em diversos contextos, inibe irreversivelmente a proliferação de células tumorais com o oncogene *k-ras* superexpresso, como nas células Y1, na transição G2/M do ciclo celular. Para entender melhor o mecanismo molecular induzido por este fator, objetivamos entender como o proteoma da célula está respondendo a esse estímulo. Propusemos analisar por proteômica quantitativa as alterações induzidas por FGF2, no extrato total, na cromatina, nucléolo e nos *loci* de rDNA. No proteoma total, mais de 2900 proteínas foram quantificadas, indicando que os termos associados ao metabolismo, processamento de RNA, replicação e transcrição estão enriquecidos entre as proteínas diferencialmente expressas no estímulo com FGF2. A análise da rede reguladora de transcrição indica os membros de AP-1 (principalmente FosB), como reguladores principais da sinalização de FGF2. A expressão de JunB começa após 1 h do estímulo com FGF2 e atinge o pico após 5 h, a expressão de FosB após 3 h a 24 h, com pico de 3 h a 8 h. Ambos os níveis de abundância dessas proteínas dependem do receptor do fator de crescimento de fibroblastos (FGFR) e da sinalização *src*. O *knockdown* de JUNB e FOSB não resgata as células da parada de crescimento induzida por FGF2; no entanto, o *knockdown* do FOSB resgata as células do atraso na replicação do DNA, indicando que a abundância do FOSB está subjacente ao atraso na progressão da fase S. No proteoma da cromatina, mais de 5000 proteínas foram identificadas, sendo mais de 300 proteínas *down* reguladas após o estímulo com FGF2 por 24 h, incluindo diversas proteínas associadas a RNA polimerase II. Foi demonstrado uma modulação da transcrição global pelo estímulo com FGF2, através de ensaio de *run-on*, apresentando efeitos opostos em tempos curtos e longo de estímulo. No proteoma nucleolar, mais de 1200 proteínas foram identificadas, indicando que termos associados a transcrição, processamento de rRNA e biogênese de ribossomos estão enriquecidos entre as proteínas diferencialmente expressas por FGF2. Diversas proteínas pertencentes a complexos remodeladores da cromatina estão diferencialmente expressas no nucléolo após o estímulo com FGF2, sugerindo uma modulação do estado transcricional do rDNA. Foi identificado aumento nos transcritos de rRNA imaturo após o estímulo com FGF2 por 24 h, podendo ser um indício de aumento da transcrição ou da atividade da RNA Polimerase I. No entanto, os ribossomos maduros parecem não estar sendo afetados e há uma desorganização nucleolar, observada

através da dispersão da marcação da fibrilarina, após o estímulo com FGF2. No proteoma dos *loci* de rDNA, 556 proteínas foram identificadas, sendo 27 diferencialmente expressas após o estímulo com FGF2. Dentre essas proteínas destacamos as proteínas Ndc1 e Tcof1, que dentre outras funções, participam do processamento do rRNA, principalmente no que concerne a modificações pós-transcricionais de rRNA, e modulação dos ribossomos. Em conjunto, esses resultados demonstram que o estímulo antiproliferativo de FGF2 dispara alterações transcricionais importantes, desde a superativação de genes de resposta imediata, até a modulação do principal sítio de transcrição celular, o nucléolo, modulando diretamente o rDNA.

Palavras-chave: FGF2. Proteômica. Cromatina. Transcrição. Nucléolo.

ABSTRACT

VITORINO, F. N. L. **Large-scale global and compartmental cellular analysis using proteomic and molecular approaches to assess the antiproliferative effect of FGF2 on Y1 cells.** 2022. 206p. Ph. D. these (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Fibroblast growth factor 2 (FGF2), despite inducing cell proliferation in several contexts, irreversibly inhibits the proliferation of tumor cells with the k-ras oncogene overexpressed, as in Y1 cells, in the G2/M transition of the cell cycle. To better understand the molecular mechanism induced by this factor, we aim to understand how the cell's proteome is responding to this stimulus. We proposed to analyze by quantitative proteomics the alterations induced by FGF2, in the total extract, in the chromatin, nucleolus and in the rDNA *loci*. In the total proteome, more than 2900 proteins were quantified, indicating that the terms associated with metabolism, RNA processing, replication and transcription are enriched among the differentially expressed proteins in the FGF2 stimulus. Analysis of the transcriptional regulatory network indicates members of AP-1 (mainly FosB) as major regulators of FGF2 signaling. JunB expression starts after 1 h of FGF2 stimulation and peaks after 5 h, FosB expression after 3 h to 24 h, peaking at 3 h to 8 h. Both levels of expression of these proteins depend on fibroblast growth factor receptor (FGFR) and src signaling. JUNB and FOSB knockdown does not rescue cells from FGF2-induced growth arrest; however, FOSB knockdown rescues cells from delayed DNA replication, indicating that FOSB expression underlies the delay in S-phase progression. In the chromatin proteome, more than 5000 proteins have been identified, with more than 300 proteins downregulated after stimulation with FGF2 for 24 h, including several proteins associated with RNA polymerase II. A modulation of global transcription was demonstrated by stimulation with FGF2, through a run-on assay, showing opposite effects in short and long stimulation times. In the nucleolar proteome, more than 1200 proteins were identified, indicating that terms associated with transcription, rRNA processing and ribosome biogenesis are enriched among the proteins differentially expressed by FGF2. Several proteins belonging to chromatin remodeling complexes are differentially expressed in the nucleolus after stimulation with FGF2, suggesting a modulation of the transcriptional state of rDNA. An increase in immature rRNA transcripts was identified after stimulation with FGF2 for 24 h, which may be an indication of increased transcription or RNA Polymerase I activity. However, mature ribosomes seem not to be affected and there is nucleolar disorganization, observed through the dispersion of the fibrillarin label, after stimulation with FGF2. In the

rDNA *loci* proteome, 556 proteins were identified, 27 of which were differentially expressed after stimulation with FGF2. Among these proteins, we highlight the Nolc1 and Tcof1 proteins, which, among other functions, participate in the processing of rRNA, mainly regarding post-transcriptional modifications of rRNA, and modulation of ribosomes. Taken together, these results demonstrate that the antiproliferative stimulus of FGF2 triggers important transcriptional changes, from the overactivation of immediate response genes, to the modulation of the main cell transcription site, the nucleolus, directly modulating rDNA.

Keywords: FGF2. Proteomics. Chromatin. Transcription. Nucleolus.

1. INTRODUÇÃO

1.1. FGF

Os FGFs (*Fibroblast Growth Factors*) fazem parte de uma família de fatores mitogênicos que compreendem 23 membros em mamíferos, entretanto apenas 18 funcionam como ligantes de receptores de FGF (ITOH, 2007). Estão também envolvidos na regulação de diversas atividades fisiológicas, tais como angiogênese, proliferação, diferenciação e sobrevivência. Atuam principalmente como proteínas secretadas, porém existem evidências de que FGF pode agir no núcleo celular ativando vias diferentes das ativadas quando na superfície celular (BRYANT; STOW, 2005) (Figura 1.A).

O FGF2 foi identificado na década de 70 (ARMELIN, 1973; ARMELIN; ARMELIN, 1975; GAMBARINI; ARMELIN, 1981, 1982) e é conhecido como um fator mitogênico e de sobrevivência (TURNER; GROSE, 2010). Em células tronco-embrionárias, por exemplo, FGF2 promove a proliferação celular e protege contra estresse oxidativo e radiação (EISELLEOVA et al., 2009). Além disso, nestas células a sinalização de FGF2 se mostrou importante para um rápido e eficiente reparo de quebras em dupla fita de DNA (HARFOUCHE et al., 2010).

1.1.1. FGF e indução de bloqueio no ciclo celular em células tumorais de camundongos

Apesar do FGF2 ser constantemente associado à oncogênese graças a suas atividades proliferativas, existem trabalhos que relatam ações antiproliferativas e supressoras de tumor para FGF. Por exemplo, tumores de bexiga humana apresentam baixa expressão de um subtipo de receptor de FGF (FGFR2-IIIb). A transfecção deste receptor em linhagens tumorais de bexiga diminui a proliferação e o crescimento tumoral em camundongos, sugerindo que esteja envolvido com supressão tumoral. Interessantemente, mecanismos epigenéticos (metilação de DNA) são importantes para a menor expressão deste receptor em células tumorais (RICOL et al., 1999). Um segundo exemplo se refere aos estudos realizados em células neuroepiteliais humanas (SK-N-MC). FGF2 gera acúmulo de células em G2 principalmente através da interferência na cascata de fosforilação que se inicia em cdc25 e leva a ativação do complexo mitótico ciclina B-CDK1. Corroborando com essas observações, o efeito inibitório de FGF2 na proliferação pode ser revertido pela expressão de um dominante negativo de cdc25 que não pode ser fosforilado (SMITS et al., 2000). Um terceiro exemplo, refere-se aos estudos que se baseiam este presente projeto (COSTA et al., 2008) e que estão descritas abaixo.

Quando células de carcinoma adrenocortical de camundongo que possuem o proto-oncogene *k-ras* amplificado e superexpresso constitutivamente (SCHWAB et al., 1983; KIMURA; ARMELIN, 1988; FORTI et al., 2002) (linhagem celular Y1) são tratadas com níveis fisiológicos de FGF2, há a promoção da transição G0→G1, atraso da fase S e bloqueio irreversível em G2→M (Figura 1.B) levando ao aparecimento de marcadores de senescência celular (SA-βGal). Não é observado apoptose ou necrose. Quando inoculadas sob a pele de camundongos, estas células geram tumores que são inibidos por injeções de FGF2 intradérmicas. Costa e cols. demonstraram que esta atividade ocorre via receptores de FGF e não envolve as vias mitogênicas de MEK/ERK e PI3K/Akt. Nestas células, a via de RhoA está ativada após o tratamento com FGF2 e tem um papel importante na parada da progressão do ciclo celular (COSTA et al., 2008; SALOTTI et al., 2013) (Figura 1. C).

Essa ação peculiar de FGF2 como agente antiproliferativo é dependente da expressão de Ras, uma vez que os efeitos acima descritos são também observados em células Balb3T3 transformadas pelo oncogene H-rasV12 (mas não em Balb3T3 não transformadas). Corroborando com a hipótese acima, células Y1 que apresentam expressão de *K-Ras-GTP* reduzida pela expressão do dominante negativo RasN17 se tornam resistentes aos efeitos de FGF2 (COSTA et al., 2008).

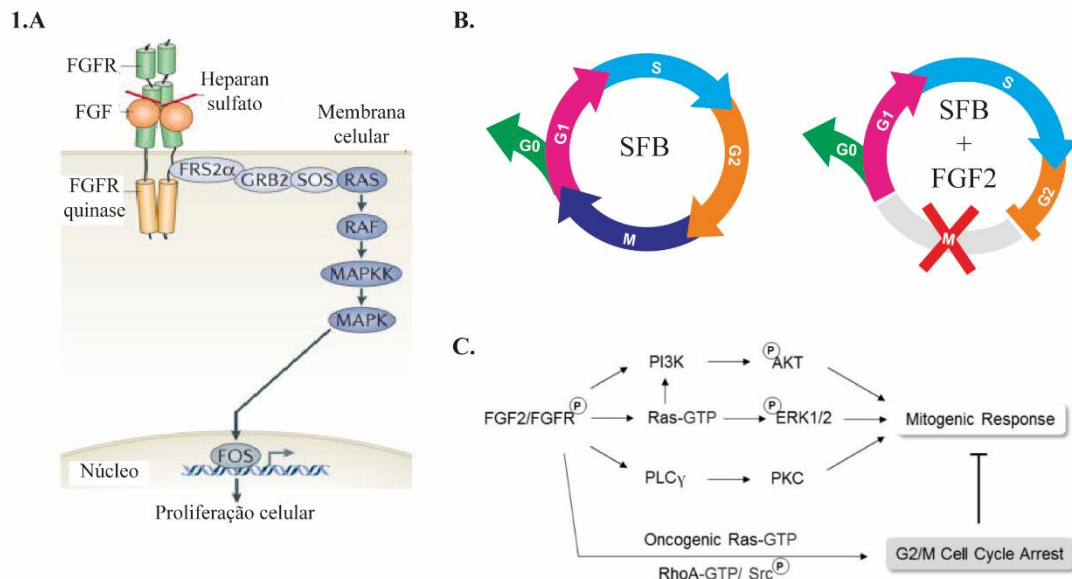


Figura 1. Vias de sinalização do FGF2

A. Ilustração de uma das vias de sinalização disparadas pelo FGF2 através da sua ligação com o receptor de FGF (FGFR) (Modificado de GOETZ; MOHAMMADI, 2013). **B.** Esquema do efeito de FGF2 no ciclo celular de células Y1. **C.** Modelo proposto dos efeitos citotóxicos induzidos por FGF2 em células transformadas por Ras. Destaque às vias de sinalização associadas à resposta mitogênica e resposta de parada no ciclo celular (dependente da via de Rho GTPase) (Retirado de SALOTTI et al., 2013).

O uso de inibidores de proteassoma ou de DDR-checkpoints causa a morte celular de células com o proto-oncogene *k-ras* superexpresso estimuladas com FGF2. O estímulo com FGF2 potencializa a replicação e o estresse proteotóxico nessas células tumorais, com isso as células necessitam do controle do checkpoint para sobreviver. Logo, o FGF2 sensibiliza essas células ao tratamento com inibidores de proteassoma e DDR-checkpoints, que resulta na morte celular (DIAS et al., 2019).

Análises em larga escala demonstraram que o efeito antiproliferativo de FGF2 em células Y1 causa atraso na acetilação de histonas H4, que está relacionado com ativação transcricional, sendo esse atraso correlacionado com o atraso na entrada da fase S causada pelo estímulo. Outra modulação é o aumento nos níveis de H3K27me3, que está relacionada a repressão transcricional. A diminuição da expressão de genes associados ao ciclo celular, o aumento de p21 e de várias citocinas, também foram relatados. Em conjunto, esses dados sugerem que as alterações causadas pelo estímulo de FGF2 são condizentes com a senescência induzida por oncogene, demonstrando a relação entre o estímulo de crescimento de FGF2 com a amplificação do oncogene *k-ras* (LUND et al., 2021).

1.2. Vias canônicas de proliferação celular

Estímulos extracelulares podem eliciar mudanças na estrutura da cromatina acarretando alterações na expressão gênica. Diversas evidências apontam que a expressão gênica pode ser diretamente regulada por quinases importantes das cascatas de sinalização celular que fosforilam diretamente substratos na cromatina (BAEK, 2011).

Existem quatro subfamílias de MAPKs (*Mitogen Activated Protein Kinases*) caracterizadas: *Extracellular signal-Regulated Kinases* (ERK1/2), *C-JUN NH2-terminal Kinases* (JNK-1/2/3), p38 (p38 $\alpha/\beta/\gamma/\delta$) e ERK5. JNK e p38 podem ser ativadas por stress celular e por isso são conhecidas como MAPKs ativadas por stress. As MAPKs possuem treoninas e tirosinas em motifs específicos que quando fosforiladas ativam MAPK quinases. Uma vez ativada, MAPKs regulam eventos celulares chaves no citoplasma fosforilando proteínas, incluindo outras quinases. Também, podem se translocar para o núcleo, fosforilando fatores de transcrição como C-JUN, C-FOS, ELK-1 e C-MYC, resultando assim na regulação da expressão de outros genes. Classicamente, a proteína C-FOS é expressa após ativação das vias MAPK/ERK. A ativação de MEK1 e MEK2 ocorre através da fosforilação das serinas 217 e 221. Estas enzimas são ativadas por diversos fatores de crescimento, citocinas, despolarização de membranas e influxo de cálcio. MEK ativa p44 e p42 MAP quinase (também conhecidas

como ERK). Uma vez ativada, ERK transloca para o núcleo e ativa a transcrição de diversos genes, incluindo C-FOS (KYRIAKIS; AVRUCH, 2001).

ERK1/2 além de suas atividades regulares, está também envolvida no remodelamento da cromatina via interação com HDAC 4 (histona deacetilase 4) e via a estimulação da atividade da poli ADP-ribosilação afetando diretamente a estrutura da cromatina (PLOTNIKOV et al., 2011).

Interessantemente, tem-se observado que quinases das cascatas de sinalização podem também se ligar ao DNA tanto à regiões promotoras como à regiões codificadoras e desempenhar funções independentes de sua atividade catalítica (POKHOLOK et al., 2006). ERK5 se liga ao DNA agindo como um fator de transcrição (KASLER et al., 2000). ERK 1/2 também se liga diretamente no DNA causando supressão direta de diversos elementos transcripcionais (HU et al., 2009). Em mamíferos, foi observado que p38 associa-se com RNA Pol II e com regiões contendo elementos *enhancer* (SIMONE et al., 2004).

A família Ras consiste em um grupo de GTPases monoméricas que hidrolisam GTP. Cada membro desta família tem a propriedade de propagar o sinal para diversas outras vias de sinalização, sendo considerada um “centro de sinalização” intracelular (BRUCE ALBERTS, ALEXANDER JOHNSON, JULIAN LEWIS, MARTIN RAFF, KEITH ROBERTS, 2002). As proteínas Ras são essenciais para a transmissão dos sinais a partir dos receptores da superfície celular até as diversas vias efetoras intracelulares, porém, em vários tipos de câncer são conhecidas por seu papel oncogênico, sofrendo mutações pontuais, contribuindo para a proliferação descontrolada das células (COLEMAN; MARSHALL; OLSON, 2004).

A ativação constitutiva de Ras impulsiona a proliferação. Estudos relevam que em alguns casos o aumento da capacidade de proliferação celular pode ocorrer por indução de fatores de crescimento *up* regulados, bem como alterações em receptores de fatores de crescimento. Os sinais gerados por Ras irão culminar na regulação de fatores de transcrição, incluindo FOS e JUN, e estes fatores, por sua vez, estimularão a expressão de ciclina D1. A ciclina D1 é importante na transformação induzida por Ras, foi demonstrado que em camundongos deficientes de ciclina D1 houve resistência ao desenvolvimento de tumores que são induzidos por Ras (PYLAYEVA-GUPTA; GRABOCKA; BAR-SAGI, 2011).

1.2.1. Genes de resposta primária e o complexo AP-1

Genes de resposta primária ou de resposta imediata são genes regulados por sinais intrínsecos ou extrínsecos na célula que são os primeiros a serem transcritos através de “ondas de expressão” para regulação de diversos efeitos, incluindo proliferação celular (FOWLER; SEN; ROY, 2011). Estes genes respondem rapidamente aos sinais regulatórios, e podem ser

regulados por vias de sinalização variadas. Foram primeiramente encontrados em situações de exposição à mitógenos (BAHRAMI; DRABLØS, 2016a).

Dentre os genes de resposta imediata, encontramos genes da família Jun e Fos. Muitos destes são comumente conhecidos como proto-oncogenes, os quais, ao sofrerem mutação, podem levar a uma alteração em sua função biológica levando ao aparecimento de câncer. Esses proto-oncogenes dão origem a fatores de transcrição capazes de ativar a transcrição de novos genes, os de resposta secundária.

JUNB faz parte da família de proteínas Jun que incluem C-JUN, JUNB E JUND. São fatores de transcrição envolvidos na regulação da atividade gênica seguida de uma resposta a fatores de crescimento. Evidências apontam que JUNB age como um regulador negativo da divisão celular (BAKIRI et al., 2000; PASSEGUÉ; WAGNER, 2000b), indutor de senescência (PASSEGUÉ; WAGNER, 2000a) e supressor tumoral (PASSEGUE et al., 2001). JUNB antagoniza a indução de ciclina D1 por C-JUN (BAKIRI et al., 2000). Entretanto, JUNB também apresenta atividades promotoras de divisão celular de forma dependente do ciclo celular e das condições ambientais. A região promotora de C-JUN contém diversas regiões regulatórias, incluindo sítios de ligação TRE e MEF2. O primeiro liga dímeros de C-JUN, indicando que C-JUN pode regular sua própria expressão (ANGEL; KARIN, 1991). A luz ultravioleta (UV) acarreta um aumento de C-JUN, sendo para isso necessário tanto JNK e p38 MAPK. O fator de crescimento (EGF) também induz o aumento da expressão de C-JUN, entretanto via ERK1/2 (KAYAHARA; WANG; TOURNIER, 2005). Na falta de C-JUN, JUNB pode agir como um regulador positivo da replicação enquanto na presença deste, há a formação de heterodímeros C-JUN/JUNB e conseqüentemente a observação de atividades antiproliferativas.

FOSB faz parte da família de proteínas Fos cujos membros incluem C-FOS, FRA-1 e FRA-2, sendo estas proteínas importantes na resposta imediata a fatores de crescimento. Especificamente, a forma truncada de variante de *splicing* de FOSB é muito estudada e está envolvida em neuroplasticidade e vício a drogas (ROSENBERGER; GUPTA; BOWDEN, 1999). As atividades promovidas por membros pertencentes a esta família são moduladas por fosforilações geradas por diferentes quinases (MAPK, CDC2, PKA, PKC)(GRUDA et al., 1994).

JUN e FOS são famílias de fatores de transcrição que, por serem do tipo zíper de leucina, possuem a função primária de dimerização, formando homo ou heterodímeros constituindo um complexo denominado AP-1 (*Activating Protein-1*)(EFERL; WAGNER, 2003). Essas proteínas são importantes em diversos processos, atuando como reguladoras na proliferação e

diferenciação celular. Embora estudos primários considerem que as proteínas do complexo AP-1 sejam oncogênicas, novos estudos tem sugerido outras definições (SHAULIAN, 2010), o que pode ser notado principalmente na família Jun. Por exemplo, C-JUN induz o desenvolvimento de tumores de pele e fígado, enquanto, em contraste, JUNB não tem atividade de transformação. Ou seja, enquanto C-JUN é oncogênico, JUNB tem mostrado efeitos anti-oncogênicos (EFERL; WAGNER, 2003). Apesar do pouco conhecimento sobre esse complexo de proteínas (particularmente sobre a proteína FOSB), sabe-se que as proteínas JUNB tem capacidade de inibir a proliferação e transformação celular (PASSEGUÉ; WAGNER, 2000a). Além de induzir p16, JUNB age inibindo ciclina D1 (BAKIRI et al., 2000), podendo causar parada na fase G1 do ciclo celular (PIECHACZYK; FARRAS, 2008). Apesar de ser um dos primeiros fatores de transcrição descobertos em mamíferos (ANGEL; KARIN, 1991), pouco se sabe sobre AP-1. Sua atividade pode ser regulada por diversos fatores, como por exemplo: fatores de crescimento, citocinas, hormônios polipeptídicos, infecções virais e bacterianas e outros diversos estresses físicos e químicos. Todos esses estímulos ativam as cascatas de MAPKs (CHANG; KARIN, 2001). Estas aumentam a atividade da AP-1 através da fosforilação de diferentes substratos. Soros e fatores de crescimento que potencialmente ativam este complexo fazem isso ativando as ERKs, que são um subgrupo da MAPKs, que se deslocam até o núcleo para fosforilar, e assim, potencializar a atividade transcricional das TCFs (*Ternary Complex Factors*), que se ligam aos promotores de fos (HILL; WYNNE; TREISMAN, 1994).

1.3. A cromatina

1.3.1. Estrutura e organização da cromatina

A cromatina tem uma função importante em processos celulares essenciais tais como a mitose, a transcrição, a replicação, o reparo, dentre outros. É uma das moléculas mais complexas da célula, consiste em DNA genômico, proteínas e RNA associados direta ou indiretamente a este DNA. Desta forma fazem parte da cromatina: histonas, a maquinaria basal de transcrição, de replicação e de reparo (assim como moléculas que interagem com estes componentes); proteínas que modificam a cromatina (como histona acetiltransferases, DNA metiltransferases, dentre outras); etc. A estrutura da cromatina é formada por nucleossomos, que consistem em 147 pares de base de DNA enrolados em um octâmero de histonas conectados por 20 a 50 pares de bases de DNA (LANGOWSKI; HEERMANN, 2007). Os nucleossomos controlam a acessibilidade da cromatina, uma vez que quando estão mais abertos deixam a cromatina mais acessível a interações moleculares e mais fechados diminuem essa interação.

Os fatores remodeladores de nucleossomos são responsáveis por alterar o posicionamento dos nucleossomos participando dessa dinâmica (MAIER; CHIODA; BECKER, 2008).

A conformação da cromatina está diretamente relacionada com a atividade transcricional, uma vez que o nível de compactação da cromatina determina se os fatores da maquinaria de transcrição irão se associar ao DNA ou não. Resumidamente, o chamado complexo de pré-iniciação (RNA polimerase II e fatores de transcrição) se liga a região promotora do gene, se alonga e ocorre a terminação da transcrição, esses processos são diretamente regulados pelo estado da cromatina em volta dessa região, que pode ser remodelada facilitando ou impedindo o processo (revisado em CHIARELLA; LU; HATHAWAY, 2020).

O mapeamento sistemático da cromatina de *Drosophila* mostrou que a cromatina antes classificada apenas em heterocromatina (cromatina densamente corada) e eucromatina (cromatina pouco corada) pode ainda ser classificada em cinco subtipos diferentes: Cromatina vermelha e amarela, com alta ocupação de proteínas e genes transcricionalmente ativos; Cromatina azul, caracterizada pela presença das proteínas do complexo Polycomb e da histona H3K27me3, ambos associados a repressão transcricional; Cromatina preta, é o maior grupo e concentra os genes silenciados e Cromatina verde, tem como principal componente a proteína HP1, sendo o grupo que corresponde a heterocromatina. Os autores observaram que 57 marcadores compostos por proteínas e modificações pós-traducionais em histonas são capazes de classificar a cromatina nesses subtipos que apresentam perfis de expressão diferente, diferentes tempos de replicação do DNA e diferentes quantidades de genes associados. Estes estudos mostraram que a cromatina é ainda muito mais organizada e complexa do que antes se pensava (FILION et al., 2010; VAN STEENSEL, 2011).

1.3.2. *Análises proteômicas da cromatina*

A análise da cromatina baseada em espectrometria de massas é uma ferramenta muito utilizada e muito eficiente para identificar as proteínas associadas com a regulação gênica, entendimento das funções das proteínas, além da elucidação da interação entre as proteínas. Diversas abordagens que analisam tanto a cromatina total como regiões específicas da cromatina já foram descritas e ajudam a elucidar sua composição e regulação (TORRENTE et al., 2011; WIERER; MANN, 2016; VAN MIERLO; VERMEULEN, 2021).

Análises globais do proteoma da cromatina (ou “cromatoma”) indicam que existe grande diversidade nas proteínas associadas ao DNA. Por exemplo, 4.500 proteínas estão associadas a cromossomos metafásicos e estima-se que em células de mamíferos, 8.000 proteínas estariam presentes na cromatina (OHTA et al., 2017). Em *Drosophila*, observou-se

que 99,6% do genoma apresenta pelo menos três proteínas associadas e 1% do genoma apresenta-se ligado a 36-44 proteínas. A maior parte dessas proteínas apresentaria funções importantes e possivelmente relacionadas com o controle da expressão gênica, da replicação e reparo do DNA, sendo, portanto, a cromatina uma excelente fonte para um estudo detalhado. Entretanto, a análise do cromatoma não é trivial já que muitas proteínas são expressas transientemente, em pequenas quantidades e ainda apresentam diversas modificações pós traducionais (SHIIO et al., 2003).

Uma abordagem de isolamento da cromatina que ocorre após o crosslink das proteínas com o DNA e da lavagem em condições denaturantes, foi utilizada para obter as proteínas fortemente ligadas a cromatina, resultando em uma captura do estado atual da cromatina. Em torno de 1600 proteínas identificadas não tinham funções relacionadas com a cromatina descritas anteriormente, com isso diversas novas proteínas foram associadas com funções na cromatina. Para obter um grupo bem definido de proteínas associadas a cromatina, foram analisados diversos tipos celulares, em várias condições biológicas, diferentes fases do ciclo celular, tratamento com drogas e tudo isso foi submetido a um algoritmo para identificar quais proteínas estariam associadas a cromatina. Com isso, o protocolo ChEP (*Chromatin Enrichment for Proteomics*), possibilitou que milhares de proteínas foram descritas como associadas a cromatina, através da associação das análises considerando as variáveis biológicas e bioquímicas com a integração pela bioinformática (KUSTATSCHER et al., 2014b, 2014a; KUSTATSCHER; GRABOWSKI; RAPPSILBER, 2016).

1.3.3. A cromatina e suas implicações epigenéticas

O estudo da cromatina e de sua associação aos processos regulatórios supracitados é um assunto muito debatido na literatura especialmente porque a cromatina está associada a hereditariedade de características epigenéticas. Diversas análises em larga escala estão contribuindo para a elucidação deste complexo papel da cromatina. Lenstra *et al* (2011) (LENSTRA et al., 2011) analisaram a expressão gênica de 165 cepas de leveduras mutadas individualmente em 30 proteínas reguladoras da cromatina. Os resultados mostraram que 80% dos mutantes apresentam efeitos específicos na expressão gênica. Em média, 116 genes (2% do transcriptoma analisado) apresentam alterações significativas na expressão gênica. Esta pequena quantidade de genes afetados indica que a maioria das proteínas associadas à cromatina é necessária na regulação de um conjunto muito específico de genes e não agem tão globalmente como se esperava (POKHOLOK et al., 2005).

O grande número de proteínas e suas possíveis interações possibilita que a cromatina possua diversas combinações de proteínas desencadeando diferentes repostas. O termo “código de histonas” foi proposto para demonstrar essa dinâmica de combinações entre proteínas e suas modificações modulando os eventos orquestrados pela cromatina (STRAHL; ALLIS, 2000). O N-terminal das histonas se projetam para fora dos nucleossomos formando “caudas”, tanto essas estruturas quanto o DNA podem ser modificados, chamadas de modificações pós traducionais (MPTs). Alguns grupos de proteínas são responsáveis por essas modificações, chamadas de *writers* (catalisam a adição de MPTs), *erasers* (removem) e *readers* (reconhecem as MPTs) (GARDNER; ALLIS; STRAHL, 2011).

A análise epigenética da cromatina tem avançado bastantes nos últimos anos, mais de 400 modificações pós traducionais de histonas já foram identificadas. No entanto, devido as diferentes combinações de MPTs que desencadeiam diferentes repostas, o entendimento funcional de todas essas modificações ainda precisa ser melhor investigado. Recentemente, Sidoli *et al.* (2019) desenvolveram uma abordagem para identificar modificações de histonas, sua associação com a acessibilidade da cromatina e suas combinações. Essa técnica pode ajudar a elucidar algumas funções das MPTs, assim como das suas combinações (SIDOLI et al., 2019).

1.3.4. Alterações na cromatina durante a senescência

A senescência celular é caracterizada pela parada no crescimento celular de forma irreversível, que basicamente pode ser induzida por stress genotóxico, encurtamento de telômeros e superexpressão de oncogenes (CAMPISI, 2013). As células senescentes apresentam um fenótipo secretório associado a senescência (SASP, do inglês *senescence-associated secretory phenotype*) secretando citocinas inflamatórias que alteram seu microambiente e influenciam células vizinhas a entrarem em processo de senescência (COPPÉ et al., 2010). A senescência induzida por oncogenes (OIS, do inglês *oncogene-induced senescence*), é descrita como um mecanismo supressor e resposta a ativação de oncogenes (COURTOIS-COX; JONES; CICHOWSKI, 2008). Alterações na cromatina estão relacionadas a senescência, porém ainda precisa ser mais bem estudado se essas alterações são causa ou consequência desse processo (MACIEIRA-COELHO; PUVION-DUTILLEUL, 1985). Uma das alterações frequentemente encontradas em OIS, são os *foci* de heterocromatina associados a senescência (SAHF, do inglês *senescence-associated heterochromatin foci*). O SAHF são regiões densas que representam focos de cromatina silenciada, enriquecida com marcadores repressivos como H3K9me3 e H4K20me3 (ZHANG; CHEN; ADAMS, 2007). Já foi demonstrado que o estímulo antiproliferativo de FGF2 em células Y1 pode levar a senescência

induzida por oncogenes, onde entre outros achados, causa o aumento dos marcadores repressivos H3K27me3, que pode estar relacionado ao fenótipo SAHF, e a indução da expressão de diversas citocinas que reforçam a evidência do fenótipo SASP (LUND et al., 2021).

1.4. Nucléolo

1.4.1. Estrutura e organização nucleolar

O nucléolo é uma organela nuclear desprovida de membrana, onde ocorre o processamento de rRNA e a montagem de subunidades ribossomais, além de ser sítio de diversos processamentos de RNAs não ribossomais. Nos nucléolos de eucariotos há pelo menos um nucléolo cujo tamanho e organização é diretamente relacionado com a produção de ribossomos. Composto por três principais blocos: centro fibrilar (FC), componente denso fibrilar (DFC) e componente granular (GC). Essas estruturas refletem a compartimentação das maquinarias relacionadas com transcrição de rDNA, processamento de rRNA, e formação de duas subunidades ribossomais (40S e 60S). A produção de ribossomos se inicia no final mitose, aumenta durante G1, tem sua fase máxima em G2 e finaliza durante a prófase (HERNANDEZ-VERDUN, 2011).

Parte da maquinaria de transcrição permanece ligada às regiões promotoras do rDNA durante o ciclo celular, porém na forma inativa (CONCONI et al., 1989). Uma grande parte do rDNA permanece silenciado durante o ciclo celular, um dos mecanismos responsáveis por essa dinâmica de ativação e silenciamento do rDNA são as modificações de histonas. Acetilação da histona H4, H3K9me3 e a proteína HP1 já foram encontradas associadas ao rDNA. O complexo remodelador de cromatina NoRC (*Nucleolar Remodeling Complex*) reprime a transcrição de rDNA mediando o recrutamento de DNA metiltransferases e histonas deacetilases para a região promotora do rDNA (STROHNER et al., 2001; SANTORO; LI; GRUMMT, 2002; ZHOU; SANTORO; GRUMMT, 2002).

Na maioria dos organismos a heterocromatina é encontrada nos telômeros, nas regiões em torno dos centrômeros ou em *loci* do rDNA. Nos sítios de heterocromatina do rDNA estados epigenéticos contribuem para o silenciamento de genes e estabilidade genômica que são necessários para adequada segregação cromossômica e uma vida útil normal. O silenciamento adequado do rDNA pode agir como supressor de desenvolvimento de tumores e a falha desse mecanismo, impedindo a desnecessária transcrição de rDNA que pode levar a oncogênese. A hipometilação de rDNA é encontrado em diversos tipos de câncer (SRIVASTAVA; SRIVASTAVA; AHN, 2016).

1.4.2. Transcrição e processamento do rRNA

O nucléolo é responsável por mais de 60% da síntese de RNA nas células. Em células humanas existe em torno de 400 cópias dos genes de rDNA e apenas aproximadamente 50% desses genes são transcritos (BIRCH; ZOMERDIJK, 2008). Os *loci* de rDNA constituem as Regiões Organizadoras Nucleolares (NORs), onde cada NOR é organizada como conjuntos de elementos repetitivos, as unidades transcricionais, que são separadas por sequências espaçadoras intergênicas (IGS). Essas regiões contêm as sequências de três (28S, 18S, 5.8S) dos quatro rRNAs que formam as subunidades ribossomais 40S e 60S (SCHÖFER; WEIPOLTSHAMMER, 2018; MOSS et al., 2019) (Figura 2. A e B). Diferentes conformações da cromatina, marcas epigenéticas, organização topológica e localização nucleolar são formas de organização das cópias ativas e inativas de rDNA (NÉMETH; LÄNGST, 2011).

O rRNA precursor (47S) é transcrito pela RNA Polimerase I (Pol I) e pelo menos dois fatores de transcrição, o UBF (*Upstream-binding Factor*) e o complexo SL1 (*Selective factor I*), também chamado de TIF-IB (*Transcription intermediary factor 1-beta*) (GRUMMT, 2003; MOSS et al., 2019). A Pol I é um complexo com várias subunidades, divididas em duas subpopulações, Pol I α e Pol I β . Pol I β se associa com RRN3 (também chamado de TIF1A), que media a iniciação da transcrição (MILLER et al., 2001).

O complexo SL1 é um complexo de TBP (*TATA-binding protein*) e ao menos uma TAF (*TBP-associated factors*) específica de Pol I (TAF1A, TAF1B, TAF1C, TAF1D). O SL1 não se liga diretamente ao rDNA, sua ligação a região promotora depende da presença de UBF (STEFANOVSKY et al., 2001, 2006; MOSS et al., 2006, 2019). O fator de transcrição UBF desempenha diversas funções no processo transcricional do rDNA. O UBF pode se ligar ao rDNA, substituindo histonas, ou então se ligar a região promotora ou ao longo do rDNA potencializando a transcrição, por exemplo. A via de ERK pode afetar diretamente o processo de transcrição da RNA Pol I via UBF. A fosforilação de UBF por ERK pode resultar no aumento da ocupação de UBF no rDNA e/ou afeta o alongamento da transcrição, aumentando a transcrição da RNA Pol I (STEFANOVSKY et al., 2006).

Uma complexa sequência de etapas de processamento é requerida para formação do rRNA maduro a partir do seu precursor, incluindo a incorporação de aproximadamente 79 proteínas ribossomais. Os genes que dão origem aos transcritos nascentes de 47S, consistem nos rRNAs 28S, 18S e 5.8S, nas sequências 5' e 3' espaçadoras externas (5'ETS e 3'ETS, respectivamente) e de duas sequências espaçadoras internas (ITS1 e ITS2, respectivamente). As regiões espaçadoras 5'ETS, 3'ETS, ITS1 e ITS2 são clivadas por uma sequência de etapas pela ação de endonucleases e associações com ribonucleoproteínas, fatores pré-ribossomais,

modificações (pseudouridina e 2'-O-metilatição) e snoRNPs (*small nucleolar ribonucleoproteins*), formando os três rRNAs maduros (28S, 18S e 5.8S) que, junto com o rRNA 5S (transcrito pela RNA Polimerase III fora do nucléolo e, em sequência importado) formam a base das duas subunidades ribossomais (40S e 60S)(HENRAS et al., 2015; SCHÖFER; WEIPOLTSHAMMER, 2018)(Figura 2. C e D).

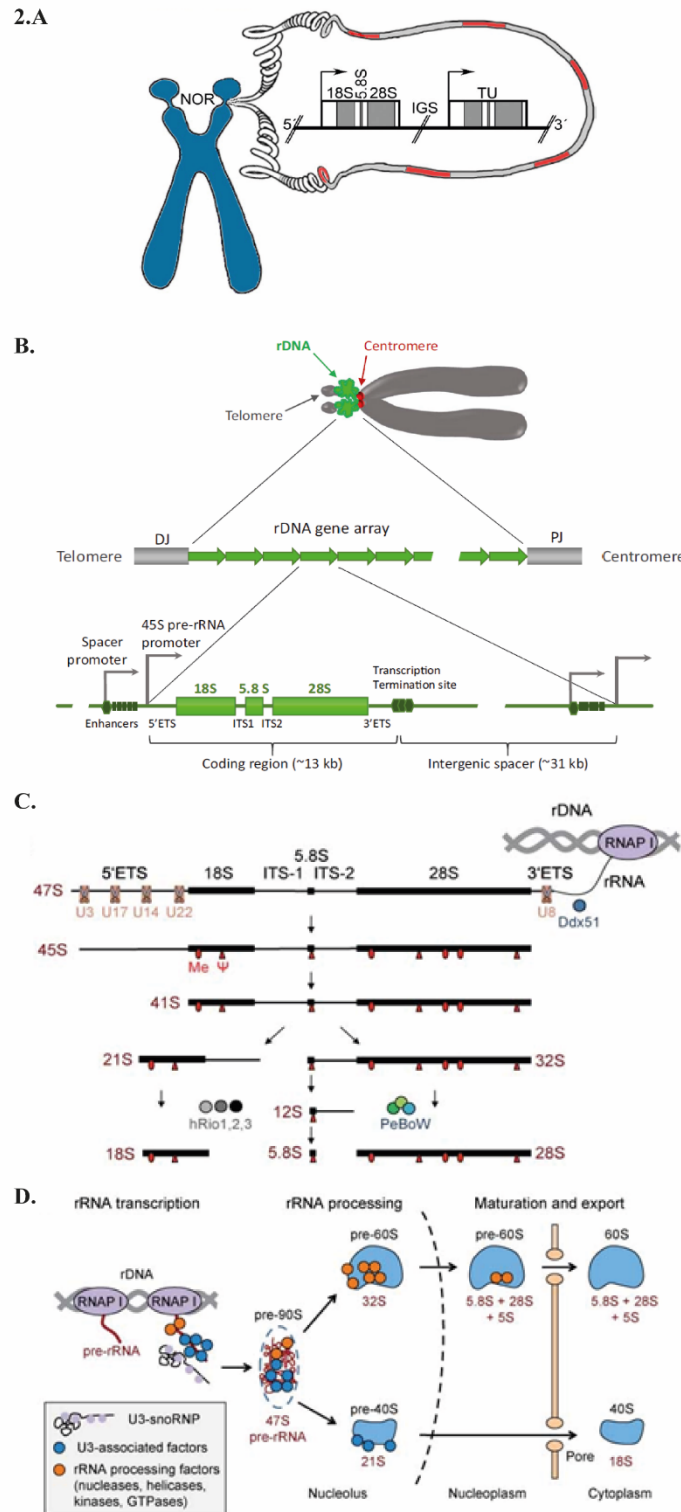


Figura 2. Organização e processamento do rRNA

A. Representação das regiões organizadoras nucleolares (NORs) no cromossomo acrocêntrico humano, o rDNA e a organização dos genes ribossomais estão representados. TU = unidade transcricional (gene rRNA), IGS = sequências espaçadoras intergênicas, Loop de DNA: Vermelho – TU, cinza – IGS (Adaptado de SCHÖFER; WEIPOLTSHAMMER, 2018). **B.** Representação dos genes do rDNA. Cada unidade de repetição consiste em uma região codificadora (codifica o pré-rRNA para 18S, 5.8S e 28S) e um espaçador intergênico (adaptado de POTAPOVA; GERTON, 2019). **C.** Esquema do processamento do transcrito precursor 47S, indicando as clivagens de 5'ETS, 3'ETS, ITS1 e ITS2. Modificações em vermelho, também fazem parte do processamento. **D.** Ilustração simplificada das etapas desde a transcrição do rDNA até a maturação das subunidades ribossomais 40S e 60S. Figuras adaptadas de (BURGER, K; EICK, 2013).

O ribossomo maduro consiste em duas subunidades formadas pela associação de 79 proteínas ribossomais com 4 rRNAs (28S, 18S, 5S, 5.8S). A subunidade menor (40S) é formada pelo rRNA 18S e 33 ribonucleoproteínas “pequenas” (RPSs) e a subunidade maior (60S) é formada pelos rRNAs 5S, 5.8S, 28S e 46 ribonucleoproteínas “grandes” (RPLs) (HENRAS et al., 2015).

A transcrição do rDNA oscila durante a progressão do ciclo celular: a transcrição máxima ocorre em S e G2, para na mitose e lentamente volta em G1. No início da fase G1, a UBF é fosforilada por Cdk4/ciclina D1 e Cdk2/ciclina E e A, iniciando a transcrição do rDNA. A inibição da transcrição durante a mitose ocorre pela fosforilação do SL1 pela Cdk1/ciclina B, fazendo com que o SL1 perca a habilidade de se ligar ao UBF (revisado em GRUMMT, 2003).

1.4.3. Análises proteômicas do nucléolo

Mais de 4000 proteínas já foram identificadas em análises proteômicas do nucléolo. O nucléolo é uma organela muito dinâmica e responsiva, por exemplo, o fluxo de mais de 400 proteínas foi modulado em resposta a alterações metabólicas (ANDERSEN et al., 2005; AHMAD et al., 2009).

Recentes avanços na proteômica nucleolar aumentaram significativamente o número de proteínas nucleolares, aumentando a possibilidade de variadas funções dessas novas proteínas. Por exemplo, diversas proteínas de reparo do DNA foram encontradas com funções na biogênese ribossomal, assim como proteínas de biogênese ribossomal com funções no reparo de DNA. Observou-se a transcrição da RNA Pol I sendo transientemente silenciada em resposta a dano no DNA e a propagação do silenciamento para todo o nucléolo em caso de DSBs (*Double Strand Breaks* – quebra de dupla fita) foram relatados para algumas formas de dano no DNA (OGAWA; BASERGA, 2017).

O proteoma nucleolar em células senescentes mostra a modulação de mais de 300 proteínas em resposta a indução da senescência, além da reorganização da cromatina nucleolar. Mostrando que o nucléolo participa do processo de resposta a senescência (KAR et al., 2011).

O controle epigenético da transcrição do rRNA é essencial para a manutenção da estabilidade e estrutura do rDNA (GRUMMT; LÄNGST, 2013). Três complexos estão envolvidos na regulação epigenética do rDNA, são eles: eNoSC (*energy-dependent nucleolar silencing complex*), NoRC (*nucleolar remodelling complex*) e NuRD (*nucleosome remodeling and deacetylase*). Sendo que os complexos eNoSC e NuRD tem atividade de desacetilação e metilação de histonas, e o NoRC tem atividade remodeladora de cromatina facilitando que enzimas modificadoras de histonas ou DNA metiltransferases silenciem a transcrição do rDNA (SRIVASTAVA; SRIVASTAVA; AHN, 2016).

1.4.4. Alterações Nucleolares frente ao estresse

Estresses celulares podem levar a reorganização da arquitetura nuclear. A integridade estrutural dos nucléolos é importante no papel geral na coordenação das respostas ao estresse celular. Por exemplo, a desintegração do nucléolo foi proposta como característica comum nas respostas celulares que ativam a via p53 (RUBBI; MILNER, 2003a, 2003b). Proteínas nucleolares liberadas por estresse realizam outras funções regulatórias, sugerindo que o nucléolo é sensível ao stress e é capaz de orquestrar uma cadeia de eventos na célula como resposta a sinais de estresse (MAYER; GRUMMT, 2005; BOULON et al., 2010). A proteína PICT1 foi identificada sequestrando a proteína ribossomal Rpl11 no nucléolo, prevenindo a ligação dessa proteína com a Mdm2. A proteína Mdm2 media a ubiquinação e degradação do supressor tumoral p53, logo os níveis de PICT1 influenciam na progressão tumoral (SUZUKI et al., 2012). A segregação nucleolar é um processo geralmente causado em resposta a dano no DNA e é caracterizado pela condensação e separação do centro fibrilar e do componente granular, além da formação dos chamados “*nucleolar caps*”. Esses “*caps*” são formados por proteínas nucleares, como a UBF, proteínas nucleoplasmáticas e coilinas (BOULON et al., 2010).

Respostas nucleolares ao stress de forma independente de p53 também já foram descritas, como por exemplo a parada no ciclo celular causada pelo aumento de expressão de p21 em resposta a super expressão da proteína nucleolar Rpl3 (RUSSO et al., 2013). Outro estudo mostrou que perturbações na biogênese de ribossomos, devido silenciamento da proteína Polr1a, leva a liberação da proteína nucleolar Rpl11 dos ribossomos, que se associa com a Mdm2. Assim a Mdm2 não interage com E2F1 que é degradada, causando parada no ciclo celular (DONATI et al., 2011).

1.4.5. FGF2 e o nucléolo

Estudos sugerem a presença e a ação de fatores de crescimento no nucléolo. Por exemplo, a fosforilação da nucleolina por FGFs foi relacionada com a ativação da produção de ribossomos (PEDERSON, 1998). Em precursores esqueléticos, o FGFR2 (*Fibroblast Growth Factor Receptor 2*) nucleolar ativa diretamente a transcrição do rDNA via interação com FGF2 e UBF1 (*Upstream Binding Fator 1*). Identificando o FGFR2 como um regulador transcricional do rDNA no osso, revelando uma possível via nucleolar para a sinalização do FGF que permite a regulação independente da proliferação e diferenciação de células osteoprogenitoras (NEBEN et al., 2014).

Uma isoforma do FGF2 que também é encontrada no nucléolo, o FGF2 de 18 kDa, pode reger diretamente a transcrição de rRNA *in vivo*. O FGF2 interage com o UBF1, fator de transcrição essencial para a transcrição de rRNA, e a ativação máxima da transcrição de rRNA *in vitro* por FGF2 requer UBF (SHENG et al., 2005).

1.5. Análises proteômicas por espectrometria de massas

As proteínas são macromoléculas responsáveis por grande parte das funções fisiológicas das células. A identificação qualitativa e quantitativa dessas moléculas ajuda a elucidar como os processos biológicos funcionam além de servir como alvos terapêuticos e biomarcadores. Análises proteômicas abrangem diversas técnicas bioquímicas para elucidar as alterações das proteínas em determinados contextos biológicos, como análises por imunofluorescência, SDS-PAGE e *western blot*. A proteômica baseada em espectrometria de massas (MS) é a análise em larga escala do proteoma celular, que é o conjunto de proteínas e suas isoformas expressas em determinada amostra biológica. Essa análise permite identificar a expressão das proteínas em um determinado momento, além de quantificá-las e determinar alterações pós-traducionais. A espectrometria de massas é uma técnica capaz de determinar a relação entre massa e carga (m/z) de espécies ionizadas em fase gasosa e tem sido amplamente utilizada para identificação e quantificação de proteínas (DERACINOIS et al., 2013).

Para obter uma identificação robusta de proteínas, o espectrômetro de massas é acoplado a um cromatógrafo nas análises proteômicas, permitindo que amostras complexas sejam separadas e identificadas de forma mais eficiente. O termo LC-MS é utilizado para se referir ao uso do HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) acoplado ao espectrômetro de massas. A cromatografia de fase reversa é a mais utilizada nas análises proteômicas, porém outros esquemas de separação são bastante utilizados para melhorar a capacidade de detecção. A cromatografia multidimensional (MudPIT) é um exemplo dessas abordagens. No MudPIT a

coluna cromatográfica é composta por três fases: fase reversa – troca catiônica – fase reversa. Com essa coluna trifásica é possível obter uma maior separação dos peptídeos e como consequência uma maior identificação no espectrômetro de massas (WASHBURN; WOLTERS; YATES, 2001; FLORENS; WASHBURN, 2006a). Atualmente, três principais estratégias são utilizadas na análise proteômica por MS: *bottom-up*, onde as proteínas são submetidas a uma clivagem proteolítica gerando pequenos peptídeos que serão analisados por LC-MS; *Middle-down*, onde as proteínas são submetidas a uma clivagem protelítica gerando fragmentos peptídicos maiores e *top-down* onde as proteínas inteiras são analisadas por LC-MS (WEHR, 2006).

A proteômica quantitativa pode ser relativa ou absoluta. A quantificação relativa é baseada na diferença da abundância das proteínas entre diferentes situações. A quantificação absoluta é utilizada para obter o nível de expressão individual de cada proteína. A quantificação pode ser feita com amostras livres de marcação (*label-free*) ou com marcação com isótopos estáveis. A abordagem *label-free*, como o próprio nome já diz, não requer nenhuma marcação da amostra e a quantificação pode ser feita utilizando a área sob a curva do cromatograma dos picos precursores (XIC) ou pela contagem de espectros adquiridos (*spectral count*). Existem diversos tipos de marcações utilizadas na análise proteômica, dentre elas estão as marcações metabólicas (SILAC) e as marcações químicas (ICAT, Dimethyl, iTRAQ, TMT)(BANTSCHEFF et al., 2007; KITO; ITO, 2008).

A marcação com TMT (*Tandem Mass Tags*) possibilita a análise de até 16 amostras diferentes juntas em uma única corrida. As *tags* consistem em um grupo repórter, um espaçador e um grupo amino reativo. O grupo amino reativo se liga ao N-terminal e nas lisinas dos peptídeos. Assim, diferentes *tags* isobáricas são utilizadas para cada amostra que são misturadas para formar uma única amostra. Na separação pela cromatografia líquida, como as *tags* tem as mesmas propriedades químicas, todos os peptídeos das diferentes marcações co-eluem. No espectrômetro eles são identificados como um único pico precursor, seguindo para fragmentação onde cada *tag* terá uma assinatura única no espectro de MS/MS, diferenciando assim as amostras, e a quantificação é feita comparando as intensidades dos íons repórter (THOMPSON et al., 2003).

1. CONCLUSÃO

Concluimos que o estímulo antiproliferativo de FGF2 desencadeia diversas alterações proteômicas, tanto a nível global quanto nos compartimentos celulares estudados. Alterações relacionadas a transcrição e metabolismo de RNA foram as mais evidenciadas, com destaque a alterações nucleolares.

Os resultados das análises do proteoma total mostraram que genes de resposta imediata, Fosb e Junb, membros da família AP-1, são superexpressos em resposta ao estímulo com FGF2. Essa modulação ocorre via FGFR e Scr, mas não depende da via de Rho. Ficou demonstrado que os membros de AP-1 (principalmente fosB), como parte dos reguladores principais da sinalização de FGF2. Nem o *knockdown* de JunB, nem o de FosB resgatou o bloqueio de crescimento celular induzido por FGF2 indicando que outros componentes podem estar envolvidos na interrupção da proliferação. No entanto, a diminuição da expressão de FosB seguido da estimulação com FGF2 aumentou o número de células na fase S, indicando que a expressão de FosB pode estar envolvida no retardo da progressão da fase S induzido por FGF2.

No proteoma da cromatina destacamos a grande presença de termos relacionados a processos transcricionais, como o metabolismo de RNA, após o estímulo com FGF2, demonstrando que este fator pode modular diretamente ou indiretamente esses processos. A modulação da transcrição por FGF2 foi confirmada pela diminuição, em tempo curto, e aumento, em tempo longo, dos transcritos recentemente sintetizados de forma concomitante ao aumento do tamanho nuclear e nucleolar. Componentes de complexos remodeladores de cromatina (Chrac1, Rbbp7, Actl6a, Baz1a, Gata2b, Ino80, Pbrm1), fatores associados a eventos epigenéticos (KDM5C e Ep300) e proteínas relacionadas a regulação do ciclo celular (p21, Cdk2, Anapc1 e Anapc2) são modulados pelo estímulo de FGF2, destacando a influência deste fator na modulação da expressão gênica.

A análise das proteínas nucleolares mostrou através do enriquecimento dos termos de processamento de rRNA e biogênese de ribossomos, a influência do estímulo do FGF2 no processamento de rRNA. Além do enriquecimento de vários integrantes de complexos remodeladores da cromatina (NuRD, NoRC, WICH, SWI/SNF, Polycomb) sendo modulados pelo FGF2, indicando que este fator pode induzir o remodelamento da r-cromatina. Ainda, mostramos que o estímulo de FGF2 aumenta a transcrição do rRNA e causa desorganização nucleolar, porém sem alterar o perfil dos ribossomos maduros. Assim, o estímulo de FGF2 pode induzir alterações na transcrição e/ou processamento do rRNA levando a uma desorganização nucleolar.

O estímulo com FGF2 modula especificamente o proteoma dos *loci* de rDNA. Com destaque para as proteínas Nolc1 e Tcof1, que, dentre outras funções, participam do processamento do rRNA, mais especificamente associadas a modificações pós-transcricionais, e possível na modulação da especificidade dos ribossomos.

Por fim, a inibição da transcrição do rRNA pela RNA Pol I resgata parcialmente as células do efeito antiproliferativo causado pelo FGF2. Com isso, possivelmente o estímulo com FGF2 modula a atividade da RNA Pol I de forma que, após um longo tempo de estimulação (24 h), haja grande aumento de transcritos de rRNA levando a uma desorganização nucleolar.

Em conjunto, essa tese demonstra que o estímulo antiproliferativo de FGF2 dispara alterações transcricionais importantes, desde a superativação de genes de reposta imediata, até a modulação do principal sítio de transcrição celular, o nucléolo, modulando diretamente o proteoma dos *loci* de rDNA.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, Y. et al. NOPdb: Nucleolar Proteome Database--2008 Update. **Nucleic acids research**, v. 37, n. Database issue, p. D181-4, jan. 2009.
- ALI, A.; HOEFLICH, K. P.; WOODGETT, J. R. Glycogen Synthase Kinase-3: Properties, Functions, and Regulation. **Chemical reviews**, v. 101, n. 8, p. 2527–2540, ago. 2001.
- ANDERSEN, J. S. et al. Nucleolar proteome dynamics. **Nature**, v. 433, n. 7021, p. 77–83, 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nature03207>>.
- ANGEL, P.; KARIN, M. The Role of Jun, Fos and the AP-1 Complex in Cell-Proliferation and Transformation. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1072, n. 2–3, p. 129–157, dez. 1991.
- ANGLANA, M. et al. Dynamics of DNA Replication in Mammalian Somatic Cells: Nucleotide Pool Modulates Origin Choice and Interorigin Spacing. **Cell**, v. 114, n. 3, p. 385–394, ago. 2003.
- ARMELIN, H. A. Pituitary Extracts and Steroid Hormones in the Control of 3T3 Cell Growth. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 70, n. 9, p. 2702–2706, set. 1973.
- ARMELIN, H. A.; ARMELIN, M. C. Regulation of Fibroblast Growth in Culture. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 62, n. 2, p. 260–267, jan. 1975.
- ARMISTEAD, J. et al. Mutation of EMG1 Causing Bowen-Conradi Syndrome Results in Reduced Cell Proliferation Rates Concomitant with G2/M Arrest and 18S RRNA Processing Delay. **BBA clinical**, v. 1, p. 33–43, 29 maio 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26676230>>.
- ASCER, L. G. et al. CDC42 Gtpase Activation Affects Hela Cell DNA Repair and Proliferation Following UV Radiation-Induced Genotoxic Stress. **Journal of cellular biochemistry**, v. 116, n. 9, p. 2086–2097, set. 2015.
- AZKANAZ, M. et al. Protein Quality Control in the Nucleolus Safeguards Recovery of Epigenetic Regulators after Heat Shock. **eLife**, v. 8, jun. 2019.
- BACCARO, R. B. F. et al. Immunohistochemical Jun/Fos Protein Localization and DNA Synthesis in Rat Adrenal Cortex after Treatment with ACTH or FGF2. **Cell and tissue research**, v. 328, n. 1, p. 7–18, abr. 2007.
- BADER, G. D.; HOGUE, C. W. V. An Automated Method for Finding Molecular Complexes in Large Protein Interaction Networks. **BMC bioinformatics**, v. 4, p. 2, jan. 2003.
- BAEK, S. H. When Signaling Kinases Meet Histones and Histone Modifiers in the Nucleus. **Molecular Cell**, v. 42, n. 3, p. 274–284, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1097276511002553>>.
- BAHRAMI, S.; DRABLØS, F. Gene regulation in the immediate-early response process. **Advances in Biological Regulation**, v. 62, p. 37–49, 2016a. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S221249261630001X>>.
- BAHRAMI, S.; DRABLØS, F. Gene regulation in the immediate-early response process. **Advances in Biological Regulation**, v. 62, p. 37–49, 2016b.
- BAKIRI, L. et al. Cell Cycle-Dependent Variations in c-Jun and JunB Phosphorylation: A Role in the Control of Cyclin D1 Expression. **The EMBO journal**, v. 19, n. 9, p. 2056–2068, maio

2000.

BANTSCHEFF, M. et al. Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 389, n. 4, p. 1017–1031, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00216-007-1486-6>>.

BAUERFELD, C. P.; HERSHENSON, M. B.; PAGE, K. Cdc42, but Not RhoA, Regulates Cyclin D1 Expression in Bovine Tracheal Myocytes. **American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology**, v. 280, n. 5, p. L974-82, maio 2001.

BESSON, A.; DOWDY, S. F.; ROBERTS, J. M. CDK Inhibitors: Cell Cycle Regulators and Beyond. **Developmental Cell**, v. 14, n. 2, p. 159–169, 2008. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1534580708000415>>.

BIRCH, J. L.; ZOMERDIJK, J. C. B. M. Structure and Function of Ribosomal RNA Gene Chromatin. **Biochemical Society transactions**, v. 36, n. Pt 4, p. 619–624, ago. 2008.

BLAIR, L. P. et al. Epigenetic Regulation by Lysine Demethylase 5 (KDM5) Enzymes in Cancer. **Cancers**, v. 3, n. 1, p. 1383–1404, mar. 2011.

BOISVERT, F.-M. et al. The multifunctional nucleolus. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 7, p. 574–585, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nrm2184>>.

BOULON, S. et al. The Nucleolus under Stress. **Molecular cell**, v. 40, n. 2, p. 216–227, out. 2010.

BRACKERTZ, M. et al. Two Highly Related P66 Proteins Comprise a New Family of Potent Transcriptional Repressors Interacting with MBD2 and MBD3. **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 43, p. 40958–40966, out. 2002.

BRACKERTZ, M. et al. P66alpha and P66beta of the Mi-2/NuRD Complex Mediate MBD2 and Histone Interaction. **Nucleic acids research**, v. 34, n. 2, p. 397–406, 2006.

BROWN, J. R. et al. Fos Family Members Induce Cell Cycle Entry by Activating Cyclin D1. **Molecular and cellular biology**, v. 18, n. 9, p. 5609–5619, set. 1998.

BRUCE ALBERTS, ALEXANDER JOHNSON, JULIAN LEWIS, MARTIN RAFF, KEITH ROBERTS, and P. W. **Molecular Biology of the Cell**. 4th. ed. [s.l: s.n.]

BRYANT, D. M.; STOW, J. L. Nuclear Translocation of Cell-Surface Receptors: Lessons from Fibroblast Growth Factor. **Traffic**, v. 6, n. 10, p. 947–953, 2005. Disponível em: <<http://https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2005.00332.x>>.

BUISSON, R. et al. Distinct but Concerted Roles of ATR, DNA-PK, and Chk1 in Countering Replication Stress during S Phase. **Molecular cell**, v. 59, n. 6, p. 1011–1024, set. 2015.

BURGER, K; EICK, D. **Functional ribosome biogenesis is a prerequisite for p53 destabilization: impact of chemotherapy on nucleolar functions and RNA metabolism** **Biological Chemistry**, 2013. Disponível em: <<https://www.degruyter.com/view/j/bchm.2013.394.issue-9/hsz-2013-0153/hsz-2013-0153.xml>>.

BURGER, K. et al. Chemotherapeutic Drugs Inhibit Ribosome Biogenesis at Various Levels. **The Journal of biological chemistry**, v. 285, n. 16, p. 12416–12425, 16 abr. 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20159984>>.

BURRIDGE, K.; WENNERBERG, K. Rho and Rac Take Center Stage. **Cell**, v. 116, n. 2, p.

- 167–179, 2004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867404000030>>.
- CALO, E. et al. RNA Helicase DDX21 Coordinates Transcription and Ribosomal RNA Processing. **Nature**, v. 518, n. 7538, p. 249–253, 2015. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/MED/25470060>>.
- CAMPISI, J. Aging, Cellular Senescence, and Cancer. **Annual review of physiology**, v. 75, p. 685–705, 2013.
- CERIONE, R. A. Cdc42: new roads to travel. **Trends in Cell Biology**, v. 14, n. 3, p. 127–132, 2004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0962892404000303>>.
- CHANG, L.; KARIN, M. Mammalian MAP Kinase Signalling Cascades. **Nature**, v. 410, n. 6824, p. 37–40, mar. 2001.
- CHANG, Y.-W.; HOWARD, S. C.; HERMAN, P. K. The Ras/PKA Signaling Pathway Directly Targets the Srb9 Protein, a Component of the General RNA Polymerase II Transcription Apparatus. **Molecular cell**, v. 15, n. 1, p. 107–116, jul. 2004.
- CHAPMAN, J. R. et al. Phosphoproteomics of Fibroblast Growth Factor 1 (FGF1) Signaling in Chondrocytes: Identifying the Signature of Inhibitory Response. **Molecular & cellular proteomics : MCP**, v. 16, n. 6, p. 1126–1137, jun. 2017.
- CHATTERJEE, A. et al. MOF Acetyl Transferase Regulates Transcription and Respiration in Mitochondria. **Cell**, v. 167, n. 3, p. 722–738.e23, out. 2016.
- CHAUVIN, C. et al. Ribosomal Protein S6 Kinase Activity Controls the Ribosome Biogenesis Transcriptional Program. **Oncogene**, v. 33, n. 4, p. 474–483, jan. 2014.
- CHEN, H. K. et al. Human Nopp140, Which Interacts with RNA Polymerase I: Implications for RRNA Gene Transcription and Nucleolar Structural Organization. **Molecular and cellular biology**, v. 19, n. 12, p. 8536–8546, dez. 1999.
- CHIARELLA, A. M.; LU, D.; HATHAWAY, N. A. Epigenetic Control of a Local Chromatin Landscape. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 3, jan. 2020.
- CLANCY, S. RNA transcription by RNA polymerase: prokaryotes vs eukaryotes. **Nature education**, v. 1(1):125, 2008.
- CLAPIER, C. R.; CAIRNS, B. R. The Biology of Chromatin Remodeling Complexes. **Annual review of biochemistry**, v. 78, p. 273–304, 2009.
- COCHRAN, B. H.; REFFEL, A. C.; STILES, C. D. Molecular Cloning of Gene Sequences Regulated by Platelet-Derived Growth Factor. **Cell**, v. 33, n. 3, p. 939–947, jul. 1983.
- COLEMAN, M. L.; MARSHALL, C. J.; OLSON, M. F. RAS and RHO GTPases in G1-phase cell-cycle regulation. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 5, n. 5, p. 355–366, maio 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrm1365>>.
- CONCONI, A. et al. Two Different Chromatin Structures Coexist in Ribosomal RNA Genes throughout the Cell Cycle. **Cell**, v. 57, n. 5, p. 753–761, jun. 1989.
- COPPÉ, J.-P. et al. The Senescence-Associated Secretory Phenotype: The Dark Side of Tumor Suppression. **Annual review of pathology**, v. 5, p. 99–118, 2010.

- CORDEN, J. L. Pol II CTD Code Light. **Molecular cell**, v. 61, n. 2, p. 183–184, jan. 2016.
- COSTA, E. T. et al. Fibroblast Growth Factor 2 Restrains Ras-Driven Proliferation of Malignant Cells by Triggering RhoA-Mediated Senescence. **Cancer research**, v. 68, n. 15, p. 6215–6223, ago. 2008.
- COURTOIS-COX, S.; JONES, S. L.; CICHOWSKI, K. Many Roads Lead to Oncogene-Induced Senescence. **Oncogene**, v. 27, n. 20, p. 2801–2809, maio 2008.
- COX, J. et al. Andromeda: A Peptide Search Engine Integrated into the MaxQuant Environment. **Journal of proteome research**, v. 10, n. 4, p. 1794–1805, abr. 2011.
- DANKO, C. G. et al. Signaling Pathways Differentially Affect RNA Polymerase II Initiation, Pausing, and Elongation Rate in Cells. **Molecular cell**, v. 50, n. 2, p. 212–222, abr. 2013.
- DE BOER, L. et al. Cyclin A/cdk2 coordinates centrosomal and nuclear mitotic events. **Oncogene**, v. 27, n. 31, p. 4261–4268, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/onc.2008.74>>.
- DE WINTER, R. F.; MOSS, T. A Complex Array of Sequences Enhances Ribosomal Transcription in *Xenopus Laevis*. **Journal of molecular biology**, v. 196, n. 4, p. 813–827, ago. 1987.
- DENG, M. et al. Identification and Functional Analysis of a Novel Cyclin e/Cdk2 Substrate Ankrd17. **The Journal of biological chemistry**, v. 284, n. 12, p. 7875–7888, mar. 2009.
- DENG, W. et al. Cytoskeletal Protein Filamin A Is a Nucleolar Protein That Suppresses Ribosomal RNA Gene Transcription. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 5, p. 1524–1529, jan. 2012.
- DERACINOIS, B. et al. Comparative and Quantitative Global Proteomics Approaches: An Overview. **Proteomes**, v. 1, n. 3, p. 180–218, 11 out. 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28250403>>.
- DEUTZMANN, A. et al. The Human Oncoprotein and Chromatin Architectural Factor DEK Counteracts DNA Replication Stress. **Oncogene**, v. 34, n. 32, p. 4270–4277, ago. 2015.
- DIAS, M. H. et al. Fibroblast Growth Factor 2 Lethally Sensitizes Cancer Cells to Stress-Targeted Therapeutic Inhibitors. **Molecular oncology**, v. 13, n. 2, p. 290–306, fev. 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30422399>>.
- DING, V. M. Y. et al. Tyrosine Phosphorylation Profiling in FGF-2 Stimulated Human Embryonic Stem Cells. **PLOS ONE**, v. 6, n. 3, p. e17538, 17 mar. 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017538>>.
- DONATI, G. et al. Selective inhibition of rRNA transcription downregulates E2F-1: a new p53-independent mechanism linking cell growth to cell proliferation. **Journal of Cell Science**, v. 124, n. 17, p. 3017–3028, 1 set. 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1242/jcs.086074>>.
- DONG, D. et al. NOL6, a New Founding Oncogene in Human Prostate Cancer and Targeted by MiR-590-3p. **Cytotechnology**, v. 72, n. 3, p. 469–478, jun. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32249364>>.
- DURUT, N.; SÁEZ-VÁSQUEZ, J. Nucleolin: Dual Roles in RDNA Chromatin Transcription. **Gene**, v. 556, n. 1, p. 7–12, fev. 2015.
- EBERHARTER, A.; BECKER, P. B. Histone Acetylation: A Switch between Repressive and

- Permissive Chromatin. Second in Review Series on Chromatin Dynamics. **EMBO reports**, v. 3, n. 3, p. 224–229, mar. 2002.
- EFERL, R.; WAGNER, E. F. AP-1: A Double-Edged Sword in Tumorigenesis. **Nature reviews. Cancer**, v. 3, n. 11, p. 859–868, nov. 2003.
- EICK, D.; GEYER, M. The RNA Polymerase II Carboxy-Terminal Domain (CTD) Code. **Chemical Reviews**, v. 113, n. 11, p. 8456–8490, nov. 2013.
- EISELLEOVA, L. et al. A Complex Role for FGF-2 in Self-Renewal, Survival, and Adhesion of Human Embryonic Stem Cells. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 27, n. 8, p. 1847–1857, ago. 2009.
- ELEUTERI, B.; ARANDA, S.; ERNFORS, P. NoRC Recruitment by H2A.X Deposition at rRNA Gene Promoter Limits Embryonic Stem Cell Proliferation. **Cell Reports**, v. 23, n. 6, p. 1853–1866, 8 maio 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.04.023>>.
- ESPADA, J.; MARTÍN-PÉREZ, J. An Update on Src Family of Nonreceptor Tyrosine Kinases Biology. **International review of cell and molecular biology**, v. 331, p. 83–122, 2017.
- ETIENNE-MANNEVILLE, S.; HALL, A. Rho GTPases in Cell Biology. **Nature**, v. 420, n. 6916, p. 629–635, dez. 2002.
- FAGUNDES, R.; TEIXEIRA, L. K. Cyclin E/CDK2: DNA Replication, Replication Stress and Genomic Instability. **Frontiers in cell and developmental biology**, v. 9, p. 774845, 2021.
- FANGER, G. R.; JOHNSON, N. L.; JOHNSON, G. L. MEK Kinases Are Regulated by EGF and Selectively Interact with Rac/Cdc42. **The EMBO journal**, v. 16, n. 16, p. 4961–4972, ago. 1997.
- FENIG, E. et al. Basic fibroblast growth factor confers growth inhibition and mitogen-activated protein kinase activation in human breast cancer cells. **Clinical Cancer Research**, v. 3, n. 1, p. 135 LP – 142, 1 jan. 1997. Disponível em: <<http://clincancerres.aacrjournals.org/content/3/1/135.abstract>>.
- FILION, G. J. et al. Systematic protein location mapping reveals five principal chromatin types in Drosophila cells. **Cell**, v. 143, n. 2, p. 212–224, 15 out. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3119929/>>.
- FLORENS, L.; WASHBURN, M. P. Proteomic Analysis by Multidimensional Protein Identification Technology. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 328, p. 159–175, 2006a.
- FLORENS, L.; WASHBURN, M. P. Proteomic Analysis by Multidimensional Protein Identification Technology BT - New and Emerging Proteomic Techniques. In: NEDELKOV, D.; NELSON, R. W. (Ed.). Totowa, NJ: Humana Press, 2006b. p. 159–175.
- FORTI, F. L. et al. ACTH Promotion of P27(Kip1) Induction in Mouse Y1 Adrenocortical Tumor Cells Is Dependent on Both PKA Activation and Akt/PKB Inactivation. **Biochemistry**, v. 41, n. 31, p. 10133–10140, ago. 2002.
- FOWLER, T.; SEN, R.; ROY, A. L. Regulation of Primary Response Genes. **Molecular cell**, v. 44, n. 3, p. 348–360, nov. 2011.
- FREED, E. F. et al. NOL11, Implicated in the Pathogenesis of North American Indian Childhood Cirrhosis, Is Required for Pre-rRNA Transcription and Processing. **PLOS Genetics**, v. 8, n. 8, p. e1002892, 16 ago. 2012. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002892>>.

FUKATA, M.; KAIBUCHI, K. Rho-family GTPases in cadherin-mediated cell [mdash] cell adhesion. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 2, n. 12, p. 887–897, dez. 2001. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/35103068>>.

GAMBARINI, A. G.; ARMELIN, H. A. Pituitary Fibroblast Growth Factors: Partial Purification and Characterization. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas**, v. 14, n. 1, p. 19–27, abr. 1981.

GAMBARINI, A. G.; ARMELIN, H. A. Purification and Partial Characterization of an Acidic Fibroblast Growth Factor from Bovine Pituitary. **The Journal of biological chemistry**, v. 257, n. 16, p. 9692–9697, ago. 1982.

GARDNER, K. E.; ALLIS, C. D.; STRAHL, B. D. Operating on Chromatin, a Colorful Language Where Context Matters. **Journal of molecular biology**, v. 409, n. 1, p. 36–46, maio 2011.

GJOERUP, O. et al. Rac and Cdc42 Are Potent Stimulators of E2F-Dependent Transcription Capable of Promoting Retinoblastoma Susceptibility Gene Product Hyperphosphorylation. **The Journal of biological chemistry**, v. 273, n. 30, p. 18812–18818, jul. 1998.

GOETZ, R.; MOHAMMADI, M. Exploring mechanisms of FGF signalling through the lens of structural biology. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 14, n. 3, p. 166–180, 13 mar. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3695728/>>.

GONZALES, B. et al. The Treacher Collins Syndrome (TCOF1) Gene Product Is Involved in Pre-RRNA Methylation. **Human molecular genetics**, v. 14, n. 14, p. 2035–2043, jul. 2005.

GREGORY, B. et al. The Small and Large Ribosomal Subunits Depend on Each Other for Stability and Accumulation. **Life science alliance**, v. 2, n. 2, abr. 2019.

GRUDA, M. C. et al. Regulation of Fra-1 and Fra-2 Phosphorylation Differs during the Cell Cycle of Fibroblasts and Phosphorylation in Vitro by MAP Kinase Affects DNA Binding Activity. **Oncogene**, v. 9, n. 9, p. 2537–2547, set. 1994.

GRUMMT, I. Life on a planet of its own: regulation of RNA polymerase I transcription in the nucleolus. **Genes & Development**, v. 17, n. 14, p. 1691–1702, 15 jul. 2003. Disponível em: <<http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.1098503R>>.

GRUMMT, I.; LÄNGST, G. Epigenetic control of RNA polymerase I transcription in mammalian cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1829, n. 3, p. 393–404, 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874939912001757>>.

GUO, H. et al. NR4A1 Regulates Expression of Immediate Early Genes, Suppressing Replication Stress in Cancer. **Molecular cell**, v. 81, n. 19, p. 4041–4058.e15, out. 2021.

HACOT, S. et al. Isolation of Nucleoli. **Current Protocols in Cell Biology**, v. 47, n. 1, p. 3.36.1–3.36.10, 1 jun. 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/0471143030.cb0336s47>>.

HAMPERL, S. et al. Chromatin States at Ribosomal DNA Loci. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1829, n. 3–4, p. 405–417, 2013.

HARFOUCHE, G. et al. Fibroblast Growth Factor Type 2 Signaling Is Critical for DNA Repair in Human Keratinocyte Stem Cells. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 28, n. 9, p. 1639–1648, set. 2010.

HEASMAN, S. J.; RIDLEY, A. J. Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 9, n. 9, p. 690–701, set. 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrm2476>>.

HENRAS, A. K. et al. An Overview of Pre-Ribosomal RNA Processing in Eukaryotes. **Wiley interdisciplinary reviews. RNA**, v. 6, n. 2, p. 225–242, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25346433>>.

HERNANDEZ-VERDUN, D. Assembly and disassembly of the nucleolus during the cell cycle. **Nucleus**, v. 2, n. 3, p. 189–194, 15 abr. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3149879/>>.

HERST, P. M. et al. Functional Mitochondria in Health and Disease. **Frontiers in Endocrinology**, v. 8, p. 296, 3 nov. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5675848/>>.

HEYNEN, S. R. et al. Retinal degeneration modulates intracellular localization of CDC42 in photoreceptors. **Molecular Vision**, v. 17, p. 2934–2946, 15 nov. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3224843/>>.

HILL, C. S.; WYNNE, J.; TREISMAN, R. Serum-regulated transcription by serum response factor (SRF): a novel role for the DNA binding domain. **The EMBO Journal**, v. 13, n. 22, p. 5421–5432, 15 nov. 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC395499/>>.

HO, C.-M. K. et al. Transcriptional profiling reveals signatures of latent developmental potential in Arabidopsis stomatal lineage ground cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 118, n. 17, p. e2021682118, 27 abr. 2021. Disponível em: <<http://www.pnas.org/content/118/17/e2021682118.abstract>>.

HOFER, A. et al. DNA Building Blocks: Keeping Control of Manufacture. **Critical reviews in biochemistry and molecular biology**, v. 47, n. 1, p. 50–63, 2012.

HOLMSTRÖM, T. H. et al. C-Jun Supports Ribosomal RNA Processing and Nucleolar Localization of RNA Helicase DDX21. **The Journal of biological chemistry**, v. 283, n. 11, p. 7046–7053, 2008. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/MED/18180292>>.

HSIN, J.-P.; MANLEY, J. L. The RNA Polymerase II CTD Coordinates Transcription and RNA Processing. **Genes & development**, v. 26, n. 19, p. 2119–2137, out. 2012.

HU, S. et al. Profiling the Human Protein-DNA Interactome Reveals MAPK1 as a Transcriptional Repressor of Interferon Signalling. **Cell**, v. 139, n. 3, p. 610–622, 30 out. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2774939/>>.

HUANG, D. W.; SHERMAN, B. T.; LEMPICKI, R. A. Systematic and Integrative Analysis of Large Gene Lists Using DAVID Bioinformatics Resources. **Nature protocols**, v. 4, n. 1, p. 44–57, 2009a.

HUANG, D. W.; SHERMAN, B. T.; LEMPICKI, R. A. Bioinformatics Enrichment Tools: Paths toward the Comprehensive Functional Analysis of Large Gene Lists. **Nucleic acids research**, v. 37, n. 1, p. 1–13, jan. 2009b.

HUBSCHER, U. DNA Replication Fork Proteins. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 521, p. 19–33, 2009.

ITOH, N. The Fgf Families in Humans, Mice, and Zebrafish: Their Evolutional Processes and

Roles in Development, Metabolism, and Disease. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n. 10, p. 1819–1825, 2007.

IYENGAR, S.; FARNHAM, P. J. KAP1 Protein: An Enigmatic Master Regulator of the Genome. **The Journal of biological chemistry**, v. 286, n. 30, p. 26267–26276, jul. 2011.

JAFFE, A. B.; HALL, A. RHO GTPASES: Biochemistry and Biology. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 21, n. 1, p. 247–269, 7 out. 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.21.020604.150721>>.

JANKY, R. et al. iRegulon: From a Gene List to a Gene Regulatory Network Using Large Motif and Track Collections. **PLOS Computational Biology**, v. 10, n. 7, p. e1003731, 24 jul. 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003731>>.

JOHNSON, D. I. Cdc42: An Essential Rho-Type GTPase Controlling Eukaryotic Cell Polarity. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 63, n. 1, p. 54–105, mar. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC98957/>>.

JOHNSON, D. I.; PRINGLE, J. R. Molecular characterization of CDC42, a *Saccharomyces cerevisiae* gene involved in the development of cell polarity. **The Journal of Cell Biology**, v. 111, n. 1, p. 143 LP – 152, 1 jul. 1990. Disponível em: <<http://jcb.rupress.org/content/111/1/143.abstract>>.

KAR, B. et al. Quantitative nucleolar proteomics reveals nuclear re-organization during stress-induced senescence in mouse fibroblast. **BMC Cell Biology**, v. 12, n. 1, p. 33, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/1471-2121-12-33>>.

KASLER, H. G. et al. ERK5 Is a Novel Type of Mitogen-Activated Protein Kinase Containing a Transcriptional Activation Domain. **Molecular and Cellular Biology**, v. 20, n. 22, p. 8382–8389, 21 nov. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC102145/>>.

KAYAHARA, M.; WANG, X.; TOURNIER, C. Selective Regulation of C-Jun Gene Expression by Mitogen-Activated Protein Kinases via the 12-o-Tetradecanoylphorbol-13-Acetate- Responsive Element and Myocyte Enhancer Factor 2 Binding Sites. **Molecular and cellular biology**, v. 25, n. 9, p. 3784–3792, maio 2005.

KIMURA, E. et al. Induction of FOS and JUN proteins by adrenocorticotropin and phorbol ester but not by 3',5'-cyclic adenosine monophosphate derivatives. **Molecular Endocrinology**, v. 7, n. 11, p. 1463–1471, 1 nov. 1993. Disponível em: <<https://doi.org/10.1210/mend.7.11.8114760>>.

KIMURA, E.; ARMELIN, H. A. Growth Control in Mouse Y-1 Adrenocortical Tumor Cells: Role of c-Ki-Ras Amplification and Effects of ACTH. **Archivos de biologia y medicina experimentales**, v. 21, n. 3–4, p. 435–441, dez. 1988.

KITO, K.; ITO, T. Mass Spectrometry-Based Approaches toward Absolute Quantitative Proteomics. **Current genomics**, v. 9, n. 4, p. 263–274, jun. 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19452043>>.

KUCHIN, S.; TREICH, I.; CARLSON, M. A Regulatory Shortcut between the Snf1 Protein Kinase and RNA Polymerase II Holoenzyme. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 14, p. 7916–7920, jul. 2000.

KUSTATSCHER, G. et al. Proteomics of a Fuzzy Organelle: Interphase Chromatin. **The EMBO journal**, v. 33, n. 6, p. 648–664, mar. 2014a.

KUSTATSCHER, G. et al. Chromatin Enrichment for Proteomics. **Nature protocols**, v. 9, n. 9, p. 2090–2099, set. 2014b.

KUSTATSCHER, G.; GRABOWSKI, P.; RAPPILBER, J. Multiclassifier combinatorial proteomics of organelle shadows at the example of mitochondria in chromatin data. **Proteomics**, v. 16, n. 3, p. 393–401, 25 fev. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4862026/>>.

KYRIAKIS, J. M.; AVRUCH, J. Mammalian Mitogen-Activated Protein Kinase Signal Transduction Pathways Activated by Stress and Inflammation. **Physiological reviews**, v. 81, n. 2, p. 807–869, abr. 2001.

LAFONTAINE, D. L. J. et al. The nucleolus as a multiphase liquid condensate. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 22, n. 3, p. 165–182, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41580-020-0272-6>>.

LAI, A. Y.; WADE, P. A. Cancer biology and NuRD: a multifaceted chromatin remodelling complex. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, n. 8, p. 588–596, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nrc3091>>.

LANGOWSKI, J.; HEERMANN, D. W. Computational Modeling of the Chromatin Fiber. **Seminars in cell & developmental biology**, v. 18, n. 5, p. 659–667, out. 2007.

LENSTRA, T. L. et al. The specificity and topology of chromatin interaction pathways in yeast. **Molecular cell**, v. 42, n. 4, p. 536–549, 20 maio 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4435841/>>.

LEPIQUE, A. P. et al. C-Myc Protein Is Stabilized by Fibroblast Growth Factor 2 and Destabilized by ACTH to Control Cell Cycle in Mouse Y1 Adrenocortical Cells. **Journal of molecular endocrinology**, v. 33, n. 3, p. 623–638, dez. 2004.

LESNIK, C. et al. OM14 is a mitochondrial receptor for cytosolic ribosomes that supports co-translational import into mitochondria. **Nature Communications**, v. 5, p. 5711, 9 dez. 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/ncomms6711>>.

LI, J. et al. CDC42 is required for epicardial and pro-epicardial development by mediating FGF receptor trafficking to the plasma membrane. **Development (Cambridge, England)**, v. 144, n. 9, p. 1635–1647, 1 maio 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5450847/>>.

LIONAKI, E.; GKIKAS, I.; TAVERNARAKIS, N. Differential Protein Distribution between the Nucleus and Mitochondria: Implications in Aging. **Frontiers in Genetics**, v. 7, p. 162, 16 set. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5025450/>>.

LOPES, M. C. ANÁLISE EM LARGA ESCALA DA SENESCÊNCIA DESENCADEADA POR FGF-2 EM CÉLULAS TUMORAIS DE CAMUNDONGO DA LINHAGEM Y1. 2019. Universidade Federal de São Paulo, 2019.

LOTFI, C. F.; ARMELIN, H. A. Cfos and Cjun Antisense Oligonucleotides Block Mitogenesis Triggered by Fibroblast Growth Factor-2 and ACTH in Mouse Y1 Adrenocortical Cells. **The Journal of endocrinology**, v. 168, n. 3, p. 381–389, mar. 2001.

LUND, P. J. et al. FGF-2 induces a failure of cell cycle progression in cells harboring amplified K-Ras, revealing new insights into oncogene-induced senescence. **Molecular Omics**, v. 17, n. 5, p. 725–739, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/D1MO00019E>>.

- LV, J. et al. Cdc42 Regulates LPS-Induced Proliferation of Primary Pulmonary Microvascular Endothelial Cells via ERK Pathway. **Microvascular research**, v. 109, p. 45–53, jan. 2017.
- MA, T.-H. et al. Genetic Control of Nucleolar Size: An Evolutionary Perspective. **Nucleus (Austin, Tex.)**, v. 7, n. 2, p. 112–120, 22 mar. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27003693>>.
- MACIEIRA-COELHO, A.; PUVION-DUTILLEUL, F. Genome Reorganization during Aging of Dividing Cells. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 190, p. 391–419, 1985.
- MAIER, V. K.; CHIODA, M.; BECKER, P. B. ATP-Dependent Chromatin Remodeling. **Biological chemistry**, v. 389, n. 4, p. 345–352, abr. 2008.
- MAYER, C.; GRUMMT, I. Cellular Stress and Nucleolar Function. **Cell cycle (Georgetown, Tex.)**, v. 4, n. 8, p. 1036–1038, ago. 2005.
- MCDONALD, W. H. et al. MS1, MS2, and SQT-Three Unified, Compact, and Easily Parsed File Formats for the Storage of Shotgun Proteomic Spectra and Identifications. **Rapid communications in mass spectrometry : RCM**, v. 18, n. 18, p. 2162–2168, 2004.
- MEIER, U. T.; BLOBEL, G. Nopp140 Shuttles on Tracks between Nucleolus and Cytoplasm. **Cell**, v. 70, n. 1, p. 127–138, jul. 1992.
- MENG, L. et al. Nucleolar Protein 6 Promotes Cell Proliferation and Acts as a Potential Novel Prognostic Marker for Hepatocellular Carcinoma. **Chinese medical journal**, v. 134, n. 21, p. 2611–2618, set. 2021.
- MEYER, B. et al. The Bowen-Conradi Syndrome Protein Nep1 (Emg1) Has a Dual Role in Eukaryotic Ribosome Biogenesis, as an Essential Assembly Factor and in the Methylation of Ψ 1191 in Yeast 18S rRNA. **Nucleic acids research**, v. 39, n. 4, p. 1526–1537, mar. 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20972225>>.
- MI, H. et al. PANTHER version 16: a revised family classification, tree-based classification tool, enhancer regions and extensive API. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. D1, p. D394–D403, 8 jan. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1106>>.
- MICHAELSON, D. et al. Rac1 Accumulates in the Nucleus during the G2 Phase of the Cell Cycle and Promotes Cell Division. **The Journal of cell biology**, v. 181, n. 3, p. 485–496, maio 2008.
- MILLER, G. et al. HRRN3 Is Essential in the SL1-Mediated Recruitment of RNA Polymerase I to rRNA Gene Promoters. **The EMBO journal**, v. 20, n. 6, p. 1373–1382, mar. 2001.
- MITTAL, P.; ROBERTS, C. W. M. The SWI/SNF complex in cancer — biology, biomarkers and therapy. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 17, n. 7, p. 435–448, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41571-020-0357-3>>.
- MONACO, P. L. et al. **2'-O-Methylation of Ribosomal RNA: Towards an Epitranscriptomic Control of Translation?** **Biomolecules**, 2018. .
- MOSS, T. et al. A New Paradigm for the Regulation of the Mammalian Ribosomal RNA Genes. **Biochemical Society transactions**, v. 34, n. Pt 6, p. 1079–1081, dez. 2006.
- MOSS, T. et al. The chromatin landscape of the ribosomal RNA genes in mouse and human. **Chromosome Research**, v. 27, n. 1, p. 31–40, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10577-018-09603-9>>.

MUKHERJEE, R. N.; CHEN, P.; LEVY, D. L. Recent Advances in Understanding Nuclear Size and Shape. **Nucleus (Austin, Tex.)**, v. 7, n. 2, p. 167–186, abr. 2016.

MURAI, J. et al. Chromatin Remodeling and Immediate Early Gene Activation by SLFN11 in Response to Replication Stress. **Cell reports**, v. 30, n. 12, p. 4137–4151.e6, mar. 2020.

MURAYAMA, A. et al. Epigenetic Control of RDNA Loci in Response to Intracellular Energy Status. **Cell**, v. 133, n. 4, p. 627–639, maio 2008.

NEBEN, C. L. et al. Bent bone dysplasia syndrome reveals nucleolar activity for FGFR2 in ribosomal DNA transcription. **Human Molecular Genetics**, v. 23, n. 21, p. 5659–5671, 1 nov. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4189901/>>.

NÉMETH, A.; LÄNGST, G. Chromatin Organization of Active Ribosomal RNA Genes. **Epigenetics**, v. 3, n. 5, p. 243–245, set. 2008.

NÉMETH, A.; LÄNGST, G. Genome Organization in and around the Nucleolus. **Trends in genetics : TIG**, v. 27, n. 4, p. 149–156, abr. 2011.

NORDLUND, P.; REICHARD, P. Ribonucleotide Reductases. **Annual review of biochemistry**, v. 75, p. 681–706, 2006.

ONBERG, A. L.; VITEK, O. Statistical Design of Quantitative Mass Spectrometry-Based Proteomic Experiments. **Journal of Proteome Research**, v. 8, n. 5, p. 2144–2156, 1 maio 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/pr8010099>>.

OGAWA, L. M.; BASERGA, S. J. Crosstalk between the Nucleolus and the DNA Damage Response. **Molecular bioSystems**, v. 13, n. 3, p. 443–455, fev. 2017.

OHTA, S. et al. The Protein Composition of Mitotic Chromosomes Determined Using Multiclassifier Combinatorial Proteomics. **Cell**, v. 142, n. 5, p. 810–821, 10 ago. 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2010.07.047>>.

PAIK, J. C. et al. Regulation of E2F1-Induced Apoptosis by the Nucleolar Protein RRP1B. **The Journal of biological chemistry**, v. 285, n. 9, p. 6348–6363, fev. 2010.

PASSEGUE, E. et al. Chronic Myeloid Leukemia with Increased Granulocyte Progenitors in Mice Lacking JunB Expression in the Myeloid Lineage. **Cell**, v. 104, n. 1, p. 21–32, jan. 2001.

PASSEGUÉ, E.; WAGNER, E. F. JunB suppresses cell proliferation by transcriptional activation of p16(INK4a) expression. **The EMBO Journal**, v. 19, n. 12, p. 2969–2979, jun. 2000a.

PASSEGUÉ, E.; WAGNER, E. F. JunB suppresses cell proliferation by transcriptional activation of p16(INK4a) expression. **The EMBO Journal**, v. 19, n. 12, p. 2969–2979, 15 jun. 2000b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC203376/>>.

PAVELKA, N. et al. Statistical Similarities between Transcriptomics and Quantitative Shotgun Proteomics Data * . **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 7, n. 4, p. 631–644, 1 abr. 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1074/mcp.M700240-MCP200>>.

PEDERSON, T. Growth Factors in the Nucleolus? . **The Journal of Cell Biology**, v. 143, n. 2, p. 279–281, 19 out. 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2132844/>>.

PETERS, J.-M. The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 7, n. 9, p. 644–656, 2006. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1038/nrm1988>>.

PFAFFL, M. W. A New Mathematical Model for Relative Quantification in Real-Time RT-PCR. **Nucleic acids research**, v. 29, n. 9, p. e45–e45, 1 maio 2001. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11328886>>.

PIECHACZYK, M.; FARRAS, R. Regulation and Function of JunB in Cell Proliferation. **Biochemical Society transactions**, v. 36, n. Pt 5, p. 864–867, out. 2008.

PLOTNIKOV, A. et al. The MAPK cascades: Signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1813, n. 9, p. 1619–1633, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167488910003228>>.

POKHOLOK, D. K. et al. Genome-wide map of nucleosome acetylation and methylation in yeast. **Cell**, v. 122, n. 4, 2005. Disponível em: <<http://f1000.com/1027978>>.

POKHOLOK, D. K. et al. Activated Signal Transduction Kinases Frequently Occupy Target Genes. **Science**, v. 313, n. 5786, p. 533 LP – 536, 28 jul. 2006. Disponível em: <<http://science.sciencemag.org/content/313/5786/533.abstract>>.

PORIA, D. K.; RAY, P. S. Polysome Analysis. **Bio-protocol**, v. 7, n. 6, p. e2192, 20 mar. 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28603752>>.

POTAPOVA, T. A.; GERTON, J. L. Ribosomal DNA and the nucleolus in the context of genome organization. **Chromosome Research**, v. 27, n. 1, p. 109–127, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10577-018-9600-5>>.

PRIETO, J.-L.; MCSTAY, B. Recruitment of Factors Linking Transcription and Processing of Pre-RRNA to NOR Chromatin Is UBF-Dependent and Occurs Independent of Transcription in Human Cells. **Genes & development**, v. 21, n. 16, p. 2041–2054, ago. 2007.

PYLAYEVA-GUPTA, Y.; GRABOCKA, E.; BAR-SAGI, D. RAS Oncogenes: Weaving a Tumorigenic Web. **Nature reviews. Cancer**, v. 11, n. 11, p. 761–774, out. 2011.

QIU, R. G. et al. Cdc42 regulates anchorage-independent growth and is necessary for Ras transformation. **Molecular and Cellular Biology**, v. 17, n. 6, p. 3449–3458, jun. 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC232198/>>.

RAJAKYLA, E. K.; VARTIAINEN, M. K. Rho, Nuclear Actin, and Actin-Binding Proteins in the Regulation of Transcription and Gene Expression. **Small GTPases**, v. 5, p. e27539, 2014.

REICHARD, P. Interactions between Deoxyribonucleotide and DNA Synthesis. **Annual review of biochemistry**, v. 57, p. 349–374, 1988.

RICOL, D. et al. Tumour Suppressive Properties of Fibroblast Growth Factor Receptor 2-IIIb in Human Bladder Cancer. **Oncogene**, v. 18, n. 51, p. 7234–7243, dez. 1999.

ROCHA, K. M. et al. Deconstructing the molecular mechanisms of cell cycle control in a mouse adrenocortical cell line: Roles of ACTH. **Microscopy Research and Technique**, v. 61, n. 3, p. 268–274, 15 jun. 2003. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/jemt.10336>>.

ROSENBERGER, S. F.; GUPTA, A.; BOWDEN, G. T. Inhibition of P38 MAP Kinase Increases Okadaic Acid Mediated AP-1 Expression and DNA Binding but Has No Effect on TRE Dependent Transcription. **Oncogene**, v. 18, n. 24, p. 3626–3632, jun. 1999.

RUBBI, C. P.; MILNER, J. p53 is a chromatin accessibility factor for nucleotide excision repair

of DNA damage. **The EMBO Journal**, v. 22, n. 4, p. 975–986, 17 fev. 2003a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC145442/>>.

RUBBI, C. P.; MILNER, J. Disruption of the nucleolus mediates stabilization of p53 in response to DNA damage and other stresses. **The EMBO Journal**, v. 22, n. 22, p. 6068–6077, 17 nov. 2003b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC275437/>>.

RUSSO, A. et al. Human rpL3 induces G₁/S arrest or apoptosis by modulating p21waf1/cip1 levels in a p53-independent manner. **Cell Cycle**, v. 12, n. 1, p. 76–87, 1 jan. 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.4161/cc.22963>>.

SALOTTI, J. et al. Fibroblast Growth Factor 2 Causes G₂/M Cell Cycle Arrest in Ras-Driven Tumor Cells through a Src-Dependent Pathway. **PLoS one**, v. 8, n. 8, p. e72582, 2013.

SANDILANDS, E. et al. Src Kinase Modulates the Activation, Transport and Signalling Dynamics of Fibroblast Growth Factor Receptors. **EMBO reports**, v. 8, n. 12, p. 1162–1169, dez. 2007.

SANTORO, R.; LI, J.; GRUMMT, I. The Nucleolar Remodeling Complex NoRC Mediates Heterochromatin Formation and Silencing of Ribosomal Gene Transcription. **Nature genetics**, v. 32, n. 3, p. 393–396, nov. 2002.

SCHÖFER, C.; WEIPOLTSHAMMER, K. Nucleolus and chromatin. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 150, n. 3, p. 209–225, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00418-018-1696-3>>.

SCHULTZ, D. C. et al. SETDB1: A Novel KAP-1-Associated Histone H3, Lysine 9-Specific Methyltransferase That Contributes to HP1-Mediated Silencing of Euchromatic Genes by KRAB Zinc-Finger Proteins. **Genes & development**, v. 16, n. 8, p. 919–932, abr. 2002.

SCHWAB, M. et al. A Cellular Oncogene (c-Ki-Ras) Is Amplified, Overexpressed, and Located within Karyotypic Abnormalities in Mouse Adrenocortical Tumour Cells. **Nature**, v. 303, n. 5917, p. 497–501, jun. 1983.

SCHWÄMMLE, V.; JENSEN, O. N. A simple and fast method to determine the parameters for fuzzy c-means cluster analysis. **Bioinformatics**, v. 26, n. 22, p. 2841–2848, 15 nov. 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btq534>>.

SHARIF, S. B.; ZAMANI, N.; CHADWICK, B. P. **BAZ1B the Protean ProteinGenes**, 2021.

SHARIFI TABAR, M. et al. Unique protein interaction networks define the chromatin remodelling module of the NuRD complex. **The FEBS Journal**, v. n/a, n. n/a, 7 jul. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/febs.16112>>.

SHAULIAN, E. AP-1--The Jun Proteins: Oncogenes or Tumor Suppressors in Disguise? **Cellular signalling**, v. 22, n. 6, p. 894–899, jun. 2010.

SHENG, Z. et al. Direct Regulation of RRNA Transcription by Fibroblast Growth Factor 2. **Molecular and cellular biology**, v. 25, n. 21, p. 9419–9426, nov. 2005.

SHERR, C. J.; ROBERTS, J. M. CDK Inhibitors: Positive and Negative Regulators of G₁-Phase Progression. **Genes & development**, v. 13, n. 12, p. 1501–1512, jun. 1999.

SHIIO, Y. et al. Quantitative proteomic analysis of chromatin-associated factors. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 14, n. 7, p. 696–703, 2003. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S1044-0305\(03\)00204-6](https://doi.org/10.1016/S1044-0305(03)00204-6)>.

SIDOLI, S. et al. A mass spectrometry-based assay using metabolic labeling to rapidly monitor chromatin accessibility of modified histone proteins. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 13613, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-019-49894-4>>.

SIMON, J. A.; KINGSTON, R. E. Occupying Chromatin: Polycomb Mechanisms for Getting to Genomic Targets, Stopping Transcriptional Traffic, and Staying Put. **Molecular Cell**, v. 49, n. 5, p. 808–824, 7 mar. 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.02.013>>.

SIMONE, C. et al. p38 pathway targets SWI-SNF chromatin-remodeling complex to muscle-specific loci. **Nat Genet**, v. 36, n. 7, p. 738–743, jul. 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/ng1378>>.

SINGH, R. R. et al. Nuclear Localization and Chromatin Targets of P21-Activated Kinase 1. **The Journal of biological chemistry**, v. 280, n. 18, p. 18130–18137, maio 2005.

SMITH, E. A. et al. The Nuclear DEK Interactome Supports Multi-Functionality. **Proteins**, v. 86, n. 1, p. 88–97, jan. 2018.

SMITS, V. A. et al. Negative Growth Regulation of SK-N-MC Cells by BFGF Defines a Growth Factor-Sensitive Point in G2. **The Journal of biological chemistry**, v. 275, n. 25, p. 19375–19381, jun. 2000.

SOUTOURINA, J. Transcription regulation by the Mediator complex. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 19, n. 4, p. 262–274, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nrm.2017.115>>.

SRIVASTAVA, R.; SRIVASTAVA, R.; AHN, S. H. The Epigenetic Pathways to Ribosomal DNA Silencing. **Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR**, v. 80, n. 3, p. 545–563, 1 set. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4981667/>>.

STEFANOVSKY, V. et al. Growth Factor Signaling Regulates Elongation of RNA Polymerase I Transcription in Mammals via UBF Phosphorylation and R-Chromatin Remodeling. **Molecular cell**, v. 21, n. 5, p. 629–639, mar. 2006.

STEFANOVSKY, V. Y. et al. An Immediate Response of Ribosomal Transcription to Growth Factor Stimulation in Mammals Is Mediated by ERK Phosphorylation of UBF. **Molecular cell**, v. 8, n. 5, p. 1063–1073, nov. 2001.

STOCHAJ, U.; WEBER, S. C. **Nucleolar Organization and Functions in Health and Disease**. **Cells**, fev. 2020. .

STRAHL, B. D.; ALLIS, C. D. The language of covalent histone modifications. **Nature**, v. 403, n. 6765, p. 41–45, 2000. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/47412>>.

STROHNER, R. et al. NoRC--a Novel Member of Mammalian ISWI-Containing Chromatin Remodeling Machines. **The EMBO journal**, v. 20, n. 17, p. 4892–4900, set. 2001.

SUN, Y. et al. A Dissection of Oligomerization by the TRIM28 Tripartite Motif and the Interaction with Members of the Krab-ZFP Family. **Journal of molecular biology**, v. 431, n. 14, p. 2511–2527, jun. 2019.

SUTENDRA, G. et al. A Nuclear Pyruvate Dehydrogenase Complex Is Important for the Generation of Acetyl-CoA and Histone Acetylation. **Cell**, v. 158, n. 1, p. 84–97, jul. 2014.

SUZUKI, A. et al. A New PICTURE of Nucleolar Stress. **Cancer science**, v. 103, n. 4, p. 632–637, abr. 2012.

SZCZEPANEK, K.; LESNEFSKY, E. J.; LARNER, A. C. Multi-Tasking: Nuclear Transcription Factors with Novel Roles in the Mitochondria. **Trends in cell biology**, v. 22, n. 8, p. 429–437, ago. 2012.

TABB, D. L.; MCDONALD, W. H.; YATES, J. R. 3rd. DTASelect and Contrast: Tools for Assembling and Comparing Protein Identifications from Shotgun Proteomics. **Journal of proteome research**, v. 1, n. 1, p. 21–26, 2002.

TAIRA, T. et al. AMY-1, a Novel C-MYC Binding Protein That Stimulates Transcription Activity of C-MYC. **Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms**, v. 3, n. 8, p. 549–565, ago. 1998.

THOMPSON, A. et al. Tandem Mass Tags: A Novel Quantification Strategy for Comparative Analysis of Complex Protein Mixtures by MS/MS. **Analytical chemistry**, v. 75, n. 8, p. 1895–1904, abr. 2003.

TIAN, Y. et al. Mitochondrial stress induces chromatin reorganization to promote longevity and UPR(mt). **Cell**, v. 165, n. 5, p. 1197–1208, 19 maio 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4889216/>>.

TORO, G. C.; GALANTI, N. Trypanosoma Cruzi Histones. Further Characterization and Comparison with Higher Eukaryotes. **Biochemistry international**, v. 21, n. 3, p. 481–490, 1990.

TORRENTE, M. P. et al. Proteomic Interrogation of Human Chromatin. **PLOS ONE**, v. 6, n. 9, p. e24747, 14 set. 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024747>>.

TSUI, C. et al. dCas9-targeted locus-specific protein isolation method identifies histone gene regulators. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 12, p. E2734 LP-E2741, 20 mar. 2018. Disponível em: <<http://www.pnas.org/content/115/12/E2734.abstract>>.

TURNER, N.; GROSE, R. Fibroblast Growth Factor Signalling: From Development to Cancer. **Nature reviews. Cancer**, v. 10, n. 2, p. 116–129, fev. 2010.

UENO, M. et al. PSF1 Is Essential for Early Embryogenesis in Mice. **Molecular and cellular biology**, v. 25, n. 23, p. 10528–10532, dez. 2005.

UTAMA, B. et al. Isolation and Characterization of a New Nucleolar Protein, Nrap, That Is Conserved from Yeast to Humans. **Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms**, v. 7, n. 2, p. 115–132, fev. 2002.

VALDEZ, B. C. et al. The Treacher Collins Syndrome (TCOF1) Gene Product Is Involved in Ribosomal DNA Gene Transcription by Interacting with Upstream Binding Factor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 29, p. 10709–10714, jul. 2004.

VAN MIERLO, G.; VERMEULEN, M. Chromatin Proteomics to Study Epigenetics - Challenges and Opportunities. **Molecular & cellular proteomics : MCP**, v. 20, p. 100056, 2021.

VAN STEENSEL, B. Chromatin: Constructing the Big Picture. **The EMBO journal**, v. 30, n. 10, p. 1885–1895, maio 2011.

VAQUERO, A. et al. Human SirT1 Interacts with Histone H1 and Promotes Formation of Facultative Heterochromatin. **Molecular Cell**, v. 16, n. 1, p. 93–105, 8 out. 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.08.031>>.

VERCOUTTER-EDOUART, A. et al. The Mitogenic Signaling Pathway for Fibroblast Growth Factor-2 Involves the Tyrosine Phosphorylation of Cyclin D2 in MCF-7 Human Breast Cancer Cells. **FEBS letters**, v. 478, n. 3, p. 209–215, ago. 2000.

VERONA, R. et al. E2F Activity Is Regulated by Cell Cycle-Dependent Changes in Subcellular Localization. **Molecular and cellular biology**, v. 17, n. 12, p. 7268–7282, dez. 1997. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9372959>>.

VILLÉN, J.; GYGI, S. P. The SCX/IMAC enrichment approach for global phosphorylation analysis by mass spectrometry. **Nature protocols**, v. 3, n. 10, p. 1630–1638, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2728452/>>.

VITORINO, F. N. de L. et al. FGF2 Antiproliferative Stimulation Induces Proteomic Dynamic Changes and High Expression of FOSB and JUNB in K-Ras-Driven Mouse Tumor Cells. **PROTEOMICS**, v. 18, n. 17, p. 1800203, 23 jul. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/pmic.201800203>>.

VYAS, S.; ZAGANJOR, E.; HAIGIS, M. C. Mitochondria and Cancer. **Cell**, v. 166, n. 3, p. 555–566, 28 jul. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5036969/>>.

WANG, C. et al. Regulation of E2F1 Function by the Nuclear Corepressor KAP1. **The Journal of biological chemistry**, v. 282, n. 41, p. 29902–29909, out. 2007.

WARDA, A. S. et al. Effects of the Bowen-Conradi Syndrome Mutation in EMG1 on Its Nuclear Import, Stability and Nucleolar Recruitment. **Human molecular genetics**, v. 25, n. 24, p. 5353–5364, dez. 2016.

WASHBURN, M. P.; WOLTERS, D.; YATES, J. R. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. **Nature Biotechnology**, v. 19, n. 3, p. 242–247, 2001. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/85686>>.

WEHR, T. Top-Down versus Bottom-Up Approaches in Proteomics. **LCGC North America**, LCGC North America-09-01-2006. v. 24, n. 9, p. 1004–1010, 2006. Disponível em: <<https://www.chromatographyonline.com/view/top-down-versus-bottom-approaches-proteomics-0>>.

WERNER, A. et al. Cell-fate determination by ubiquitin-dependent regulation of translation. **Nature**, v. 525, n. 7570, p. 523–527, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nature14978>>.

WIERER, M.; MANN, M. Proteomics to Study DNA-Bound and Chromatin-Associated Gene Regulatory Complexes. **Human molecular genetics**, v. 25, n. R2, p. R106–R114, out. 2016.

WILLIAMS, C. L. The polybasic region of Ras and Rho family small GTPases: a regulator of protein interactions and membrane association and a site of nuclear localization signal sequences. **Cellular Signalling**, v. 15, n. 12, p. 1071–1080, 2003. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0898656803000986>>.

WILSON, K. F.; WU, W. J.; CERIONE, R. A. Cdc42 Stimulates RNA Splicing via the S6 Kinase and a Novel S6 Kinase Target, the Nuclear Cap-Binding Complex. **The Journal of biological chemistry**, v. 275, n. 48, p. 37307–37310, dez. 2000.

WISE, C. A. et al. TCOF1 Gene Encodes a Putative Nucleolar Phosphoprotein That Exhibits Mutations in Treacher Collins Syndrome throughout Its Coding Region. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 7, p. 3110–3115,

abr. 1997.

WURM, J. P. et al. The Ribosome Assembly Factor Nep1 Responsible for Bowen-Conradi Syndrome Is a Pseudouridine-N1-Specific Methyltransferase. **Nucleic acids research**, v. 38, n. 7, p. 2387–2398, abr. 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20047967/>>.

XIAO, A. et al. WSTF regulates the H2A.X DNA damage response via a novel tyrosine kinase activity. **Nature**, v. 457, n. 7225, p. 57–62, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nature07668>>.

XIE, W. et al. The chromatin remodeling complex NuRD establishes the poised state of rRNA genes characterized by bivalent histone modifications and altered nucleosome positions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 21, p. 8161 LP – 8166, 22 maio 2012. Disponível em: <<http://www.pnas.org/content/109/21/8161.abstract>>.

XU, T. et al. ProLuCID: An Improved SEQUEST-like Algorithm with Enhanced Sensitivity and Specificity. **Journal of proteomics**, v. 129, p. 16–24, nov. 2015.

YANG, Y. et al. Conserved Composition of Mammalian Box H/ACA and Box C/D Small Nucleolar Ribonucleoprotein Particles and Their Interaction with the Common Factor Nopp140. **Molecular biology of the cell**, v. 11, n. 2, p. 567–577, fev. 2000.

ZENG, J. et al. The Histone Demethylase RBP2 Is Overexpressed in Gastric Cancer and Its Inhibition Triggers Senescence of Cancer Cells. **Gastroenterology**, v. 138, n. 3, p. 981–992, mar. 2010.

ZHANG, B. et al. C-Terminal Domain (CTD) Phosphatase Links Rho GTPase Signaling to Pol II CTD Phosphorylation in Arabidopsis and Yeast. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 50, p. E8197–E8206, dez. 2016.

ZHANG, R.; CHEN, W.; ADAMS, P. D. Molecular Dissection of Formation of Senescence-Associated Heterochromatin Foci. **Molecular and cellular biology**, v. 27, n. 6, p. 2343–2358, mar. 2007.

ZHANG, Y. et al. Effect of Dynamic Exclusion Duration on Spectral Count Based Quantitative Proteomics. **Analytical chemistry**, v. 81, n. 15, p. 6317–6326, ago. 2009.

ZHANG, Y. et al. Refinements to Label Free Proteome Quantitation: How to Deal with Peptides Shared by Multiple Proteins. **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 6, p. 2272–2281, 15 mar. 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/ac9023999>>.

ZHANG, Y. et al. Improving Proteomics Mass Accuracy by Dynamic Offline Lock Mass. **Analytical Chemistry**, v. 83, n. 24, p. 9344–9351, 15 dez. 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/ac201867h>>.

ZHANG, Y. et al. **Elevated DDX21 regulates c-Jun activity and rRNA processing in human breast cancers** **Breast cancer research: BCR**, 2014. . Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/MED/25260534>>.

ZHOU, Y.; SANTORO, R.; GRUMMT, I. The Chromatin Remodeling Complex NoRC Targets HDAC1 to the Ribosomal Gene Promoter and Represses RNA Polymerase I Transcription. **The EMBO journal**, v. 21, n. 17, p. 4632–4640, set. 2002.

ZIRWES, R. F. et al. A Novel Helicase-Type Protein in the Nucleolus: Protein NOH61. **Molecular biology of the cell**, v. 11, n. 4, p. 1153–1167, abr. 2000.