

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Fisiologia e Farmacologia

**ANÁLISE PROTEÔMICA COMPARATIVA DE
LINHAGENS CELULARES DE MELANOMA E
MELANÓCITO MURINOS FRENTE AO TRATAMENTO
COM FRAÇÃO PROTEOLÍTICA DERIVADA DO LÁTEX
DE *Vasconcellea cundinamarcensis***

Fernanda de Oliveira Lemos

Belo Horizonte

2014

Fernanda de Oliveira Lemos

**ANÁLISE PROTEÔMICA COMPARATIVA DE
LINHAGENS CELULARES DE MELANOMA E
MELANÓCITO MURINOS FRENTE AO TRATAMENTO
COM FRAÇÃO PROTEOLÍTICA DERIVADA DO LÁTEX
DE *Vasconcellea cundinamarzensis***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Fisiologia e Farmacologia, com ênfase em Farmacologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas

Orientadora: Profa. Dra. Miriam T. Paz Lopes

Co-orientadora: Prof. Dra. Héliida M. de Andrade

Belo Horizonte

2014

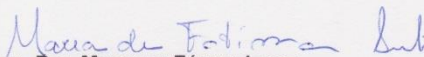
**"ANÁLISE PROTEÔMICA COMPARATIVA DE LINHAGENS
CELULARES DE MELANOMA E MELANÓCITO MURINOS FRENTE
AO TRATAMENTO COM FRAÇÃO PROTEOLÍTICA DERIVADA DO
LÁTEX DE VASCONCELLEA CUNDINAMARCENSIS"**

FERNANDA DE OLIVEIRA LEMOS

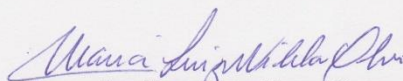
Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia **14 de agosto de 2014**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:



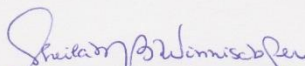
PROFA. DR^a. ELAINE MARIA DE SOUZA FAGUNDES
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



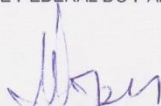
PROFA. DR^a. MARIA DE FÁTIMA LEITE
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



PROFA. DR^a. MARIA LUIZA VILELA OLIVA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO



PROFA. DR^a. SHEILA MARIA BROCHADO WINNISCHOFER
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ



PROFA. DR^a. MIRIAM TERESA PAZ LOPES
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ORIENTADORA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG
Belo Horizonte, 14 de agosto de 2014

COLABORADORES

Prof. Dr. Carlos Edmundo Salas Bravo – Departamento de Bioquímica e Imunologia – Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais;

Profa. Dra. Héliida Monteiro de Andrade – Departamento de Parasitologia – Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

FINANCIADORES

CAPES – custeio da bolsa de doutorado e doutorado-sanduiche MES/CUBA;

FAPEMIG – financiamento do projeto de pesquisa (APQ 02150-11);

CNPq – financiamento de projetos de pesquisa do grupo (563935/2010-3; 303951/2011-7)

Trabalho realizado nos Laboratórios de Substâncias Antitumorais do Departamento de Farmacologia, de Biologia Molecular de Produtos Naturais do Departamento de Bioquímica e Imunologia e de Leishmanioses do Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

“Eu não sou nem especialmente inteligente, nem especialmente dotado. Sou apenas curioso, muito curioso... A coisa importante é não parar de questionar. Nunca perca a sagrada curiosidade. A curiosidade tem suas próprias razões para existir.”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

A Deus por estar sempre me abençoando, dando a graça de conviver com pessoas tão especiais como os meus familiares e amigos.

À Profa. Dra. Miriam Teresa Paz Lopes pela orientação, amizade, dedicação, confiança e, acima de tudo, paciência durante esses 11 anos de convivência.

À Profa. Dra. Héliida Monteiro de Andrade pela colaboração, entusiasmo, ensinamentos e por me fazer sentir “em casa” no seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Carlos Edmundo Salas Bravo pela orientação, colaboração e ensinamentos.

À Dra. Simone da Fonseca Pires pela colaboração, ensinamentos, disponibilidade e envolvimento com o trabalho.

À banca examinadora pela disponibilidade. Com toda certeza os comentários, sugestões e críticas serão de grande valia e só engrandecerão o presente trabalho.

Aos meus pais, José Gaspar e Maria Helena, por toda a dedicação, amor e apoio. Por serem exemplos de doação, garra e superação. Sou muito orgulhosa de tê-los como meus pais! Amo muito vocês!

Aos meus irmãos, Euler e Helder, pela amizade, carinho, companhia, incentivo e, acima de tudo, inspiração.

Ao meu sobrinho Fernando, por me transformar a cada dia, me enchendo de alegria a cada vez que vejo o seu sorriso ou ouço a sua voz!

Ao Alysson pelo apoio, compreensão, amor, amizade e infinita paciência. Muito obrigada por fazer parte da minha vida!

À Sra. Eisdra, Sr. Otacílio e família pelo carinho, apoio e compreensão.

Aos meus familiares, em especial às minhas vovós Gena e Inha. Obrigada pelo apoio e compreensão e me desculpem pelas frequentes ausências.

Aos amigos do LSAT: Ana Cândida, Ariadne, Dalton, Fernanda, Gabriela, Kátia, Lívia, Verlane, Celso, Cinthia, Heveline, Imaculada, Luiz Felipe, Sandra e aos agregados! Muito obrigada pela amizade, pela ajuda e pelos momentos de descontração. Sem dúvida alguma tudo foi mais agradável graças a vocês!

À Luciana os meus eternos agradecimentos. Obrigada pela dedicação, amizade e disponibilidade durante todos esses anos. Você é exemplo de pessoa e de profissional!

Aos colegas dos Laboratórios de Biologia Molecular e Bioquímica de Produtos Naturais, em especial ao Fábio e a Luz, e de Leishmanioses, pela ajuda e alegre convivência. Foi muito prazeroso e proveitoso conviver com vocês.

À equipe Cubana do projeto MES/CUBA, especialmente à Dra. Idania Rodeiro, Dra. Sílvia Lhera, à Janet Piloto e à Janet Morffi.

Aos colegas e professores da Pós-graduação pela disponibilidade, companheirismo e ensinamentos.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia e da Secretaria da Pós-graduação pela ajuda e boa vontade em todos os momentos em que foram solicitados.

Aos meus amigos pelo carinho, atenção e torcida.

Às agências de fomento CNPq, CAPES e FAPEMIG, pelo financiamento do projeto e custeio da minha bolsa de estudos.

RESUMO

Estudos prévios mostraram que a fração proteolítica CMS-2, obtida do látex de *Vasconcellea cundinamarcensis*, diminui significativamente o número de metástases em animais portadores de carcinoma de cólon e melanoma, mostrando, *in vitro*, aumento da fragmentação de DNA e diminuição da adesão e da invasão celulares. Neste trabalho, apresentamos a análise proteômica de lisados celulares de melanoma metastático B16-F10 e melanócito Melan-a, ambos murinos, tratados com CMS-2 (10 µg/mL, 24h), com o intuito de identificar a modulação de proteínas que estejam relacionadas com o desenvolvimento tumoral e/ou metastático. Utilizando eletroforese bidimensional DIGE e espectrometria de massas foi possível identificar 71 *spots* diferentemente expressos entre os controles Melan-a (MC) e B16-F10 (BC). Quando MC e BC são comparados com os seus respectivos grupos tratados, Melan-a (MT) e B16-F10 (BT), observou-se alteração seletiva, em B16-F10, dos níveis de expressão de 21 *spots*. CMS-2 reverteu, a valores comparáveis à MC, 4 proteínas super expressas em BC, Nucleofosmina 1; Proteína de choque térmico 65, Proteína ligante a calciclina e Fator de iniciação da tradução eucariótica 4H, que participam da proliferação, sobrevivência, invasão e da migração celular. A fração CMS-2 promoveu a super expressão de enzimas glicolíticas e antioxidantes, efeito que pode estar relacionado à redução da fosforilação oxidativa, determinada pela metabolização da resazurina, e à indução de melanogênese, marcador de diferenciação, avaliada pelo aumento do conteúdo de melanina/atividade de tirosinase. A redução da expressão de cofilina 1 e de actina β e γ , proteínas envolvidas com a motilidade celular, podem justificar a inibição da migração de B16-F10 e de Melan-a verificada após esse tratamento. A redução, ainda que parcial, de ciclofilina A, proteína precursora de dissulfeto isomerase A3 e calreticulina, chaperonas super expressas em células tumorais, e do inibidor da dissociação de guanosina difosfato 2, que em altos níveis promove a transição epitélio mesenquimal e impede a ativação de caspases, também corrobora os efeitos celulares de CMS-2. Assim, conclui-se que CMS-2 é capaz de reverter a expressão de proteínas relacionadas à progressão tumoral e desenvolvimento de metástases em B16-F10, comparáveis aos padrões de expressão em linhagem normal melanocítica. Tal efeito justifica a atividade antimetastática da fração e auxilia no esclarecimento do(s) seu(s) mecanismo(s) de ação, fundamentando o seu possível uso terapêutico.

Palavras chave: cisteíno proteases, antimetastático, proteoma, melanoma, migração celular, melanogênese

ABSTRACT

Previous studies showed that CMS-2 proteolytic fraction, obtained from the *Vasconcellea cundinamarcensis* latex, significantly reduced the number of metastasis in animals bearing colon carcinoma and melanoma, and *in vitro*, increased DNA fragmentation and decreased adhesion and cell invasion. Here, we present a proteomic analysis of cell lysates from metastatic melanoma B16-F10 and melanocyte Melan-a, both murine, treated with CMS-2 (10 µg/mL, 24 h), in order to identify modulated proteins related to tumor and/or metastatic development. Using the techniques of two-dimensional electrophoresis DIGE and mass spectrometry, it was possible to identify 71 spots differently expressed between controls - Melan-a (MC) and B16-F10 (BC). When MC and BC are compared to their respective treated groups, Melan-a (MT) and B16-F10 (BT), selective effects, on B16-F10, were observed in 21 spots expression levels. CMS-2 statistically reduced the expression of 4 proteins (nucleophosmin 1, heat shock protein 65, calyculin binding protein and eukaryotic translation initiation factor 4H), overexpressed in BC, to similar levels of MC. These proteins are related to the proliferation, survival, migration and cell invasion. The antioxidant and glycolytic enzymes superexpression, after exposure to CMS-2, was observed and may be related to the oxidative phosphorylation reduction, as determined by the resazurin metabolism, and melanogenesis induction (differentiation marker), measured by content of melanin and tyrosinase activity. The decreased expression of actin- β and γ and cofilin 1, proteins involved in cell motility, may explain the reduction of B16-F10 and Melan-a cell migration observed after CMS-2 treatment. The reduction, even partially, of cyclophilin A, protein disulfide isomerase A3 precursor and calreticulin precursor, chaperones superexpressed in tumor cells, and guanosine diphosphate (GDP) dissociation inhibitor 2, which at high levels promote epithelial mesenchymal transition and prevents the activation of caspases, may also justify the cellular effects observed in the presence of CMS-2. In conclusion, CMS-2 can reverse the protein expression, in B16-F10 cells, related to tumor progression and metastasis to normal melanocytic line patterns. This effect justifies the CMS-2 antimetastatic activity and supports in clarifying the mechanism(s) of action.

Key-words: cysteine proteases, antimetastatic, proteoma, melanoma, cell migration, melanogenesis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Imagens de partes da planta <i>Vasconcellea cundinamarcensis</i>	22
Figura 2: Obtenção e caracterização bioquímica de frações proteolíticas do látex de <i>V. cundinamarcensis</i>	71
Figura 3: Avaliação da viabilidade celular após tratamento com CMS-2.	72
Figura 4: Avaliação da integridade da membrana celular após tratamento com CMS-2.	73
Figura 5: Géis Bidimensionais Fluorescentes de lisados de B16-F10 e Melan-a, em strips de 24 cm pH 3 – 11 NL.	77
Figura 6: Diagrama de Venn mostrando as proteínas identificadas em cada comparação dos grupos experimentais.	78
Figura 7: Imagens representativas de géis DIGE com os <i>spots</i> identificados, diferentemente expressos entre os grupos B16-F10 controle <i>versus</i> tratado (A), B16-F10 <i>versus</i> Melan-a controles (B) e B16-F10 tratado <i>versus</i> Melan-a controle (C).	81
Figura 8: Categorização funcional das proteínas identificadas por Espectrometria de Massa a partir de lisado celular de B16-F10 ou Melan-a tratados ou não com a fração CMS-2.	96
Figura 9: Comparação da abundância de expressão das proteínas organizadas nas diferentes categorias funcionais.	98
Figura 10: Quatro proteínas superexpressas em B16-F10 se igualaram aos padrões de expressão de célula normal Melan-a após o tratamento com CMS-2.	99
Figura 11: Rede de interações entre proteínas identificadas que apresentaram abundância diferentemente significativa entre os grupos B16-F10 controle <i>versus</i> Melan-a controle ou B16-F10 tratado, sem diferenças entre os grupos Melan-a controle <i>versus</i> B16-F10 tratado.	101
Figura 12: Sete proteínas apresentaram expressão alterada após o tratamento com CMS-2, independentemente da comparação ser feita com a linhagem normal ou tumoral.	102
Figura 13: Rede de interações entre proteínas identificadas que apresentaram abundância diferentemente significativa entre os grupos B16-F10 tratado <i>versus</i> Melan-a ou B16-F10 controles, sem diferenças entre os grupos Melan-a <i>versus</i> B16-F10 controles.	104

Figura 14: Seis proteínas apresentaram expressão alterada após o tratamento com CMS-2 somente quando comparado à linhagem tumoral.	105
Figura 15: Rede de interações entre proteínas identificadas que apresentaram abundância diferentemente significativa entre os grupos B16-F10 controle e tratado, sem diferenças entre os grupos Melan-a controle <i>versus</i> B16-F10 controle ou tratado.	107
Figura 16: Proteínas diferentemente expressas entre MC e BC e que foram parcialmente moduladas pelo tratamento com CMS-2.	110
Figura 17: Rede de interações entre proteínas identificadas que apresentaram abundância diferentemente significativa entre os grupos Melan-a <i>versus</i> B16-F10 controles, sem diferenças entre os grupos B16-F10 tratado <i>versus</i> Melan-a ou B16-F10 controles.	112
Figura 18: Proteínas expressas em B16-F10 que foram moduladas pelo tratamento com CMS-2.	113
Figura 19: Avaliação da proliferação celular após tratamento com CMS-2.	114
Figura 20: Avaliação da senescência após exposição das linhagens B16-F10 e Melan-a a CMS-2.	116
Figura 21: Efeito de CMS-2 na produção de melanina em melanoma B16-F10 e melanócito Melan-a.	117
Figura 22: Efeito de CMS-2 na atividade de tirosinase em melanoma B16-F10 e melanócito Melan-a.	118
Figura 23: Efeito inibitório da migração <i>in vitro</i> de CMS-2 sobre células B16-F10.	119
Figura 24: Efeito inibitório da migração <i>in vitro</i> de CMS-2 sobre células Melan-a.	120
Figura 25: Efeito inibitório da migração <i>in vitro</i> de CMS-2 sobre células B16-F10 tratadas com Hidroxiureia.	121

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Esquema de marcação com CyDye dos extratos proteicos.	63
Tabela 2: Concentração proteica de lisados celulares de B16-F10 e Melan-a tratados ou não com CMS-2.	74
Tabela 3: Proteínas diferencialmente expressas entre as condições experimentais.	83

LISTA DE ABREVIATURAS

% porcentagem

% (p/v) percentual peso por peso; % (p/v) percentual peso por volume; % (v/v) percentual volume por volume

° C graus Celsius ou centígrados

cm centímetro (10^{-2} m); mm milímetro (10^{-3} m); nm nanômetro (10^{-9} m)

Da Daltons; KDa quilodalton (10^3 Da)

DO densidade ótica

et al. e outros (do latim Et alli)

g grama G força gravitacional ($9,81 \text{ m. s}^{-2}$)

h hora; min minutos

L litro; mL mililitro (10^{-3} L); μ L microlitro (10^{-6} L)

M concentração molar (moles/L); mM concentração milimolar (10^{-3} moles/L); μ M concentração micromolar (10^{-6} moles/L); nM concentração nanomolar (10^{-9} moles/L)

mA miliÂmpere

mg miligrama (10^{-3} g); μ g micrograma (10^{-6} g); ng nanograma (10^{-9} g); kg quilograma (10^3 g).

pH potencial hidrogeniônico

pI ponto isoelétrico

rpm rotações por minuto

V Volts

W Watts

LISTA DE SIGLAS

2D bidimensional

2-DE eletroforese bidimensional, do inglês *bidimensional electrophoresis*

ANOVA análise de variância, do inglês *analysis of variance*

ATCC *American Type Culture Collection*

ATP adenosina trifosfato

ATV Tripsina versene

BAPNA N α -benzoil-dl-arginina-p-nitroanilina

BC grupo B16-F10 controle

BrdU 5-bromo-2-deoxiuridina

BT grupo B16-F10 tratado com CMS-2

CAPES Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CDK quinase dependente de ciclina, do inglês *cyclin-dependent kinases*

CHAPS 3-[(3-Colamidopropil)-dimetilamônio]-1-propanosulfonato

CNPq Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Cox-2 Ciclooxigenase 2

Cy cianina

DIGE eletroforese em gel diferencial, do inglês *Difference gel electrophoresis*

DMBA 2,4-dimetoxibenzaldeído

DMSO dimetilsulfóxido

DNA ácido deoxirribonucléico, do inglês *desoxiribonucleic acid*

DTT ditioneitol

E64 N-[N-(L-3-trans-carboxirano-2-carbonil)-L-leucil]-agmatina

EDTA ácido etilenodiamino tetra-acético, do inglês *ethylenediamine tetraacetic acid*

EGF fator de crescimento epidermal, do inglês *epidermal growth factor*

eIF fator de iniciação da tradução, do inglês *eukaryotic translation initiation factor*

EMT Transição Epitélio Mesenquimal, do inglês *epithelial mesenchymal transition*

EUA Estados Unidos da América

FAPEMIG Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais

FBS soro fetal bovino, do inglês *fetal bovine serum*

FGF fator de crescimento de fibroblasto, do inglês *fibroblast growth factor*

FunCat catálogo funcional, do inglês *Functional Catalogue*

GDNF fator de crescimento neurotrófico derivado da glia, do inglês *glial cell line-derived neurotrophic factor*

GDP guanosina difosfato

GI informação gênica, do inglês *gene information*

GSH glutationa reduzida

GST glutationa S-transferase

HCCA ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico, do inglês *α -cyano-4-hydroxycinnamic acid*

HEPES Ácido N-(2-hidroxietil)-piperazino-N'-etanossulfônico

HIF fatores induzíveis de hipóxia, do inglês *hypoxia-inducible factors*

HSP – proteína de choque térmico, do inglês *heat shock protein*

IAA iodoacetamida

IC50 metade da concentração máxima inibitória

ICB Instituto de Ciências Biológicas

IEF focalização isoeétrica, do inglês *isoelectric focusing*

IL-6 interleucina 6

INCA Instituto Nacional do Câncer

KC/CXCL1-3 quimiocina derivada de queratinócito

LDH lactato desidrogenase

LTCD8 linfócito T, CD8

MAPK quinase ativada por mitógenos, do inglês *mitogen-activated protein kinase*

MC grupo Melan-a controle

MCAM molécula de adesão celular de melanoma, do inglês *melanoma cell adhesion molecule*

MCP-1/CCL2 proteína quimioatraente para monócito

MDM2 *Murine double minute 2*

MIPS *Munich Information Center for Protein Sequences*

MMP metalo proteinase de matriz, do inglês *Matrix metalloproteinase*

MMS Metil-metano-tiosulfonado

MS espectrometria de massas, do inglês *mass spectrometry*

MT grupo Melan-a tratado com CMS-2

MTT sal de tetrazólio, do inglês *metiltiazolil-difenil-tetrazólium bromid*

NADPH nicotinamida adenina fosfato-oxidase

NEDD8 *neural precursor cell-expressed developmentally down-regulated 8*

NFκB fator nuclear κB, do inglês *nuclear factor κB*

NL não linear

PAGE gel de poliacrilamida, do inglês *polyacrylamide gel electrophoresis*

PAR receptor ativado por protease, do inglês *protease-activated receptors*

PBS tampão fosfato-salino, do inglês *phosphate buffered saline*

PCNA antígeno nuclear de proliferação celular, do inglês *proliferating cell nuclear antigen*

PI3K fosfatidil inositol 3 quinase, do inglês *phosphatidylinositol-3 kinase*

PIP3 fosfatidil inositol 3 fosfato, do inglês *phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate*

PKB proteína quinase B, do inglês *protein kinase B*

PKR proteína quinase dependente de RNA, do inglês *RNA-dependent protein kinase*

PLC fosfolipase C, do inglês *phospholipase C*

PMA Forbol 12-miristato-13-acetato, do inglês *phorbol-12-myristate-13-acetate*

PMF impressão digital de massas de peptídeos, do inglês *peptide mass fingerprinting*

Rb retinoblastoma

RNA ácido ribonucléico, do inglês *ribonucleic acid*

ROS espécie reativa de oxigênio, do inglês *reactive oxygen species*

SCF fator de crescimento de células tronco, do inglês *stem cell factor*

SDS Dodecil sulfato de sódio, do inglês *sodium dodecyl sulfate*

TEMED N',N',N',N'-tetrametil-etileno-diamina

TFA Ácido trifluoroacético, do inglês *trifluoroacetic acid*

TGF fator de crescimento transformante, do inglês *transforming growth factor*

TIMP inibidor de metalo protease de matriz

TNF fator de necrose tumoral, do inglês *tumor necrosis factor*

UFMG Universidade Federal de Minas Gerais

VEGF fator de crescimento do endotélio vascular, do inglês *vascular endothelial growth factor*

ZVAD Benziloxycarbonil-Val-Ala-Asp(O-Me) fluorometil cetona

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
1.1 A espécie <i>Vasconcellea cundinamarcensis</i>	21
1.2 Atividades antitumoral e antimetastática de P1G10	23
1.3 Atividade antimetastática da subfração CMS-2 e efeitos biológicos de proteínas purificadas a partir da mesma	26
1.4 Tratamento do câncer	28
1.4.1 Proteases na oncologia	30
1.5 O desenvolvimento tumoral.....	31
1.5.1 Transformação maligna de melanócitos.....	36
1.6 Estudos proteômicos	40
2. JUSTIFICATIVA	43
3. OBJETIVO GERAL	44
3.1 Objetivos específicos	44
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
4.1 Materiais.....	45
4.1.1 Biológicos	45
4.1.2 Equipamentos	45
4.1.3 Diversos	47
4.1.4 Reagentes e solventes.....	49
4.1.5 Kits para análises	50
4.1.6 Softwares	50
4.1.7 Soluções.....	51
4.2 Métodos.....	57
4.2.1 Obtenção da fração CMS-2 e CMS-2 inibida	57
4.2.2 Dosagem protéica	58
4.2.3 Atividade amidásica	58
4.2.4 Eletroforese em gel desnaturante de poliácridamida.....	59
4.2.5 Cultivo celular.....	59
4.2.6 Esterilização das amostras para ensaios biológicos	60
4.2.7 Avaliação da viabilidade celular pelo método de metabolização do sal de resazurina.....	60
4.2.8 Determinação da integridade da membrana celular.....	61
4.2.9 Estudo proteômico	61
4.2.9.1 Obtenção dos lisados celulares.....	61
4.2.9.2 Eletroforese bidimensional (2-DE).....	61

4.2.9.3 Eletroforese em gel diferencial (DIGE, 2-D <i>Fluorescence Difference Gel Electrophoresis</i>)	63
4.2.9.4 Análise <i>in silico</i> dos géis.....	64
4.2.9.5 Espectrometria de massas	65
4.2.9.6 Organização dos dados proteômicos	66
4.2.10 Avaliação da proliferação celular pela medida de incorporação de 5-bromo-2-deoxiuridina (BrdU)	67
4.2.11 Avaliação da senescência pela marcação da enzima β -galactosidase .	67
4.2.12 Dosagem de melanina intracelular	68
4.2.13 Determinação da atividade da enzima tirosinase	68
4.2.14 Avaliação da migração celular, pelo método <i>scratch assay</i>	69
4.2.15 Análise Estatística	69
5. RESULTADOS	70
5.1 Obtenção da fração CMS-2.....	70
5.2 Determinação da Concentração Inibitória (50%) da fração CMS-2.....	71
5.3 Estudo proteômico de lisados celulares extraídos de B16-F10 e Melan-a tratados com a fração CMS-2.....	74
5.4 Efeitos celulares promovidos por CMS-2 em linhagens celulares de melanoma metastático B16-F10 e melanócito Melan-a.	114
6. DISCUSSÃO	122
7. CONCLUSÃO.....	145
8. PERSPECTIVAS.....	145
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	146
ANEXO 1	168
ANEXO 2.....	185
ANEXO 3.....	187
ANEXO 4.....	189
ANEXO 5.....	194

1. INTRODUÇÃO

Nosso grupo vem caracterizando bioquímica e farmacologicamente cisteíno proteases derivadas do látex de *Vasconcellea cundinamarcensis*, sinonímia *Carica candamarcensis* Hook 1835, uma planta típica da costa oeste da América do Sul que, dentre outras propriedades, tais como reparadora tecidual mostrada em lesões cutâneas (Mello et al., 2006; Gomes et al., 2010) e gástricas (Mello et al., 2008; Silva et al., no prelo) e antitrombóticas (Bilheiro et al., 2013), apresenta atividade antitumoral e antimetastática em diferentes modelos murinos (Figueiredo, 2009; Lopes et al 2010; Viana, 2010; Dittz, 2011; Dittz et al, submetido). Detalhes dessas atividades estão apresentados a seguir.

1.1 A espécie *Vasconcellea cundinamarcensis*

A planta *Vasconcellea cundinamarcensis* (sinônimo *Carica candamarcensis*. Hook 1835 - *voucher* na Universidade de La Serena, Chile, # 15063) é natural da região Andina e pertencente à família Caricaceae. Essa planta apresenta um tronco grosso geralmente ramificado, mede até 5 m de altura e contém uma coroa compacta de folhas na sua parte terminal ou nas extremidades das ramificações. Seu fruto é elipsóide, amarelo quando maduro, sendo que a polpa é delgada, aquosa e aromática, comestível somente após o cozimento (Figura 1). Os canais lactíferos desse vegetal estão presentes na região cortical do tronco, nas folhas e mais abundantemente nas camadas mais externas do endocarpo, principalmente dos frutos imaturos (Leon, 1987). O látex extraído se apresenta rico em carboidratos, vitaminas, sais minerais e peptídeos de baixo peso molecular, além de cisteíno proteinases de alta atividade proteolítica (Baeza, Correa & Salas, 1990; Loguercio, Bravo & Salas, 1990; Bravo, Hermosilla & Salas, 1994).

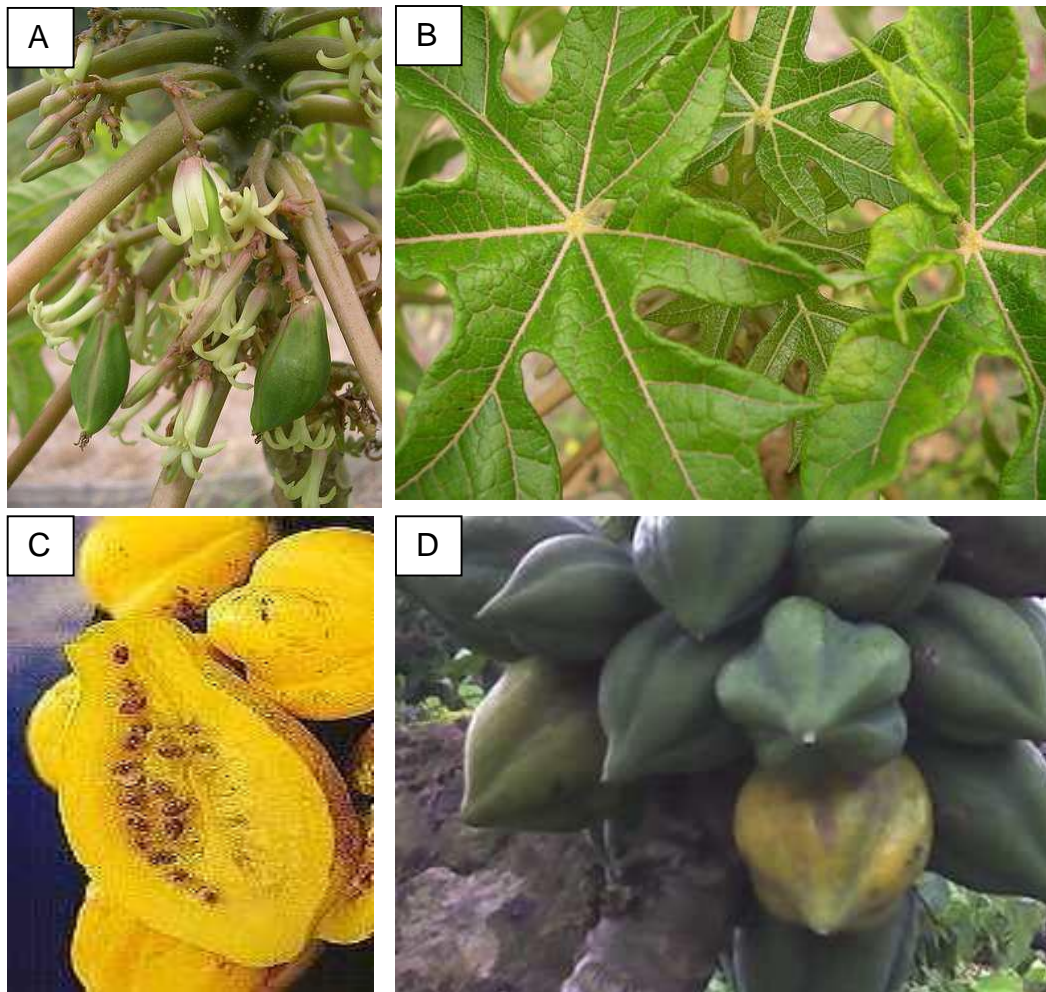


Figura 1: Imagens de partes da planta *Vasconcellea cundinamarcensis*. A- Inflorescências; B- Folhas; C- Fruto maduro e -D Frutos imaturos. In: Ecocrop e Flickr

Através de filtração cromatográfica do látex em coluna Sephadex G10, obtém-se 2 picos proteicos bem definidos, denominados P1G10 e P2G10, sendo o primeiro rico em cisteíno proteases de alta atividade proteolítica (Silva et al, 2003). Até o momento, estudos com a fração P1G10 demonstraram interessantes atividades farmacológicas, tais atividade cicatrizante sobre dermoabrasões (Mello et al, 2006; Lemos et al, 2011), queimaduras (Gomes et al, 2010), feridas excisionais e lesões provocadas por exposição à radiação UVB (Freitas, 2011), além de atividade citoprotetora/cicatrizante gástrica em ratos (Mello et al, 2006, 2008 e Silva et al, no prelo). Também foi observado que a fração P1G10 apresenta atividade antitrombótica, efeito este acompanhado da redução de ativação de plaquetas, aumento de pró-trombina, trombina e tempo

de tromboplastina ativada parcial, concomitante com níveis fibrinogénolíticos e fibrinolíticos (Bilheiro et al, 2013). Além disso, constatamos que essa fração possui baixa toxicidade aguda, não altera a atividade das P450, não apresenta efeito mutagénico, medido pelo teste Ames e teste de micronúcleo, em concentrações que garantem sua aplicação terapêutica com margem de segurança por diferentes vias de administração (Villalba et al., 2010). O estudo farmacocinético da fração P1G10 mostrou que esta amostra apresenta baixas taxas de permeação cutânea (Lemos et al., 2011), biodisponibilidade por via oral e subcutânea de aproximadamente 10 e 100%, respectivamente, rápida distribuição e eliminação, compatível com modelo bicompartimental (Lemos, 2009).

Devido aos resultados já obtidos, indicando a fração P1G10 como um promissor agente para o reparo tecidual, estudos clínicos de Fase I e um estudo inicial de Fase II também foram desenvolvidos. O estudo de Fase I, realizado em indivíduos hígidos (n=25) com o objetivo de verificar a segurança e a inocuidade da fração, mostrou ausência de evidências clínicas e laboratoriais de toxicidade de P1G10 a 0,1% (p/p). Resultados preliminares de ensaio clínico de fase II (n=10), com o objetivo de avaliar a taxa de cicatrização em voluntários portadores de úlceras de pressão e venosas, mostraram que P1G10 0,1% reduziu os valores de comprimento, largura e profundidade das feridas (Gomes, 2009). Atualmente, está em andamento um estudo em indivíduos diabéticos portadores de feridas não infectadas, com número amostral adequado para Fase II.

1.2 Atividades antitumoral e antimetastática de P1G10

Paralelamente às atividades descritas acima, o nosso grupo de pesquisa observou que P1G10 apresenta atividade antitumoral e antimetastática em diferentes modelos tumorais. Viana (2010), utilizando células de carcinoma de Ehrlich, verificou que a fração P1G10 (3 mg/kg via subcutânea – s.c.) promoveu uma redução significativa do volume e da massa tumoral no modelo sólido, além de diminuir a celularidade presente no modelo ascítico (5 mg/kg s.c.). Acredita-se que a atividade antitumoral de P1G10 se deve ao efeito desta como moduladora do sistema imune celular, como já verificado para outras cisteíno

proteases de origem vegetal, como por exemplo a bromelina (Chobotova et al., 2010). Essa hipótese foi formulada pela observação de que P1G10 aumentou os níveis de leucócitos circulantes e reduziu o número de células da medula óssea nos animais portadores de tumor ascítico de Ehrlich, especialmente neutrófilos, modulou os níveis das citocinas VEGF (fator de crescimento endotelial vascular), TNF- α (Fator de necrose tumoral) e TGF- β (Fator de crescimento transformante) presentes no líquido ascítico e promoveu a proliferação de linfócitos esplênicos. Além disso, o tratamento prévio dos animais com 3,0 e 5,0 mg/kg de P1G10 subcutâneo (s.c.) reduziu em 25% a celularidade presente no líquido ascítico de animais inoculados com células de carcinoma de Ehrlich (Viana, 2010).

Braga (2013), utilizando o modelo de carcinoma de mama murino 4T1 (tumor inflamatório), observou que P1G10 (1, 3 e 5 mg/kg s.c.) reduz a massa tumoral e promove aumento do número de leucócitos circulantes, especialmente neutrófilos e monócitos, corroborando os resultados de Viana (2010). No entanto, P1G10 (1 mg/kg s.c.) reduz a taxa de adesão de leucócitos à parede de vasos tumorais, sem interferir na capacidade de rolamento destas células. Além disso, o tratamento com P1G10 reduziu os níveis intratumorais de citocinas pró-inflamatórias/angiogênicas, como a proteína quimioatraente para monócito (MCP-1/CCL2), Interleucina 6 (IL-6), VEGF e quimiocina derivada de queratinócito (KC/CXCL1-3), e aumentou os níveis da atividade da enzima N-acetil- β -D-glicosaminidase (dosagem indireta de macrófagos ativados). Em ensaios *in vitro*, observou-se que o pré-tratamento de macrófagos peritoneais com P1G10 (5 – 50 μ g/mL) reduziu a produção de VEGF em cultura primária e na co-cultura com a linhagem 4T1, enquanto que foi observado um aumento da produção de TNF- α , uma citocina com atividade antitumoral. Esse último resultado pode explicar a observação de redução do número de células tumorais em co-culturas com macrófagos pré-tratados com P1G10 (Braga, 2013).

Também em modelo murino de melanoma não metastático (B16-F1) foi observado que a fração P1G10 (5 mg/kg s.c.) promove uma redução significativa da massa do tumor (88,6% de redução em relação ao controle). Essa redução tumoral é acompanhada por um aumento significativo do tempo de sobrevivência dos animais, tempo esse equivalente ao tratamento com o citotóxico 5-fluorouracila. No entanto, o efeito antitumoral dessa fração proteica é

parcialmente dependente da atividade proteolítica da fração, visto que P1G10 com o sítio catalítico inibido pela ligação com Iodoacetamida (IAA) foi capaz de reduzir, mas sem comprovação estatística, o tamanho dos tumores dos animais. Além disso, verificou-se que P1G10 possui atividade anti-angiogênica, uma vez que os níveis hemoglobina (marcador indireto de angiogênese) e VEGF se encontraram estatisticamente reduzidos nos tumores do grupo tratado com 5 mg/kg s.c., em relação ao controle negativo (Dittz et al., submetido).

Já em modelo de melanoma metastático, verificou-se que P1G10 (5 mg/kg s.c.) reduz o número de pontos metastáticos e as suas ocorrências em pulmões de animais inoculados com a linhagem B16-F10. Como consequência da redução de metástases, observou-se que P1G10 aumenta significativamente o tempo de sobrevivência dos animais (Figueiredo, 2009). P1G10, nas doses de 1 e 5 mg/kg (s.c.), também foi capaz de reduzir o número de pontos de metástases em baço de animais inoculados com a linhagem de carcinoma de cólon murino CT26.WT (Dittz, 2011).

Posteriormente, foram realizadas diversas avaliações *in vitro* de eventos celulares que podem justificar as atividades antitumorais e antimetastáticas de P1G10. Inicialmente, verificou-se que P1G10 promove a fragmentação do DNA nas linhagens B16-F10 e CT26.WT já nos primeiros 30 min de exposição à concentração de 100,0 µg/mL. Comprovou-se, ainda, que a fragmentação celular promovida por P1G10 é dependente da sua atividade proteolítica, bem como da ativação de caspases, visto que o tratamento com esta fração ligada à IAA ou a pré-incubação das células com o inibidor de caspases ZVAD (Benziloxycarbonil-Val-Ala-Asp(O-Me) fluorometil cetona) igualaram a taxa de DNA subdiploide aos níveis do controle (Dittz, 2011).

A adesão e a invasão celular, importantes eventos relacionados com o crescimento tumoral e desenvolvimento de metástases, também foram avaliadas em células de B16-F10 e CT26.WT expostas a P1G10. Observou-se que essa fração proteolítica, nas concentrações de 10,0 e 100,0 µg/mL, diminui a adesão celular a todos os substratos avaliados (Colágeno I e IV, Fibronectina, Laminina e Vitronectina), além de reduzir a invasão celular (Dittz, 2011).

1.3 Atividade antimetastática da subfração CMS-2 e efeitos biológicos de proteínas purificadas a partir da mesma

Apesar dos evidentes efeitos antitumoral e antimetastático de P1G10, não é possível atribuir essas ações a um grupo ou a apenas uma enzima presente na fração. Sabemos que quando submetida à coluna CM-Sephadex C-25, P1G10 dá origem a dois picos protéicos principais (CMS-1 e CMS-2), tendo o primeiro uma atividade proteolítica 2,5 vezes maior que o segundo (Teixeira et al, 2008). Essas subfrações também foram avaliadas quanto à sua atividade antimetastática, cujos resultados demonstraram que apenas a fração CMS-2 (5 mg/kg s.c.) reduziu o número de metástases no fígado e no pulmão de animais portadores de carcinoma de cólon e melanoma, respectivamente, da mesma forma que o observado para P1G10. Além disso, verificou-se que a subfração CMS-2 na concentração de 100,0 µg/mL, mas não a CMS-1, aumenta o conteúdo de DNA fragmentado em B16-F10 e CT26.WT (Dittz, 2011).

Quando submetida a cromatografia em coluna de troca catiônica Mono-S Sepharose, é possível recolher 5 proteases purificadas a partir de CMS-2 (CMS2MS1-5). As massas moleculares dessas proteínas se encontram na faixa de 23 kDa e a atividade amidásica específica varia de 4,7 a 8,5 nM/min/µg (Teixeira et al, 2008). Dentre essas proteínas, CMS2MS3 se mostrou a mais citotóxica em linhagem B16-F10 (IC₅₀ de 8,9 µg/mL), sendo que o tratamento também foi capaz de reduzir significativamente os níveis de expressão das subunidades de integrinas α5 e β1 e de pontos de adesão focal, o que culminou em perda de adesão já a partir de 2h de exposição. Além disso, observou-se que CMS2MS3 aumenta os níveis de Bax e das caspases 3 e 9 ativadas, o que pode explicar o aumento de DNA fragmentado em B16-F10 (Dittz, resultados não publicados).

Em contraposição aos resultados de citotoxicidade observados com CMS-2 e proteases purificadas a partir desta fração, o nosso grupo de pesquisa descreveu que CMS2MS2 e CMS2MS3 apresentam atividade mitogênica sobre fibroblastos e outras linhagens celulares (Gomes et al., 2005) em concentrações até 1.000 vezes menores dos que as citotóxicas. Além disso, foi verificado que a exposição de cultura primária de osteoblastos indiferenciados à subfração CMS-2 ou à proteína CMS2MS2, em concentrações da ordem de ng/mL, resultou

em proliferação e posterior diferenciação celular, sendo este último efeito observado pelo aumento significativo de atividade fosfatase alcalina e deposição de cristais de cálcio, indicadores de diferenciação (Santos, 2014). Há indícios que essas proteases possam estimular a produção e a secreção de fatores de crescimento, visto que foi verificado que em lesões gástricas tratadas com CMS-2, os níveis de transcritos de EGF, FGF e VEGF estão aumentados (Silva, dados não publicados).

A proliferação celular estimulada por CMS2MS2 é mediada via MAP quinases, evidenciado pelo aumento da fosforilação de ERK-1/2, semelhante ao observado com outras substâncias mitogênicas. Entretanto, a atividade proliferativa em fibroblastos é independente da atividade proteolítica, o que foi demonstrado com CMS2MS2 inibida com E64 ou iodoacetamida (Gomes et al., 2005, 2009). Esse resultado sugere que CMS2MS2 não exerce o efeito proliferativo através da ativação dos receptores PAR, ao menos da maneira, até então, descrita (Ossovskaya & Bunnnett, 2004). Foi demonstrado, também, que o efeito mitogênico envolve fosfolipase C (PLC), já que o inibidor desta enzima, U73122 bloqueia a ativação de PLC induzida por CMS2MS2 (Gomes et al., 2009).

Esses dados em conjunto indicam que as mencionadas frações, contendo cisteíno proteases, interferem nas vias de sinalização relacionadas a vários processos biológicos em células de mamíferos, culminando com a possibilidade de ações terapêuticas, dependentes da via de administração e da concentração/dose aplicada. Mais especificamente sobre a atividade antimetastática, proteínas presentes em CMS-2 mostraram efeitos além dos citotóxicos, como os de modulação da apoptose, da adesão e do processo inflamatório tumoral. Esses efeitos podem ter interessante utilidade no tratamento do câncer, pois as metástases são as maiores causas de morte e falhas do tratamento, apesar do conhecimento existente acerca do mecanismo de colonização tumoral de áreas distantes (Goodson & Grossman , 2009).

1.4 Tratamento do câncer

Atualmente, dispomos de recursos para o tratamento do câncer primário como a cirurgia, radioterapia, quimioterapia, hormonioterapia e imunoterapia, que podem ser usados de forma isolada ou combinada. No entanto, contra o estabelecimento ou a prevenção da metástase há uma carência absoluta de métodos terapêuticos.

O procedimento cirúrgico é o tratamento considerado curativo para tumores sólidos e está indicado no tratamento das metástases sistêmicas quando estas forem únicas ou confinadas a um único sítio metastático e tecnicamente passíveis de ressecção (Wagner et al., 2000; Garbe, 2005). Essa abordagem é feita em duas etapas: a biópsia para estabelecer o diagnóstico, avaliar a espessura e características histopatológicas e, posteriormente, para lesões confirmadas de neoplasias, o processo cirúrgico requer a excisão mais extensa possível, com amplas margens de segurança (Wainstein & Belfort, 2004; Katz et al, 2005; Kitano et al, 2006).

A radioterapia utiliza a radiação ionizante, que gera injúrias no material genético levando à destruição das células tumorais e impedindo a divisão celular. Porém, seus efeitos não são seletivos para as células tumorais, promovendo os efeitos colaterais como anovulação ou azoospermia, epitelites, mucosites e mielodepressão (leucopenia e plaquetopenia) (INCA, 2010). Quanto à imunoterapia, várias abordagens vêm sendo desenvolvidas, tais como a utilização de estímulos das próprias defesas do corpo como o Interferon α , Interleucina-2, ou ainda a transferência de linfócitos T citotóxicos (LTCD8) que podem ser usados para reduzir células tumorais residuais e o risco de recorrência e metástase. Apesar de promissora, a imunoterapia é ainda uma técnica antineoplásica co-adjuvante, usada especialmente para destruir as células cancerosas residuais, após intervenção cirúrgica ou outro tratamento (Kruger et al, 2007; Banchemreau, 2008).

A quimioterapia antineoplásica é utilizada para atuar sobre células do tumor primário, assim como na metástase estabelecida, interferindo no processo de proliferação celular. No entanto, não possui especificidade, não destruindo seletiva ou exclusivamente células tumorais, o que leva aos efeitos colaterais muitas vezes graves que incluem: toxicidade hematológica, com depressão da

medula óssea, toxicidade gastrointestinal e toxicidades cardíaca, hepática, pulmonar, neurológica, vesical/renal, dermatológica e alterações metabólicas, reações alérgicas e anafilaxia (Araújo et al, 2006). Dentre os fármacos utilizados, têm-se os agentes citotóxicos (alquilantes, antimetabólitos e antibióticos) que atuam de forma a interromper a divisão celular e desencadear o processo de apoptose (Kasibhatla et al, 2004). A grande maioria exerce sua ação sobre as células que se encontram em uma das fases do ciclo celular, e são denominados fármacos ciclo-celular específicos como, por exemplo, o metotrexato (fase S), o estoposídeo (fase G2) e a vincristina (fase M). Um segundo grupo de agentes, denominados fármacos ciclo-celular não específicos, tem a capacidade de eliminar as células tumorais independentemente de estarem atravessando o ciclo ou de estarem em repouso no compartimento G0, como a cisplatina e as mostardas nitrogenadas, que são agentes alquilantes do DNA (Almeida et al, 2005).

Ainda, como alternativa de tratamento, os hormônios/anti-hormônios utilizados quando o tumor é derivado de tecido sensíveis a algum hormônio e dele dependem para o crescimento e sobrevivência como são os tumores de mama, para o qual se pode utilizar o tamoxifeno, um inibidor competitivo de receptores para estrógeno (Schroth et al, 2007), e o tumor de próstata, o qual responde ao bloqueio androgênico pela flutamida (Brodgen & Chrisp, 1991). Agentes antiangiogênicos como o bevacizumab (anticorpo monoclonal anti-VEGF) ou o sorafenid (inibidor de quinases que atua inibindo crescimento e ativando apoptose de células endoteliais e alguns tipos de tumorais) também vêm sendo utilizados por aumentarem o tempo de sobrevivência do paciente (Sessa et al, 2008).

No entanto, esse arsenal terapêutico disponível para o tratamento do câncer por vezes traz resultados insatisfatórios, especialmente nos casos avançados da doença. Em virtude dessa observação, a busca de novos fármacos alternativos ou complementares é necessária.

1.4.1 Proteases na oncologia

Há algum tempo, estudos pré-clínicos e clínicos sobre a utilização de enzimas proteolíticas na Oncologia, como as serino proteases tripsina e quimiotripsina, e cisteíno proteases como bromelaína e papaína, ou combinação destas, têm sido realizados e comprovados a sua importância como fármaco principal ou adjuvante. Wald e colaboradores (1998) mostraram que a mistura comercial Wobe-Mugos E, formada pela mistura de papaína, tripsina e quimiotripsina, foi capaz de reduzir a disseminação metastática e aumentar a sobrevivência de animais inoculados com carcinoma de Lewis. Esse mesmo resultado foi obtido em modelo de melanoma B16, onde os autores observaram que a mistura de proteases reduz o desenvolvimento do tumor primário e a ocorrência de metástase pulmonar (Wald et al., 2001). Quanto à bromelina, cisteíno protease extraída do abacaxi (*Ananas comosus*), esta também apresentou efeito antitumoral em vários modelos *in vivo*, utilizando linhagens de leucemia P-388, sarcoma S-37, carcinoma ascítico de Ehrlich e de pulmão Lewis e adenocarcinoma mamário ADC-755, exceto em melanoma MB-F10 (Báez et al., 2007). Já Guimarães-Ferreira e colaboradores (2007) mostraram que tanto a bromelina, quanto a cisteíno protease fastuosaína, extraída de *Bromelia fastuosa*, possuem efeito antimetastático em modelo de melanoma murino B16-F10-Nex2, onde foram observados redução do número de pontos de metástases pulmonares.

As proteases exógenas demonstraram ter eficácia clínica atuando como supressores tumorigênicos, reduzindo disseminação metastática, aumentando o tempo de sobrevivência e de remissão, aliviando os efeitos adversos gerados pelo tratamento convencional e melhorando a qualidade de vida dos pacientes (Gerard, 1974; Leipner & Saller, 2000; Beuth et al., 2001; Dale et al., 2001; Gujral et al., 2001; Popiela et al., 2001; Sakalová et al., 2001; Chan et al., 2014). Apesar dos inúmeros estudos sobre as formas de atuação dessas proteases no câncer, os seus mecanismos de ação não estão completamente elucidados. Uma possível via é a ativação de inibidores de proteases, como as α -macroglobulinas, que por sua vez inativam proteases endógenas e citocinas, por exemplo fator de crescimento transformante beta - TGF- β , que participam do processo de metástases (Desser et al, 2001; Sloane et al, 1990; Lauer et al.,

2001). Outros possíveis mecanismos de ação são através da modulação da expressão de várias moléculas de adesão (Guimarães-Ferreira et al, 2007) e das proteínas supressoras tumorais, bem como redução na expressão de Cox-2 e inibição da via regulada por MAPK (Kalra et al., 2008; Bhui et al, 2009).

Assim, pelo limitado conhecimento sobre os mecanismos de ação de novos agentes antitumorais/antimetastáticos que são comprovadamente eficazes, como as proteases exógenas, se faz necessário aprofundar os estudos sobre os mesmos. Uma vez que, não apenas a citotoxicidade é o mecanismo de ação das proteases exógenas, os eventos que fazem parte do desenvolvimento tumoral devem ser considerados para identificar os seus possíveis alvos/mecanismos de ação. Dessa forma, a seguir, serão descritos sucintamente tais eventos.

1.5 O desenvolvimento tumoral

O câncer é uma desordem hiperproliferativa caracterizada por transformação da morfologia e das funções celulares, levando à perda do controle da proliferação e aquisição de capacidade de invasão e formação de focos metastáticos (Alonso et al, 2004; Hanahan & Weinberg, 2011). A iniciação e a progressão dessa doença são processos relacionados a múltiplas etapas, originados por progressivas alterações gênicas. As alterações genéticas herdadas ou induzidas e promovidas por agentes carcinógenos se mantêm e são transmitidas da célula alterada às suas células filhas. Essas alterações se constituem de eventos como a inativação de genes supressores tumorais (p.e.: p53 ou Rb) ou ativação de proto-oncogenes (p.e.: Ras ou Myc) que afetam o mecanismo de controle da divisão celular (Mazzone & Comoglio, 2006). Microscopicamente, as células tumorais apresentam algumas características que as distinguem das normais como: alta proporção do núcleo em relação ao citoplasma, nucléolo proeminente, mitocôndria com menor funcionalidade, alterações no citoesqueleto e poucas estruturas especializadas (Alonso et al, 2004).

Em células normais, o estímulo para a proliferação celular começa com a liberação de fatores de crescimento, os quais se ligam aos receptores na

membrana das células e desencadeiam a liberação de fatores de transcrição, impulsionando a célula pelo ciclo celular. As células que irão se replicar se movem da fase G0 (célula em repouso) para a fase G1, onde se inicia a síntese de RNA e proteínas. Para as células normais, o equilíbrio entre sinais proliferativos e de inibição da proliferação em G1, irá determinar se o ciclo vai progredir para a fase S, onde se inicia a replicação ou síntese de DNA, que resulta na duplicação do conteúdo do mesmo. A fase S é seguida por G2, onde as células se preparam para entrar em mitose (M) e se dividir em duas células idênticas (Foster, 2008).

A progressão pelo ciclo celular é regulada, em parte, por uma série de proteínas como as ciclinas e as quinases dependentes de ciclinas (CDK). Essas últimas, estão expressas constitutivamente nas células, e precisam estar ligadas às ciclinas para se tornarem ativas. Já as ciclinas são sintetizadas e degradadas em cada fase do ciclo celular, de modo que o complexo ciclina-CDK se torne específico para cada uma das fases (Collins & Garrett, 2005). No início do ciclo celular, a ação dos fatores de crescimento promove um aumento dos níveis da ciclina D, que se ligam as CDKs 4 e 6, no início da fase G1. A ciclina E se liga à CDK 2, promovendo a passagem da fase G1 para a fase S. Na fase S, a ciclina A se liga à CDK2, e na transição para G2, se liga à CDK1. No final da fase G2, a ciclina B faz ligação com a CDK1 e continua até a entrada da célula em mitose. Assim, os complexos ciclinas-CDKs controlam o ciclo celular por meio da regulação dos chamados pontos de checagem (*checkpoint*). A ação das ciclinas/CDKs é modulada por proteínas que se ligam a estas e inibem sua ação, por exemplo, p53. Se houver algum tipo de lesão no DNA, essas proteínas interrompem o ciclo celular nos pontos de controle, permitindo, então, o seu reparo. Caso o reparo falhe, inicia-se o processo de apoptose, que por sua vez envolve várias proteínas, tais como Bax, pró-caspases e caspases. Assim, nas células tumorais ocorre perda do controle do ciclo celular em consequência de anormalidade na função dos fatores de crescimento, e/ou função anormal da ciclina/CDK, e/ou síntese anormal de DNA em decorrência da atividade de oncogenes, e/ou diminuição anormal das forças moduladoras anti-proliferativas, devido à ocorrência de mutações dos genes supressores tumorais (Lundberg et al, 1999; Guimarães & Linden, 2004).

A iniciação e a progressão tumoral requerem a seleção de células agressivas e resistentes para sustentar a proliferação celular exacerbada e sobrevivência. Assim, a grande pressão seletiva dentro do microambiente tumoral seleciona clones que possam gerar ATP rapidamente, às custas de eficiência, e também prover os nutrientes necessários para a rápida divisão celular (Thorne & Campbell, 2014). A glicose é inicialmente utilizada como substrato para a glicólise e os seus metabólitos são, sob condições aeróbicas normais, substratos para o ciclo do ácido cítrico e para a fosforilação oxidativa. No entanto, a maioria das células tumorais apresentam visíveis alterações no metabolismo da glicose. Comparada com a célula normal, as tumorais exibem um aumento drástico na captação de glicose e taxas de glicólise, mesmo na presença de oxigênio, a chamada glicólise aeróbica ou efeito Warburg (Lu et al., 2014). Apesar do desperdício de glicose, a glicólise aeróbica possui benefícios significativos para as células tumorais. Através desse metabolismo há a produção mais rápida de ATP, quando comparado à rota da fosforilação oxidativa, além de gerar precursores cruciais para a produção de biomassa, tal como a nicotinamida-adenina-dinucleótido (NADPH), que é produzida em baixos níveis na fosforilação oxidativa (Thorne & Campbell, 2014). Além disso, viu-se que o efeito Warburg traz benefícios para as células tumorais relacionados à sobrevivência, tais como evitar a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), por diminuir a disponibilidade de piruvato para a fosforilação oxidativa e por aumentar a produção de NADPH (cofator essencial para a formação do agente antioxidante mais importante nas células, a Glutathiona reduzida (GSH)) (Lu et al., 2014) e fornecer um microambiente mais ácido, um mecanismo de defesa para o crescimento tumoral (Wu & Zhao, 2013).

Uma vez que as células tumorais perdem o controle da divisão celular, essas vão se multiplicando e formam uma massa tumoral. A ideia em vigor é de que o tumor seja constituído não só por células transformadas, mas também por outras do hospedeiro como as células endoteliais, musculares lisas, fibroblastos e as células imunes, que interagem entre si. Essa formação denominada de microambiente tumoral é determinante para o processo de progressão do tumor (Hanahan & Weinberg, 2011).

Com a expansão do tumor, ocorre o aumento da distância de difusão do oxigênio e de nutrientes para determinadas áreas do mesmo. Essa condição de hipóxia (diminuição dos níveis de oxigênio tecidual) ativa o fator heterodimérico induzível pela hipóxia (HIF) que induz a transcrição de genes, os quais, conjuntamente com outras proteínas como a angiopoetina-2, estimulam a formação de novos vasos, os quais migram para a massa tumoral. Esse processo é denominado angiogênese e garante o estabelecimento dos níveis de oxigênio e a homeostase nutricional do tumor (Brahimi & Pouyssegur, 2006).

Associado aos eventos angiogênicos, outros de degradação e remodelamento da matriz extracelular, composta por proteínas como colágeno, laminina, vitronectina e fibronectina, ocorrem para que o tumor e a rede vascular continuem se desenvolvendo, resultando na invasão de tecidos adjacentes pelas células tumorais. Esses processos ocorrem através da ação das proteases endógenas, produzidas tanto pelas células do estroma quanto pelas células tumorais. Existe uma grande variedade dessas enzimas, como as metalo, aspático, cisteíno e serino proteases (Deryugina & Quigley, 2006; Minarowska et al, 2008), as quais são ativadas em pH ácido (entre 3,5 e 5,5) e, portanto, suas atividades estão aumentadas em ambientes de hipóxia, como o tumoral (Nagse & Woesser, 1999). Cada tipo tumoral apresenta características próprias de degradação proteolítica, como, por exemplo, a perda do colágeno VII no melanoma (Kirkham et al, 1989), câncer de mama (Wetzels et al, 1991) e no câncer de próstata (Nagle et al, 1995), enquanto no tumor de cólon, a degradação da laminina é a mais comum (Pyke et al, 1994).

O fenômeno da metástase, disseminação do tumor primário para outros sítios, é dinâmico, onde interações complexas ocorrem entre as células do tumor e do hospedeiro. Em primeiro lugar, grupos ou células individuais do tumor devem se destacar do tumor primário, um processo conhecido como dissociação. Em seguida, as células tumorais infiltram-se ativamente no estroma e entram na vasculatura ou sistema linfático (intravasamento), que irá transportá-las para locais distantes, onde elas se prenderão a pequenos vasos. Em seguida, as células tumorais deixam ativamente a vasculatura (extravasamento) e invadem o órgão alvo, sendo consideradas de elevado potencial metastático as que concluem este processo. Fatores como a vigilância imunológica, parada do

ciclo celular e estímulos proliferativos do microambiente determinarão se essas células irão morrer, permanecer em silêncio ou formar uma massa de tumor clinicamente aparente (Mc Gary et al, 2002).

As etapas que compreendem o processo de invasão, migração e colonização de outros sítios pelas células tumorais, têm a participação de um grupo de moléculas da superfície celular, as moléculas de adesão, as quais também desempenham papéis importantes em outros processos biológicos, incluindo organogênese, homeostase do tecido, cicatrização de feridas e respostas imunes/inflamatórias (Koukoulis et al, 1998). Essas moléculas incluem as caderinas, as integrinas, as selectinas e a superfamília de imunoglobulinas, que têm estruturas semelhantes e estão implicadas em desempenhar papéis fundamentais em etapas únicas ou múltiplas da cascata metastática (Chothia & Jones, 1997). Portanto, as alterações determinantes da expressão destas moléculas durante a progressão do tumor e da metástase podem ajudar a definir futuras metas terapêuticas. Moléculas de adesão podem se ligar a outras da mesma classe (interação homofílica), ou de classe distinta (interação heterofílica) ou a ambos. As caderinas e as imunoglobulinas medeiam a adesão entre célula-célula, desempenhando um papel no extravasamento por dar suporte à sobrevivência dessas na vasculatura. As adesões das células tumorais aos vasos sanguíneos são, em grande parte, mediadas pelas selectinas, participando de maneira notável no processo de extravasamento. As integrinas são as moléculas responsáveis pelas interações entre as células e os diferentes componentes da matriz extracelular, desempenhando importante papel durante o estabelecimento da massa tumoral no sítio primário e/ou secundário (Mc Gary et al, 2002). A relação entre a quantidade e a funcionalidade das moléculas de adesão em diferentes tipos de células tumorais tem influência no grau de malignidade desse tumor, como ocorre em células de melanoma onde a molécula de adesão celular de melanoma (MCAM) CD 146 confere potencial metastático e aumenta a tumorigenicidade celular (Mc Gary et al, 2002) e, no carcinoma de cólon, onde a expressão de integrinas, em especial aquelas que contêm as cadeias $\alpha 2$, $\alpha 5$, αV e $\beta 1$, está relacionada com o grau de malignidade e metástase desse tumor (Szajda et al, 2008).

Vale ressaltar que várias das informações acerca do desenvolvimento tumoral e de metástases foram observadas e/ou confirmadas utilizando modelos *in vitro* ou *in vivo* (Zhu & Gooderham, 2002). Dentre esses modelos, um dos mais utilizados é o melanoma murino, neoplasia altamente maligna, que tem origem no melanoblasto da pele e apresenta boa similaridade com a neoplasia humana (Van Dyke & Jacks, 2002). Especificamente, células de melanoma murino B16-F10 constituem uma ferramenta experimental muito utilizada para o estudo, tanto do desenvolvimento tumoral quanto metastático, além de auxiliar na descoberta de novos fármacos e procedimentos terapêuticos (Peter et al., 2001; Zhao et al., 2001; Nakamura et al., 2002). Assim, considerando a atividade antimetastática da fração CMS-2 em modelo de melanoma murino B16-F10, linhagem celular tumoral utilizada no presente trabalho, a seguir, tem-se uma breve explanação sobre a transformação celular destas células.

1.5.1 Transformação maligna de melanócitos

Os melanócitos são células especializadas encontradas predominantemente na derme, folículos pilosos e nos olhos, onde exercem uma série de funções, incluindo a produção de melanina e de outros fatores, como citocinas, que agem sobre as células periféricas adjacentes (Kim et al., 2012). Essa linhagem deriva de uma população celular embrionária multi-potente e altamente invasiva, denominada células da crista neural. Os melanócitos utilizam processos celulares, que estão comumente associados à metástase, como a EMT (transição de fenótipo epitelial para mesenquimal) e a invasão celular, para se estabelecer no tecido dérmico e se diferenciar. Essa observação conduziu ao postulado de que os melanócitos transformados podem ter predisposição inerente para invasão e metástase (Bailey et al., 2012).

Na camada epidérmica humana saudável, a comunicação entre melanócitos e queratinócitos é de fundamental importância. Por meio de prolongamentos dendríticos, os melanócitos interagem com queratinócitos que se encontram na camada basal e superficial da pele (Seiberg, 2001). Cada melanócito transfere melanosomas contendo pigmentos por estes prolongamentos para aproximadamente 36 queratinócitos basais e suprabasais. Uma vez nos queratinócitos, o pigmento protege a pele da absorção de radiação

solar nociva. Assim, os queratinócitos são considerados parceiros celulares dominantes dos melanócitos na epiderme e são capazes de controlar a proliferação, grau de prolongamento dendrítico (morfologia) e quantidade de melanina contida nos melanócitos (Haass et al., 2005). Esse controle se estabelece seja pela secreção de inúmeros fatores solúveis liberados pelas células para o ambiente extracelular (por exemplo, proteinases, proteínas da matriz extracelular, fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas) (Rocco et al., 2011) ou pela interação da proteína de membrana E-caderina expressa nesses tipos celulares (Kuphal & Bosserhoff, 2012). Os domínios extracelulares de moléculas de E-caderina de células adjacentes interagem conjuntamente, enquanto que o domínio intracelular é fixado às fibras de actina do citoesqueleto através de uma ligação com as cateninas, especialmente β -catenina, formando as junções de aderência (Haass, et al., 2004). A transformação maligna de melanócitos frequentemente coincide com a perda de expressão da E-caderina, o que leva à perda da dominância de regulação dos queratinócitos sobre os melanócitos, além do aumento da expressão de N-caderina, que confere novas propriedades adesivas para as células. A expressão de N-caderina pelos melanócitos favorecem a formação de contatos com fibroblastos e células endoteliais vasculares, promovendo desprendimento das células do tecido de origem, culminando com migração e invasão (Kuphal & Bosserhoff, 2012). Mutações no gene que codifica β -catenina também são descritas em aproximadamente 23% das linhagens celulares de melanomas, culminando com localização anormal desta proteína no citoplasma e no núcleo celular (Damsky et al. 2011).

Em melanócitos, assim como em outras linhagens celulares normais, a partir da ligação de fatores de crescimento, como os de células tronco (SCF), de fibroblastos (FGF), de hepatócitos (HGF) e neurotrófico derivado da glia (GDNF), aos seus respectivos receptores tirosina-quinase presentes na membrana plasmática, ocorre uma cascata de fosforilação de suma importância na retransmissão de informações extracelulares para o núcleo, que culmina com a regulação de diversos processos celulares, tais como, a proliferação, diferenciação, sobrevivência e migração (Kim et al., 2012). Na ativação desses receptores, a cascata de sinalização promovida pela via RAS / RAF / MEK / ERK

é uma das mais conhecidas e está intimamente envolvida na progressão do melanoma. Essa via também pode ser ativada por receptores acoplados à proteína G, sendo a proteína G RAS o sistema efetor comum. A ativação dessa via de sinalização, no entanto, está reduzida em melanócitos. Já em melanomas humanos, ERK é hiperativado em 90% dos casos, seja por ação dos fatores de crescimento, seja por alterações genéticas nos fatores acima da cascata, as proteínas RAS e RAF. Nos melanomas humanos, os genes codificadores de RAS e RAF apresentam-se mutados em 15% a 30%, e em 50% a 70%, respectivamente, levando a sua ativação permanente, o que culmina com a promoção de sobrevivência, proliferação, invasão, angiogênese (Yajima et al., 2012).

A cascata envolvendo o fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) é uma segunda via de sinalização intracelular importante e gera fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3), um segundo mensageiro que induz a fosforilação e ativação da proteína quinase B (PKB, também conhecida como Akt), que por sua vez ativa a sobrevivência celular, proliferação, migração, invasão e a sinalização antiapoptótica. Essa sinalização antiapoptótica de Akt ocorre via ativação de MDM2, que é uma ubiquitina ligase que tem como alvo a p53 (uma proteína associada a apoptose - supressora tumoral), levando este alvo à degradação. MDM2 é altamente expresso em 6% de *nevus* displásicos, 27% de melanoma *in situ*, e 56% de melanomas primários invasivos ou metastáticos (Yajima et al., 2012).

A desregulação de genes chaves que codificam proteínas antiapoptóticas, também, foi descrito em melanomas e estão diretamente relacionados à resistência a quimioterápicos. Enquanto há resultados controversos, algumas vezes mostrando aumento e outras a redução da expressão da proteína pró-apoptótica Bcl-2, a super expressão de Mcl-1 e Bcl-xl está consistentemente relatada em células de melanoma, especialmente em tumores em estágios iniciais (Ji et al., 2010; Pacheco et al., 2011). Mutações no gene que codifica CDK-N2A, também, foram observadas em melanoma, ocorrendo em 40% das famílias com múltiplos casos. Essa quinase está envolvida na expressão dos supressores tumorais p16 e ARF. O primeiro tem a função de inibir CDK-4 e manter a proteína Retinoblastoma (Rb) suprimida, conseqüentemente inibindo

Ras e Raf. Já ARF interage com MDM2, liberando, assim, a proteína supressora tumoral p53 (Swick & Maize, 2012).

Enzimas proteolíticas, através da capacidade de degradar as proteínas da matriz extracelular (MEC), tornam-se componentes importantes para o processo de transformação maligna das células, inclusive dos melanomas (Hofmann et al., 2005, López-Otín et al., 2009). Dentre as enzimas, tem-se as metalo proteases de matriz (MMPs) – um grupo de 24 enzimas que degradam os componentes da MEC e, em especial, da membrana basal (Brinckerhoff & Matrisian, 2002). Essa família de glicoproteínas é secretada como pró-enzima latente, ativada pela proteólise de uma região conservada presente no domínio N-terminal e é regulada, tanto em nível transcricional como traducional (Visse & Nagase, 2003; Hofmann et al., 2005). Os tumores malignos apresentam estratégias que evitam esses mecanismos de regulação e propiciam a alta atividade proteolítica que acompanha o desenvolvimento do câncer e da metástase (Overall & López-Otín, 2002). A transcrição gênica das MMPs é influenciada por fatores que incluem citocinas, fatores de crescimento, hormônios, oncogenes e promotores tumorais (Hofmann et al., 2005). Em nível protéico, a atividade biológica das MMPs é determinada por seu estado de ativação. A atividade das MMPs é modulada por inibidores comuns de endopeptidases, como as α 2-macroglobulinas, que estão presentes no plasma e fluído dos tecidos e, mais especificamente, pelos inibidores de metalo proteases de matriz (TIMPs) (Overall & López-Otín, 2002; Hofmann *et al.*, 2005).

Considerando a complexidade de cascatas de sinalização já identificadas com efetores mutados em melanoma, tais como as RAS / RAF / MEK / ERK, PI3K, supressores tumorais e metalo proteinases, se faz importante o uso de técnicas que permitam uma avaliação global desse sistema biológico, seja para compreender melhor o desenvolvimento da doença, para avaliar novas terapias ou para estudar mecanismos de resistência a quimioterápicos. Assim, estudos como o proteômico, se colocam como uma interessante abordagem.

1.6 Estudos proteômicos

Considerando que são as proteínas que medeiam grande parte dos eventos biológicos nas células e que modificações pós-transcricionais (*splicing*) e pós-traducionais (glicosilação, fosforilação, metilação) impedem que se façam corretamente uma correlação direta entre RNA e estas macromoléculas, os estudos que avaliam qualitativa e quantitativamente perfis proteicos expressos em determinadas situações se colocam com excelentes instrumentos de pesquisa (Tannu & Hemby, 2006). Assim, justifica-se a importância das abordagens proteômicas como ferramentas para analisar muitas doenças e investigar potenciais terapias, especialmente com a combinação de técnicas, incluindo a eletroforese bidimensional (2-DE), análise de imagens e espectrometria de massas (MS) (Kim et al., 2009). Com essas metodologias sequenciais é possível a separação e identificação de proteínas em misturas complexas, podendo ser resolvidas mais de 5000 macromoléculas simultaneamente, e detectar quantidades pequenas, de até 1ng, por *spot*. Além disso, é obtido um mapa proteico que reflete mudanças no nível de expressão de proteínas, isoformas e modificações pós-traducionais (Görg et al., 2004).

No caso da eletroforese bidimensional, as proteínas, que devem estar desnaturadas, desagregadas, reduzidas e solubilizadas, são submetidas a dois processos (duas dimensões) consecutivos de separação baseados em diferentes características das proteínas. Assim, durante a primeira dimensão, denominada focalização isoelétrica (IEF), as proteínas são separadas em um gel de poliacrilamida contendo um gradiente de pH e migram até atingirem uma posição estacionária onde possuam carga líquida zero (ponto isoelétrico). Na segunda dimensão, as proteínas separadas pela IEF são submetidas a uma eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida que as separam de acordo com suas massas moleculares. Como os parâmetros usados na primeira dimensão (ponto isoelétrico) e na segunda dimensão (massa molecular) são independentes, uma grande resolução é atingida (Görg et al., 2004).

Após 2-DE, as proteínas separadas devem ser visualizadas. Considerando que a concentração de uma proteína em uma única célula difere entre seis ou sete ordens de magnitude, níveis de vários milhões de cópias por célula para proteínas abundantes (por exemplo enzimas glicolíticas) a poucas

cópias por célula para proteínas com baixa abundância, os métodos de visualização devem ter alta sensibilidade (limite de detecção baixo), larga faixa linear dinâmica (acurácia para quantificação). Além disso, a reprodutibilidade e compatibilidade com os procedimentos pós-eletroforéticos de identificação de proteínas, como o MS, são importantes características a serem consideradas. No entanto, atualmente não há metodologia de coloração que una todos esses requisitos para a análise proteômica, especialmente no que se refere a detecção de proteínas de baixa expressão (Han et al., 2008).

A MS é a técnica de escolha para a identificação de proteínas excisadas dos géis 2-DE por ser sensível e requerer uma quantidade pequena de amostra (concentrações na ordem de femtomoles). A impressão digital de massas de peptídeos (PMF) é o principal instrumento utilizado para a identificação de proteínas. Essa metodologia é baseada na digestão da proteína a ser identificada por uma enzima proteolítica (por exemplo, tripsina) produzindo fragmentos peptídicos. As massas desses peptídeos são, então, determinadas com grande acuidade (0,1-0,5 Da) por MS e formam uma espécie de impressão digital da proteína. *Softwares* especiais permitem comparar o PMF da proteína a ser identificada com os gerados teoricamente para todas as sequências de proteínas presentes nos bancos de dados. Se a sequência da proteína problema estiver no banco de dados ela será imediatamente identificada. (Görg et al., 2004).

Vários aprimoramentos dentro da metodologia 2-DE foram realizados, dentre eles a Eletroforese bidimensional diferencial (DIGE – *Difference Gel Electrophoresis*). Trata-se de uma variante da 2-DE que possui maior acurácia na identificação de alterações de dentro de múltiplas amostras simultaneamente e com confiança estatística. A comparação de imagens fica mais objetiva e, adicionalmente, no DIGE todas as amostras são normalizadas pelo uso de um padrão interno em todos os experimentos. No DIGE, fluoróforos, que são moléculas espectralmente resolvidas e equiparadas quanto a carga e massa (por exemplo as cianinas Cy2, Cy3 e Cy5), são ligados covalentemente ao grupo amino de lisinas presentes nas proteínas. Consequentemente, a mesma amostra de proteína marcada com qualquer dos fluoróforos irá migrar muito próxima à posição original no gel 2D. Em um protocolo típico, as amostras controle e

tratada são separadamente marcadas utilizando diferentes fluoróforos (por exemplo Cy3 e Cy5, respectivamente), enquanto a mistura consistindo de uma quantidade equivalente destas amostras é marcada com Cy2. As amostras marcadas são combinadas e a 1ª e 2ª dimensões são realizadas em um único gel 2-DE, permitindo assim melhor sobreposição dos spots e minimizando as variações entre géis, além de diminuir o número de géis por experimento (Wu et al., 2006). A marcação com Cy's também é reconhecidamente mais sensível do que os outros métodos de detecção convencionais, tais como Coomassie e Nitrato de Prata (Han et al., 2008).

Assim, considerando as vantagens que o DIGE apresenta, tais como a avaliação global de expressão de proteínas e modificações pós-traducionais, e maior sensibilidade e robustez do que outras metodologias em proteômica, esta técnica se coloca como uma importante ferramenta para avaliações de eventos moleculares que ocorrem em sistemas biológicos, dentre eles a transformação celular e a formação de metástase, além de ser um instrumento para análise de doenças e potenciais terapias (Kim et al., 2009).

2. JUSTIFICATIVA

Na quimioterapia do câncer se utilizam fármacos com pouca ou nenhuma seletividade contra as células tumorais. Esses fármacos atuam, geralmente, sobre o ciclo celular, ou seja, apenas em massas tumorais em franco desenvolvimento. Em vista disso, nesse tratamento se manifestam efeitos tóxicos que, por vezes, são os responsáveis pela morte e/ou falhas da terapia. Apesar de existirem estudos em andamento, na atualidade não estão disponíveis na clínica fármacos e/ou outra terapia que impeçam os processos de invasão dos tecidos adjacentes e da colonização de outros órgãos pelas células tumorais (metástases). A metástase é, sem dúvida, a forma tumoral responsável pela alta morbidade e mortalidade da doença. Assim, é de grande interesse obter agentes, conhecendo os mecanismos de ação, que possam agir seletivamente contra as células tumorais e que evitem o estabelecimento de metástases.

Como já descrito, a fração P1G10, classificada como segura conforme os estudos toxicológicos sistêmicos, possui atividade antitumoral e antimetastática sobre diferentes modelos murinos (melanoma e carcinomas). Os resultados obtidos apontam que essas atividades estão relacionadas com uma possível ação citotóxica, atividade antiangiogênica, redução na capacidade de invasão e adesão celular aos componentes da matriz extracelular e modulação do sistema imune, eventos estes relacionados com a expansão tumoral. Observamos que dentre as frações (proteases) que compõem P1G10, a subfração CMS-2 (obtida por cromatografia de troca iônica CM Sephadex) é a responsável pelo efeito antimetastático em modelos de melanoma-B16-F10 e de carcinoma-CT26WT. Além de CMS-2 promover fragmentação de DNA de linhagens tumorais, sabe-se que proteases purificadas a partir desta fração alteram os níveis de fosforilação de proteínas envolvidas na proliferação celular, bem como apresentam efeitos biológicos via cascatas já amplamente descritas, tais como a ativação de receptores do tipo tirosina quinases, MAPK e PLC, em linhagem normal.

Diante do exposto, propomos identificar proteínas com expressões moduladas pela mistura proteica CMS-2. Tais identificações podem auxiliar no entendimento do seu mecanismo de ação antimetastático e, conseqüentemente, fundamentar um futuro uso terapêutico.

3. OBJETIVO GERAL

Identificar, *in vitro*, proteínas que tenham a expressão modulada pelo tratamento com a fração proteolítica CMS-2, derivada do látex de *Vasconcellea cundinamarcensis*, que apresenta atividade antitumoral e antimetastática.

3.1 Objetivos específicos

3.1.1 Obter a amostra CMS-2 em quantidade suficiente para a realização do trabalho;

3.1.2 Em linhagens celulares murinas de melanoma metastático, B16-F10, e de melanócito normal, Melan-a, avaliar o efeito da fração CMS-2 sobre:

3.1.2.1 parâmetros de citotoxicidade (viabilidade e lise celular),

3.1.2.2 o perfil proteômico, pelo método de eletroforese bidimensional:

a) selecionando os *spots* e identificando as proteínas de interesse por espectrometria de massa;

b) classificando as proteínas quanto à sua função celular;

c) obtendo redes de interações com as proteínas de interesse, visando identificar outros possíveis alvos moleculares;

3.1.3 Eventos celulares, *in vitro*, relacionados com o desenvolvimento tumoral e metastático.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Biológicos

- Látex exsudado de frutos imaturos de *Vasconcellea cundinarmacensis* (*Carica candamarcensis* Hook 1835) originário do Chile, cedido pelo prof. Dr. Carlos Salas do Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG. Exsicata n°15063 depositada na Universidad de La Serena, Chile.

- Linhagem celular Melan-a: células de melanócito murino, cedidas pelo Prof. Dr. Roger Chammas, Departamento de Radiologia/Faculdade de Medicina/Universidade de São Paulo, Brasil.

- Linhagem celular B16-F10: células de melanoma murino com alto potencial de colonização pulmonar (metastática), cedidas pelo Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer - São Paulo, Brasil.

- Soro fetal bovino (FBS) (Gibco-Life Technologies do Brasil, São Paulo, SP, Brasil).

4.1.2 Equipamentos

Agitador magnético modelo 252 – Fizatron Equipamentos Elétricos para Laboratórios, São Paulo, SP, Brasil.

Analizador proteômico AB SCIEX MALDI TOF/TOF™ 5800 System - Applied Biosystems, USA.

Aparelho de eletroforese vertical Ettan DALTsix Electrophoresis Unit - GE HealthCare, Buckinghamshire, Inglaterra.

Autoclave Vertical – Phoenix Equipamentos Científicos, Araraquara, São Paulo, Brasil.

Balança eletrônica analítica modelo AR-2140 – Toledo do Brasil Indústria de Balanças Ltda, São Paulo, SP, Brasil.

Banho Maria calibrado a 37°C - Fanem, São Paulo, SP, Brasil.

Bomba Aspirante modelo "H" - Nevoni Equipamentos Médicos e Odontológicos, Lapa, SP, Brasil.

Bomba Peristáltica Econo-Pump - Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA.

Câmara digital para microscópio invertido, Moticam 2500 5.0 MPixel – Motic, Xiamen, China.

Capela com fluxo laminar de ar ultra-filtrado - Veco do Brasil Indústria & Companhia de Equipamentos, Campinas, SP, Brasil.

Centrífuga refrigerada, Sorvall ST 16R – ThermoFisher Scientific, Wiltshire, Inglaterra.

Concentrador de amostras Speed Vac Concentrator – Savant, New York, EUA.

Containers de Nitrogênio Líquido Volta 34 – MVE, Minnesota, EUA.

Cooler - Amersham Biosciences/GE HealthCare, Buckinghamshire, Inglaterra.

Deionizador de água por meio de osmose reversa – Millipore Corporation, Massachusetts, EUA.

Espectrofotômetro de duplo feixe para faixas UV (ultra-violeta) e visível, modelo UV150-02 – Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão.

Estufa de cultura incubadora a 36,5 °C, atmosfera úmida controlada e contendo 5% (v/v) CO₂ - Nuair Equipaments, Plymouth, MN, USA.

Fonte para eletroforese Electrophoresis Power Supply EPS601 - GE HealthCare, Buckinghamshire, Inglaterra.

Freezer -80°C Forma 900 Series – Thermo Fisher Scientific, Califórnia, EUA.

Leitor de Placa de Elisa Multiskan GO - Thermo Fisher Scientific, Califórnia, EUA.

Medidor de pH modelo NT-PH2, equipado com eletrodo modelo V-620C – Analion Aparelhos & Sensores Ind. & Com., Ribeirão Preto, SP, Brasil e Novatécnica Equipamentos para Laboratórios, Piracicaba, São Paulo, Brasil.

Microscópio ótico linha CB e Microscópio ótico invertido modelo CK2 – Olympus Corporation, New York, EUA.

Refrigerador ajustado à temperatura de 4°C; Freezer à temperatura de -20°C – Consul – Multibrás Eletrodomésticos S/A, São Bernardo do Campo, São Paulo, Brasil.

Scanner ImageScanner - Amersham Biosciences/GE HealthCare, Buckinghamshire, Inglaterra.

Scanner Typhoon FLA 9000 - GE HealthCare, Buckinghamshire, Inglaterra.

Sistema de isoeletrofocalização Ettan™IPGPhor™ 3 - GE HealthCare, Buckinghamshire, Inglaterra.

Sistema de ultrafiltração “Amicon” modelo 8200 - Amicon Inc., MA, EUA.

Ultra-sonicador modelo FS-28H – Thermo Fisher Scientific, Califórnia, EUA.

4.1.3 Diversos

Barras magnéticas - Fizatron, Equipamentos Eletrônicos para Laboratórios, São Paulo, SP, Brasil.

Botijão de CO₂ e de nitrogênio de 25 kg de gás acoplado ao sistema de ultrafiltração - Air Liquide Ltda, São Paulo, SP, Brasil.

Colunas cromatográficas de vidro, medindo 40,0 x 2,5 cm e 22,0 x 2,5 cm - Pharmacia LKB, Uppsala, Suécia.

Criotubos – Sarstedt, Nümbrecht, Alemanha.

Cubetas de poliestireno e de quartzo com 1,0 cm de largura - Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão.

Garrafas de poliestireno (frasco de cultivo) de 25 cm² e 75 cm² para cultura, e placas de poliestireno multicavidades de 6, 24 e 96 cavidades - TPP, Trasadingen, Suíça.

Gaze – Cremer, São Paulo, SP, Brasil.

Hemocitômetro (Câmara de Neubauer) – Neubauer Improved Bright-line Kinittel Gläser, Horsham, Philadelphia, EUA.

Membrana de esterilização para seringa 0,22 µm de diâmetro de poro – Millipore Corporation, Bedford, MA, EUA

Membrana para ultrafiltração com diâmetro do poro de 10 kDa - Amicon Inc., MA, EUA.

Membranas filtrantes de nitrato de celulose, com 0,45 µm e 0,22 µm de diâmetro de poro - Millipore Corporation, Bedford, MA, EUA.

Nitrogênio líquido - White Martins do Brasil S/A, Contagem, MG, Brasil.

Pipetadores automáticos com capacidade máxima de 2, 20, 200 e 1000 µl FisherBrand Elite – Thermo Scientific, Joensuu, Finlândia.

Placa MTP AnchorChip™ 600/384 - Bruker Daltonics – Massachusetts, EUA.

Placas de eletroforese (Vidro de baixa fluorescência) DALT Gel Cassette 1 mm (21,5 x 27,5 cm de dimensão) - GE HealthCare, Buckinghamshire, Inglaterra.

Ponteiras contendo resina C18 ZipTip®C18 - Millipore Corporation, Bedford, MA, EUA.

Ponteiras de 10, 200 e 1000 µL – Axygen Scientific, Califórnia, EUA.

Saco de diálise com poro 10 kDa de diâmetro - Sigma Chemical Co, St. Louis, MD, EUA.

Sistema de eletroforese - Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA

Tubos de polipropileno, com fundo cônico, de 15 e 50 ml de capacidade e dotados de tampa rosqueável - Quimex Corning Incorporated, New York, NY, EUA.

Tubos tipo eppendorf de 0,6; 1,5 e 2,0 mL – Axygen Scientific, Califórnia, EUA.

Vidrarias (Béqueres, Ehrlenmeyers, Funis, Pipetas graduadas, Provetas, Quitassatos, Balões volumétricos e Tubos de ensaio com 14 X 1 cm de dimensões) - Vidrolabor-Thermex Astra Brasil Ind. Vidros, F. Vasconcelos, SP, Brasil.

4.1.4 Reagentes e solventes

Acetato de sódio, Ácido Fórmico 85%, Acrilamida, Bicarbonato de amônio, Cloreto de sódio, Corante azul-brilhante de Coomassie G-250, Glicina, Hidróxido de sódio, Sulfato de Amônio, Tris base, Ureia – Vetec Química Fina Ltda, Duque de Caxias, RJ, Brasil.

Acetonitrila, Albumina de soro bovino, Ampicilina sódica, Anfotericina B, Azul de Tripiano, Benzoil-arginil-para-nitro-anilida (BAPNA), Cisteína, CM Sephadex G-25, Estreptomicina, Ácido N-(2-hidroxietil)-piperazino-N'-etanossulfônico (HEPES), Hidroxiureia, Iodoacetamida, L-dopa, L-Lisina, Melanina, Metilmetano-tiosulfonado (MMS), Forbol 12-miristato-13-acetato (PMA), Resazurina, Sephadex G-10 - Sigma Chemical Co, St. Louis, Maryland, EUA.

Ácido acético glacial P.A., Ácido fosfórico 85% P.A., Cloreto de potássio, Dimetil sulfóxido (DMSO), Etileno-diamino- tetracetato dissódico (EDTA), Etanol P.A., Fosfato dibásico de sódio P.A., Fosfato monobásico de potássio P.A., Fosfato monobásico de sódio P.A, HCl, Metanol P.A., Peróxido de Hidrogênio 35% P.A. – Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil.

Ácido para-hidroximercuribenzóico – Irvine, Califórnia, EUA.

Agarose - Bio Basic INC, Markham, Ontário, Canadá.

Bicarbonato de sódio – Cinética Química, São Paulo, SP, Brasil.

Bis-acrilamida, Ditiotretol (DTT), Persulfato de amônio, N',N',N',N'-tetrametil-etileno-diamina (TEMED) – Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos

Glicerol – Dinâmica Química Contemporânea, Diadema, SP, Brasil.

Azul de bromofenol, 3-[(3-Colamidopropil)dimetilamônio]-1-propanossulfonato (CHAPS), IPG Buffer (pH 3-11NL), Mix de inibidor de proteases, Tiureia – GE HealthCare, Buckinghamshire, Inglaterra

Matriz para espectrometria de massa ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA) - Fluka, St. Gallen, Suíça.

Meio RPMI-1640 desidratado (comercial), Solução aquosa de tripsina (ATV) - Cultiab, Campinas, SP, Brasil.

Dodecil sulfato de sódio (SDS) – Neon Comercial, São Paulo, SP, Brasil.

Ácido Trifluoroacético (TFA), Ortovanadato de sódio - Merck, Darmstadt, Alemanha

Tripsina - Promega, Madison, WI, EUA

4.1.5 Kits para análises

Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric) - nº catálogo 11647229001 e Cytotoxicity Detection Kit (LDH) - nº catálogo 11644793001 - Roche, Penzberg, Alemanha.

Senescence β -galactosidase Staining Kit - nº catálogo 9860 - Cell Signaling Technology Inc., Boston, MA, EUA.

2D Quant Kit - nº catálogo 80648356, Amersham Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis - nº catálogo 28403841, Amersham CyDye DIGE Fluors (minimal dyes) for Ettan DIGE - nº catálogo 25801065 e Immobiline DryStrip gel pH 3-11NL, 7 - nº catálogo 17600373 e 24 cm - nº catálogo 17600372 - GE HealthCare, Buckinghamshire, Inglaterra.

4.1.6 Softwares

Bruker Daltonics BioTools 3.2™ - Bruker Daltonics – Massachusetts, EUA.

DeCyder™ 2-D Differential Analysis Software v7.2 - GE HealthCare, Buckinghamshire, Inglaterra.

GraphPad Prism 5. - GraphPad Software, Califórnia, EUA.

ImageMaster™ 2D Platinum (versão 6.0) - GE HealthCare, Buckinghamshire, Inglaterra.

IPGphor - GE HealthCare, Buckinghamshire, Inglaterra

Motic Image Plus 2.0 - Motic, Xiamen, China.

Peaks to Mascot do programa 4000 Series Explore - Applied Biosystems, Califórnia, EUA.

TScratch – CSE Lab, Zurique, Suíça.

4.1.7 Soluções

4.1.7.1 Tampão de ativação (Tampão acetato de sódio 1 M, cisteína 25 mM, EDTA 10 mM e DTT 5 mM)

Cisteína 200 mM	0,04 mL
EDTA 500 mM	4,00 mL
DTT	0,16 g
Tampão acetato de sódio 1 M (pH 5,0) q.s.p	200,00 mL

4.1.7.2 Tampão acetato de sódio pH 5,0 (1,5 M)

Acetato de sódio	204,12 g
Água destilada q.s.p.	1000,00 mL

O pH foi ajustado para 5,0 com HCl 1,0 M. As soluções de Acetato de sódio 1,0 e 0,1M foram preparadas a partir da diluição da solução a 1,5 M com Água destilada.

4.1.7.3 Solução de azul-brilhante de Coomassie para Bradford

Coomassie Blue G-250	0,50 g
Etanol 95%	25,00 mL
Ácido fosfórico 85%	50,00 mL
Água destilada q.s.p	500,00 mL

4.1.7.4 Tampão fosfato 25 mM pH 8,0

Fosfato dibásico 0,2M	35,50 mL
Fosfato monobásico 0,2 M	1,98 mL
Água destilada	37,50 mL

4.1.7.5 Tampão de incubação para atividade amidásica

Cisteína 200 mM	0,75 mL
EDTA 500 mM	0,12 mL
BAPNA 100 mM	90,00 µL
Tampão fosfato 25 mM pH 8,0 q.s.p.	30,00 mL

4.1.7.6 Tampão Tris-HCl 1,0 mM pH 6,8; 0,4% SDS (p/v)

Tris base	18,20 g
SDS	0,40 g
Água destilada q.s.p.	100,00 mL

Os reagentes foram completamente dissolvidos em 80 mL. Em seguida, o pH foi ajustado para 6,8 com HCl 1,0 M e o volume completado para 100 mL.

4.1.7.7 Tampão Tris-HCl 1,0 mM pH 8,8; 0,4% SDS (p/v)

Tris base	18,20 g
SDS	0,40 g
Água destilada q.s.p.	100,00 mL

Os reagentes foram completamente dissolvidos em 80 mL. Em seguida, o pH foi ajustado para 8,8 com HCl 1,0 M e o volume completado para 100 mL.

4.1.7.8 Solução aquosa de acrilamida: bis-acrilamida 29:1 (p/p) 30% (p/v)

Acrilamida	26,10 g
Bis-acrilamida	0,90 g
Água destilada q.s.p.	90,00 mL

4.1.7.9 Solução para gel separador desnaturante 12% de acrilamida

Solução aquosa de acrilamida: bis-acrilamida 29:1 (p/p) 30% (p/v)	1,20 mL
Tampão Tris-HCl 1,0 mM pH 8,8; 0,4% SDS (p/v)	0,75 mL
Solução aquosa de persulfato de amônio 10% (p/v)	25,00 µL
TEMED.....	5,00 µL
Água deionizada	1,02 mL

4.1.7.10 Solução para gel concentrador desnaturante 5% acrilamida

Solução aquosa de acrilamida: bis-acrilamida 29:1 (p/p) 30% (p/v).....	166,80 µL
Tampão Tris-HCl 1,0 mM pH 6,8; 0,4% SDS (p/v)	250,00 µL
Solução aquosa de persulfato de amônio 10% (p/v)	10,00 µL
TEMED	2,00 µL
Água deionizada	571,20 µL

4.1.7.11 Tampão de corrida eletroforese desnaturante (Tris base 0,025 M; glicina 0,19 M; SDS 0,1% (p/v))

Tris base	0,76 g
Glicina	3,60 g
SDS	0,25 g
Água destilada q.s.p.	250,00 mL

4.1.7.12 Tampão de amostra eletroforese desnaturante (Tris-HCl 0,07 M; glicerol 30% (v/v), SDS 10% (p/v))

Tampão Tris-HCl 1,0 mM pH 6,8; 0,4% SDS (p/v)	0,70 mL
Glicerol	0,30 mL
SDS	0,10 g
Azul de bromofenol	0,12 mg

4.1.7.13 Solução fixadora para géis

Metanol P.A.	50,00 mL
Ácido acético glacial P.A.	10,00 mL
Água destilada q.s.p.	100,00 mL

4.1.7.14 Solução de Azul-brilhante de Coomassie para coloração de géis

Corante azul-brilhante de Coomassie G-250	125,00 mg
Ácido acético glacial P.A.	10,00 mL
Água destilada q.s.p.	100,00 mL

4.1.7.15 Solução descorante de géis

Metanol P.A.	5,00 mL
Ácido acético glacial P.A.	7,00 mL
Água destilada q.s.p.	100,00 mL

4.1.7.16 Meio RPMI-1640 (NaHCO₃ 14 mM, Herpes 4 mM, Ampicilina 0,27 mM, Estreptomicina 0,06 mM, Anfoteromicina B 5,41 µM)

Meio RPMI-1640 desidratado (comercial)	10,43 g
Bicarbonato de sódio	1,20 g
Hepes	2,38 g
Ampicilina sódica.....	0,10 g
Estreptomicina	0,10 g
Anfotericina B.....	5,00 mg
Água deionizada q.s.p.	1,00 L

Os reagentes foram completamente dissolvidos em 800 mL. Em seguida, o pH foi ajustado para 6,9 ou 7,4 com NaOH 1,0 M e o volume completado para 1000

mL. Esterilizado por filtração em membrana com porosidade absoluta de 0,22 μm .

4.1.7.17 Tampão PBS pH 7,4

Fosfato dibásico de sódio P.A.	1,15 g
Fosfato monobásico de potássio P.A.	0,25 g
Cloreto de sódio	8,20 g
Cloreto de potássio	0,20 g
Água destilada q.s.p.	1,00 L

O pH é ajustado para 7,4 com solução de NaOH 1,0 M e o tampão é esterilizado por autoclavação a 120°C durante 20 minutos. Para a produção do Tampão PBS com EDTA, 1,37 g deste sal foi adicionado.

4.1.7.18 Solução corante de azul de Tripano

Azul de Tripano	0,12 g
Solução NaCl 0,9% q.s.p	30,00 mL

4.1.7.19 Tampão de lise (Ureia 8,0 M, Tiourea 2,0 M; CHAPS 4% (p/v); Tris 40 mM, Ortovanadato de sódio 0,4 mM e mix de inibidores de proteases)

Ureia	4,80 g
Tiourea	1,50 g
CHAPS	0,40 g
Tris 1M pH 8,8	0,40 mL
Mix de inibidor de proteases (GE Healthcare)	0,10 mL
Ortovanadato de sódio 40 mM	0,10 mL
Água para injetáveis	10,00 mL

4.1.7.20 Tampão IEF (8 M de uréia, 2 M de tiuréia, CHAPS 4%, azul de bromofenol 0,0025%, DTT 65 mM e 1% (v/v) Tampão IPG pH 3,0 a 11,0 NL (GE Healthcare)

Ureia	4,80 g
Tiureia	1,50 g
CHAPS	0,40 g
Azul de bromofenol 0,5% (p/v)	0,05 mL
DTT	0,10 g
Água para injetáveis	10,00 mL

4.1.7.21 Tampão de Equilíbrio (50 mM de Tris 1,5M pH 8,8, 6M Uréia, 30% Glicerol, 2% Dodecil Sulfato de Sódio - SDS, 0,001% v/v Azul de Bromofenol 0,5%)

Tris 1,5 M pH 8,8	6,70 mL
Ureia	72,07 g
Glicerol	69,00 mL
SDS	4,00 g
Azul de bromofenol 0,5% (p/v)	0,40 mL
Água para injetáveis	200,00 mL

4.2 Métodos

4.2.1 Obtenção da fração CMS-2 e CMS-2 inibida

A partir de incisões no epicarpo de frutos imaturos, o látex de *V. cundinamarcensis* foi coletado e armazenado a 4°C para transporte. Posteriormente, o mesmo foi liofilizado e novamente armazenado a -20°C. Para a separação cromatográfica, foram dissolvidos 20,0 g do látex liofilizado em 100 mL de tampão de ativação (item 4.1.7.1). A mistura foi lentamente agitada à temperatura ambiente durante 30 min e centrifugada (9.000 x g) durante 10 min a 4°C. O sobrenadante foi filtrado em gaze, sendo repetido o procedimento descrito acima com o resíduo, utilizando-se 30 mL do tampão de ativação. Os filtrados obtidos foram recolhidos e os resíduos desprezados. Os filtrados foram aplicados em resina Sephadex G-10 previamente equilibrada com tampão acetato de sódio 1 M (pH 5,0) (item 4.1.7.2). A corrida cromatográfica se desenvolveu com fluxo de 0,25 mL/min, sendo coletadas frações de 20,0 mL. A triagem das frações foi realizada mediante a estimativa da concentração protéica a 280 nm. As frações obtidas do primeiro pico cromatográfico foram reunidas (P1G10), concentradas e lavadas, utilizando um sistema de ultrafiltração com membrana de 10.000 Da.

Para a segunda separação cromatográfica, os sítios catalíticos das cisteíno proteases presentes em P1G10 foram inibidos utilizando-se o ácido para-hidroximercuribenzóico (inibidor reversível) na proporção de 1 M da fração para 10 M do inibidor. O excesso do inibidor foi removido por diálise contra tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0 (item 4.1.7.2). A solução resultante foi submetida à cromatografia em coluna CM Sephadex C-25, previamente equilibrada com 0,1 M de acetato de sódio, pH 5,0. As proteínas foram eluídas, com um fluxo constante de 0,5 mL/min, contra gradiente linear, entre 0,1 e 1,2 M de acetato de sódio, e as frações obtidas foram agrupadas conforme perfil protéico, medido em 280 nm, e atividade amidásica (item 4.2.3). As frações referentes ao segundo pico cromatográfico, eluídas após a aplicação do gradiente de acetato de sódio, foram reunidas (CMS-2), concentradas e lavadas, utilizando um sistema de ultrafiltração com membrana de 10.000 Da (Teixeira et al., 2008).

Em experimentos onde a importância da atividade proteolítica de CMS-2 foi avaliada, utilizou-se amostras desta fração inibida com Iodoacetamida, inibidor irreversível de cisteíno proteases. Para isso, 0,2 μM de CMS-2 foi incubado por 5 min à temperatura ambiente com 200 μM de iodoacetamida na presença de cisteína 1 mM. As amostras, então, foram dialisadas com leve agitação contra 250 mL de Água Mili-Q a 4°C durante 48 h (com trocas da água a cada 12 h), para eliminar o excesso de inibidor (Gomes et al., 2009). A atividade amidásica residual foi avaliada conforme descrito no item 4.2.3. Após esse procedimento, as amostras foram esterilizadas (descrito em 4.2.6) e utilizadas nos ensaios biológicos.

4.2.2 Dosagem protéica

A concentração protéica foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976). Volumes entre 1,0 e 10,0 μL de amostras foram incubados, por 15 min, com 290 μL de solução de azul-brilhante de Coomassie (4.1.7.3). A leitura da densidade ótica foi realizada em comprimento de onda de 595 nm. Albumina bovina foi utilizada para construção da curva-padrão.

4.2.3 Atividade amidásica

A atividade amidásica foi determinada com o substrato sintético BAPNA (Baeza et al., 1990). Em triplicata, 10 μg das amostras foram aliquotadas e incubadas, a 37°C, em tampão de incubação (4.1.7.5) contendo BAPNA 0,3 mM. Após o surgimento de uma coloração amarelo-clara, a reação foi interrompida com a adição de 60 μL de solução de ácido acético 60% (v/v). A determinação da concentração molar de paranitroanilida liberada (quantidade de produto formado) foi realizada através da leitura da absorbância em 405 nm e sua relação com o coeficiente de extinção molar, 8800 $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. A atividade proteolítica específica foi expressa em concentração molar de produto formado por unidade de massa da enzima em um determinado tempo: $\text{nM produto} \times \text{min}^{-1} \times \mu\text{g}^{-1}$ enzima (Silva et al., 2003).

4.2.4 Eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida

O sistema de gel utilizado foi constituído por um gel separador e um concentrador. Primeiramente, a solução do gel separador (item 4.1.7.9) foi aplicada em um conjunto de placas de vidro com 8,0 x 10,0 x 0,3 cm de dimensões, com espaçadores de 0,5 mm. Após a polimerização, o gel concentrador (item 4.1.7.10) foi aplicado sobre o gel separador e, em seguida, adicionado um pente com 10 dentes. Após a polimerização do gel concentrador, os pentes e os vedantes foram cuidadosamente retirados, sendo a montagem colocada na cuba de eletroforese contendo o tampão de corrida (item 4.1.7.11). Para desnaturação das amostras, estas foram fervidas por 5 min, antes que fossem aplicadas no gel. Um volume do tampão de amostra (item 4.1.7.12) foi adicionado correspondendo a 1/6 do volume total da amostra. Nas amostras contendo proteases também foi adicionado 1,0 µL de solução MMS 50 mM. A aplicação foi feita nas canaletas localizadas no pólo negativo do gel e a eletroforese desenvolvida em corrente elétrica de 80 V de tensão, 20 mA de corrente e 2 W de potência, durante aproximadamente 2 h (Laemmli, 1970).

Terminada a corrida eletroforética, o gel foi mergulhado na solução fixadora (item 4.1.7.13) por 30 min e, posteriormente, lavado 2 vezes com água destilada para hidratá-lo. Em seguida, as proteínas foram coradas com a solução de azul-brilhante de Coomassie para coloração de géis (4.1.7.14), permanecendo nesta por 30 min ou até o aparecimento das bandas. O fundo do gel (*background*) foi descorado utilizando a solução descorante descrita no item 4.1.7.15. O gel foi digitalizado (Scanner ImageScanner) para a análise dos resultados.

4.2.5 Cultivo celular

A linhagem celular de melanoma murino B16-F10 foi cultivada em meio RPMI 1640 pH 7,4 (item 4.1.7.16), suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) em estufa à 37° C e 5% de CO₂. Melan-a, linhagem de melanócito murino, foi cultivada nas mesmas condições descritas acima, sendo o pH do meio levemente ácido (6,9) suplementado com 5% de FBS e 200 nM de ester de forbol – miristato (PMA, *Phorbol ester myristate*).

Ao atingirem aproximadamente 90% de confluência, procedeu-se à tripsinização das linhagens, quando o meio de cultivo foi removido, as células foram lavadas com 2,0 mL de PBS/EDTA pH 7,4 (item 4.1.7.17). Colocou-se 0,5 mL de solução ATV (solução de tripsina 0,2% e versene 0,02%) que foi inativada após completo desprendimento das células com 1,5 mL do meio RPMI 1640 a 10 % (v/v) de FBS. Obteve-se, então, uma suspensão celular que, após contagem, foi ajustada à densidade celular apropriada para a realização dos experimentos. A viabilidade celular foi determinada pela exclusão de células coradas com solução de azul de tripano (item 4.1.7.18). O congelamento para a manutenção das células viáveis em estoque foi efetuado em alíquotas de 1mL das linhagens celulares (em 30% FBS e 10% DMSO) acondicionadas em criotubos. Os tubos foram, inicialmente, mantidos a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por duas horas e depois estocados em nitrogênio líquido (Armelin, 1973).

4.2.6 Esterilização das amostras para ensaios biológicos

Para evitar contaminação nos ensaios biológicos, antes de todos experimentos as amostras foram filtradas em membranas de nitrato de celulose, com poros de $0,22\text{ }\mu\text{m}$ de diâmetro, procedimentos estes realizados em ambiente estéril.

4.2.7 Avaliação da viabilidade celular pelo método de metabolização do sal de resazurina

As linhagens celulares foram semeadas, nas condições de cultivo, em placas de 96 cavidades ($1,0 \times 10^4$ /poço) e, após adesão, foram expostas por 24h a diferentes concentrações da fração CMS-2 diluídas em meio RPMI 1640 contendo 5% (v/v) de FBS. Em seguida, $10\text{ }\mu\text{L}$ de uma solução de resazurina (10 mg/mL) foram adicionados ao meio, sendo as leituras espectrofotométricas, à 570 e 600 nm, realizada após 2h de exposição (Anoopkumar-Dukie et al., 2005). O cálculo da diferença entre os valores de densidades óticas (D.O.) foi realizado e, a partir do gráfico densidade ótica *versus* concentração, foi feita a regressão não-linear da curva para a determinação da concentração letal para 50% (IC-50), utilizando-se o Programa estatístico GraphPad Prism 5.

4.2.8 Determinação da integridade da membrana celular

As linhagens celulares foram semeadas, nas condições de cultivo, em placas de 96 cavidades (1×10^4 /poço) e, após adesão, foram expostas por 24h a diferentes concentrações da fração CMS-2 diluídos em meio RPMI 1640 suplementado com 1% de FBS, para diminuir a interferência de lactato desidrogenase presente no soro. Após a exposição, seguiu-se com a centrifugação das placas a $250 \times g$ por 10 min e coleta de 100 μ L do sobrenadante. Esse último foi incubado por 15 min, temperatura ambiente e protegido da luz, com 100 μ L da mistura de reação, preparada conforme as instruções do fabricante (Roche®). A leitura espectrofotométrica foi realizada a 492 e 620 nm e os resultados foram expressos como diferença entre os valores de densidades óticas (D.O.). Utilizou-se 1% de Triton X-100 como controle positivo de lise celular (Kondo et al., 1996).

4.2.9 Estudo proteômico

4.2.9.1 Obtenção dos lisados celulares

Células B16-F10 e Melan-a foram semeadas, nas condições de cultivo previamente descritas, em garrafas de 75 cm² na densidade celular de $1,6 \times 10^6$ células/garrafa, cultivadas por 24h e expostas a 10 μ g/mL de CMS-2 diluída em meio RPMI 1640 contendo 5% (v/v) de FBS. Após 24h de exposição, as células foram lavadas 3 vezes com meio de cultura RPMI 1640 e rompidas em tampão de lise para 2D, conforme descrito no item 4.1.7.19. Após centrifugação a 20.000 g por 1 h, o sobrenadante foi aliqotado e armazenado em freezer -80°C até o uso (Fonseca Pires et al., 2014). A concentração protéica foi determinada utilizando-se o kit 2D QuantKit (GE Healthcare), segundo recomendações do fabricante.

4.2.9.2 Eletroforese bidimensional (2-DE)

Inicialmente para padronização da técnica e verificação da distribuição de proteínas presentes na amostra, foram utilizadas *strips* com 7 cm de comprimento e gradiente de pH imobilizado (IPG) não linear de 3 até 11. Após

essa avaliação, foram feitos géis com *strips* de 24 cm, também com IPG não linear de 3 até 11, para obtermos uma maior separação das proteínas e resolução, assim facilitando futuras excisões dos *spots* para a Espectrometria de Massa.

Strips de 7cm foram hidratadas com 250 µg da amostra protéica diluída em Tampão IEF (item 4.1.7.20), em um volume total de 125 µL/*strip*. As de 24 cm foram hidratadas com 1500 µg de proteína também diluída em tampão IEF, em um volume total de 450 µL/*strip*. A hidratação das *strips* ocorreu em temperatura ambiente por 12 h. Em seguida, as de 7cm contendo as amostras foram submetidas à Focalização Isoelétrica (IEF) no equipamento Ettan™IPGPhor™ 3 (GE-Healthcare), a 50 µA/gel nas seguintes condições: 500 V por 2 h; 1000 V por 30 min; 4000 V por 1 h; 4000 V até acumular 16.000 Vh e 500 V por 1 h. As *strips* de 24 cm foram focalizadas utilizando as seguintes condições: 500 V por 4 h; 1000 V por 4 h; 10.000 V por 2 h; 10.000 V até acumular 90.000 Vh e 500 V por 2 h. Após a IEF, as *strips* foram equilibradas para redução e alquilação das proteínas com Tampão de Equilíbrio (item 4.1.7.21), inicialmente contendo 10mg/mL de Ditioneitol (DTT) por 15 min sob leve agitação. Essa solução foi substituída por Tampão de Equilíbrio contendo 25mg/mL de Iodoacetamida (IAA). Posteriormente, as *strips* foram lavadas rapidamente em Tampão de corrida (item 4.1.7.11) e posicionadas horizontalmente na parte superior do gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12% e cobertas com Agarose 0,5% contendo azul de bromofenol 0,002%. Para a segunda dimensão, foi utilizado o aparelho de eletroforese vertical Ettan DALTsix Electrophoresis Unit (GE – Healthcare). A corrida dos géis foi limitada a 15 mA/gel nos primeiros 15 minutos, e após esse período, a corrente foi aumentada para 50mA/gel (Fonseca Pires et al., 2014). Ao término da eletroforese, os géis bidimensionais foram fixados em solução fixadora contendo Ácido Ortofosfórico 2% e Etanol 30% por 12 horas em temperatura ambiente; em seguida em solução contendo Ácido Ortofosfórico 2%, realizando-se 3 lavagens de 10 min cada e, por último, em solução contendo Ácido Ortofosfórico 2%; Etanol 18% e Sulfato de Amônio 12% por 30 min. A essa última solução foi acrescentado 0,1% de Coomassie Brilliant Blue G-250 a 4% para a coloração das proteínas por 5 dias. Após esse período, o background foi removido com Etanol 20% (Neuhoff

et al., 1988) e as imagens dos géis foram digitalizadas, utilizando-se o scanner ImageScanner (Amersham Biosciences).

4.2.9.3 Eletroforese em gel diferencial (DIGE, 2-D Fluorescence Difference Gel Electrophoresis)

Após padronizarmos e avaliarmos a reprodutibilidade dos géis bidimensionais, foi utilizada a técnica DIGE para a comparação da expressão de proteínas entre as diferentes condições de tratamento. O extrato proteico das diferentes condições experimentais foi marcado com fluoróforos CyDye™ (GE Healthcare), conforme o delineamento experimental mostrado na Tabela 1. A marcação das proteínas foi realizada de modo a ocorrer a inversão das amostras com diferentes fluoróforos (Dye Swab com Cy3 e Cy5) e, para a normalização dos dados, uma mistura de todas as amostras foi marcada com o fluoróforo Cy2, sendo este o padrão interno.

Tabela 1: Esquema de marcação com CyDye dos extratos proteicos.

Gel	Cy3	Cy5	Cy2
1	Melan-a Controle	B16-F10 Controle	Mistura das amostras
2	Melan-a Tratado	Melan-a Controle	Mistura das amostras
3	Melan-a Controle	B16-F10 Tratado	Mistura das amostras
4	B16-F10 Tratado	Melan-a Tratado	Mistura das amostras
5	Melan-a Tratado	B16-F10 Controle	Mistura das amostras
6	B16-F10 Controle	B16-F10 Tratado	Mistura das amostras

O pH das amostras foi medido e quando preciso, ajustado para 8,5 com HCl 0,5 M ou NaOH 0,5 M. Foram utilizados para a marcação 400 pmol de cada fluoróforo (Cy2, Cy3 e Cy5) em 50 µg de proteína. As amostras, após a

marcação, foram homogeneizadas, centrifugadas rapidamente e deixadas no gelo por 30 min. Após esse período, foi acrescentado 1 μ L de L-Lisina 10 mM para consumir os fluoróforos não ligados às proteínas, e as amostras foram incubadas no gelo por 10 min (Fonseca Pires et al., 2014). Posteriormente, as amostras marcadas com os fluoróforos foram reunidas conforme Tabela 1 e uma quantidade de lisado proteico não marcado foi acrescido, a fim de se possibilitar a visualização das proteínas por coloração com Coomassie. Essa mistura foi utilizada para hidratar *strips* de 24 cm, pH 3-11 não linear, por 12 h. A primeira e a segunda dimensão do gel bidimensional foi realizada conforme descrito anteriormente (item 4.2.9.2). Após o término da segunda dimensão, os géis foram digitalizados no scanner Typhoon FLA 9000 (GE-Healthcare), pertencente ao Centro de Aquisição e Processamento de Imagens do ICB/UFMG, utilizando os seguintes parâmetros para excitação e emissão da fluorescência: Cy2 (488/520 nm), Cy3 (532/580 nm) e Cy5 (633/670 nm). Em seguida, foram corados com Coomassie, conforme descrito acima (item 4.2.9.2).

4.2.9.4 Análise *in silico* dos géis

Duas formas de avaliação dos géis foram utilizadas neste trabalho, sendo as análises de reprodutibilidade do perfil proteômico e a expressão diferencial de proteínas entre as diferentes condições experimentais. Na primeira avaliação foi utilizado o software ImageMaster 2D Platinum v6.0 (GE - Healthcare), onde foi verificado o índice de correlação (Scatter Plot) da sobreposição entre as imagens e a porcentagem de sobreposição dos *spots* (*match*) entre os géis. Na segunda análise, foi utilizado o software DeCyder™ 2-D Differential Analysis Software v7.2 (GE - Healthcare). Esse programa tem como função a análise de géis fluorescentes realizados através da técnica DIGE, permitindo uma análise automatizada das imagens quanto a detecção, quantificação, sobreposição das imagens e análise estatística dos resultados. Após uma revisão e edição minuciosa para averiguar e corrigir a qualidade do match, os *spots* foram submetidos ao teste *T-student* e ao *One-Way* ANOVA e todos aqueles com o $P \leq 0,05$ foram selecionados como sendo diferencialmente expressos e excisados dos géis para a identificação por espectrometria de massa MALDI-ToF/ToF.

4.2.9.5 Espectrometria de massas

Para a identificação dos *spots* selecionados, os mesmos foram excisados dos géis e descorados através de três lavagens de 15 min cada com 400 µL de uma solução de Acetonitrila 50% e Bicarbonato de Amônio 25 mM, pH 8,0 sob constante agitação. A solução descorante foi removida e, em seguida, os *spots* foram desidratados com 200 µL de Acetonitrila P.A. durante 5 min. Após secagem, foram adicionados 10 µl de uma solução de Tripsina a 20 ng/µL e 20µL de Bicarbonato de Amônio 50 mM para a digestão enzimática das proteínas, no gelo. Na sequência, as amostras foram incubadas a 37 °C por 16 - 24 h para a completa digestão e fragmentação das proteínas. As soluções contendo Tripsina e Bicarbonato de Amônio foram coletadas e transferidas para tubos novos, e ao tubo anterior, contendo os fragmentos de géis, foi adicionada uma solução de Ácido Fórmico 5% e Acetonitrila 50% e deixado por 30 min sobre constante agitação. Após esse período, a solução foi removida e transferida para o tubo contendo a primeira solução retirada. O procedimento anterior com Ácido Fórmico 5% e Acetonitrila 50% foi repetido e essa solução também foi transferida para o tubo contendo os outros extratos. Os tubos contendo todos os extratos foram concentrados até o volume final de 10 µL. Os extratos foram eluídos em colunas ZipTip®C18 (Millipore, USA) para dessalinização e concentração dos peptídeos (Fonseca Pires et al., 2014).

As análises de espectrometria de massa foram realizadas no Laboratório de Toxinologia do Departamento de Fisiologia e Farmacodinâmica - Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. Para análise das amostras, 0,3 µL da solução da amostra foi misturada ao mesmo volume da solução matriz saturada (ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico) na placa MTP AnchorChip™ 600/384 (Bruker Daltonics) e deixada secando em temperatura ambiente. Dados brutos para a identificação de proteínas foram obtidos no analisador proteômico AB SCIEX MALDI TOF/TOF™ 5800 System (Applied Biosystems, USA). A calibração externa do modo MS foi realizada usando uma mistura de quatro peptídeos: des-Arg1- bradiginina ($m/z = 904.468$); angiotensina I ($m/z = 1296.685$); Glu1-fibrinopeptídeo B ($m/z = 1570.677$) e hormônio adenocorticotrópico (18-39) ($m/z = 2465.199$). Os espectros MS/MS foram calibrados externamente usando massas de íons fragmento conhecidos observadas no espectro MS/MS da

angiotensina I. Após a aquisição de dados, uma lista de picos foi obtida a partir dos dados brutos do MS/MS, usando a função Peaks to Mascot do Programa 4000 Series Explore (Applied Biosystems, USA).

Toda a informação adquirida para cada *spot*, ou seja, as relações massa/carga e intensidade dos picos obtidos no espectro, bem como as razões massa/carga e intensidades dos picos referentes a cada um dos cinco espectros de MS/MS foi compilada em um arquivo texto. Esse arquivo foi submetido ao MASCOT (Matrix Science, EUA) (<http://www.matrixscience.com>), para realizar a busca nos bancos de dados. Apenas proteínas com valores de score $P \leq 0,05$ foram consideradas identificadas. Os parâmetros usados para a busca foram os seguintes: sem restrição para peso molecular da proteína, um sítio de clivagem da tripsina perdido, modificações variáveis da metionina (oxidação) e da cisteína (carbamidometilação), formação de piroglutamato na extremidade N-terminal da glutamina sem outras modificações pós- traducionais. A tolerância de massa para os peptídeos nas buscas foi de 0,8 Da para espectros MS e 0,6 Da para espectros MS/MS.

4.2.9.6 Organização dos dados proteômicos

Primeiramente, foi realizada uma categorização funcional entre as proteínas identificadas pelo MALDI através das anotações sobre processos biológicos e funções moleculares para as proteínas de *Mus musculus* depositadas no banco de dados UniProt (<http://www.uniprot.org/>) e confirmadas através do banco de dados Gene Ontology (GO) - (<http://amigo.geneontology.org/cgi-bin/amigo/search.cgi>). O número do GO de cada proteína foi submetido ao catálogo FunCat - Functional Catalogue (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/proj/funcatDB/>), onde as proteínas foram classificadas funcionalmente. Além da classificação funcional, também foi realizada uma pesquisa de predição de interação das proteínas identificadas com proteínas existentes, através do banco de dados String 9.1 (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins - <http://string-db.org>), que fornece uma rede de interações preditas ou já descritas na literatura entre proteínas ou entre genes. As interações incluem associações diretas (físicas) e indiretas (funcionais), que são derivadas de quatro fontes: contexto genômico,

experimental (High-throughput), co-expressão (conservado) e conhecimentos prévios.

4.2.10 Avaliação da proliferação celular pela medida de incorporação de 5-bromo-2-deoxiuridina (BrdU)

As suspensões celulares foram semeadas em placas de 96 cavidades na densidade 1×10^3 (B16-F10) ou 1×10^4 (Melan-a) células/poço, nas condições de cultivo. Após atingirem cerca de 50% de confluência, as células foram carenciadas da presença de fatores de proliferação pela incubação com meio RPMI 1640 sem FBS. Tendo decorrido o carenciamento por 24h, a subfração CMS2 foi aplicada, diluída em meio RPMI 1640 contendo 5% (v/v) de FBS em concentrações variando de 0,5-10,0 $\mu\text{g/mL}$. A proliferação celular foi determinada após 24h de exposição, utilizando-se o imunoensaio colorimétrico, baseado na medição da incorporação de BrdU durante a síntese de DNA. O ensaio foi realizado de acordo com as instruções do fabricante (Roche®). A solução de BrdU (10 $\mu\text{L/cavidade}$) foi adicionada na cultura celular e deixada em incubação durante as últimas 18 h de exposição ao tratamento. Durante esse período, o BrdU é incorporado no DNA das células em proliferação. Depois, o sobrenadante da cultura celular foi removido e as células foram fixadas, e em seguida, incubadas com o anticorpo anti-BrdU conjugado com peroxidase (anti-BrdU-POD). A ligação entre anticorpo e antígeno foi quantificada após a incubação do substrato, pelas leituras espectrofotométricas em 370 e 492 nm (Berthier-Vergnes et al., 2011). O resultado foi expresso como a diferença entre os valores de densidades óticas (D.O.).

4.2.11 Avaliação da senescência pela marcação da enzima β -galactosidase

As suspensões celulares foram semeadas, nas condições de cultivo, em placas de 6 cavidades na densidade $2,5 \times 10^4$ (B16-F10) ou $7,5 \times 10^4$ (Melan-a) células/poço e, após adesão, foram expostas por 72 h a fração CMS-2 na concentração de 10,0 $\mu\text{g/mL}$ diluída em meio RPMI 1640 contendo 5% (v/v) de FBS. Peróxido de hidrogênio a 10 μM foi utilizado como controle positivo para senescência, sendo que as células foram expostas por 1h e, imediatamente,

lavadas e incubadas por 72h com o meio de cultivo. O evento senescência foi avaliado, utilizando-se a marcação colorimétrica da enzima β -galactosidase, conforme as instruções do fabricante (Cell Signaling Technology®). Após a exposição, o meio de cultivo foi removido e as monocamadas foram lavadas com PBS (item 4.1.7.17). Um mililitro de solução de fixação, fornecido pelo kit, foi adicionado e as células foram mantidas por 15 min a temperatura ambiente. Seguiu-se com duas lavagens com PBS e a incubação das células a 37°C em estufa sem CO₂ na presença de 1 mL da solução de marcação pH 6,0, preparada a partir de itens fornecidos pelo kit. Células que possuem atividade de β -galactosidase em pH 6,0 se coram de verde, característica exclusiva de células senescentes (Chang et al., 2011).

4.2.12 Dosagem de melanina intracelular

As linhagens celulares B16-F10 e Melan-a foram semeadas, nas condições de cultivo, em placas de 6 poços ($2,0 \times 10^5$ células/poço) e, após adesão, foram expostas por 24h a diferentes concentrações da fração CMS-2 diluídas em meio RPMI 1640 contendo 5% (v/v) de FBS. Em seguida, as monocamadas foram lavadas três vezes com PBS pH 7,4 (item 4.1.7.17) e as células foram lisadas com 100 μ L NaOH 1M. Os lisados foram incubados a 80°C por 2h e sonificados por 15 min. A absorbância foi determinada a 405 nm e a quantidade do pigmento foi determinada utilizando uma curva-padrão de melanina (Guo et al., 2012). A relação entre quantidade de melanina e dosagem de proteína (medida indireta de número de células) foi calculada e os resultados foram expressos como % de melanina em relação ao controle (100%).

4.2.13 Determinação da atividade da enzima tirosinase

As linhagens celulares B16-F10 e Melan-a foram semeadas, nas condições, de cultivo em placas de 6 poços ($2,0 \times 10^5$ células/poço) e, após adesão, foram expostas por 24h a diferentes concentrações da fração CMS-2 diluídas em meio RPMI 1640 contendo 5% (v/v) de FBS. Em seguida, as monocamadas foram lavadas três vezes com PBS pH 7,4 e as células foram incubadas com 100 μ L de PBS pH 7,4 (item 4.1.7.17) com 1% de Triton X-100

para a lise celular. O extrato foi centrifugado (10.000 rpm, 15 min) e 40µL deste foram misturados com 100 µL de solução de L-dopa (2 mg/mL em PBS pH 7,4). A reação enzimática foi realizada a 37°C e a absorbância medida após 2h (405 nm) (Guo et al., 2012). Os valores de densidade óptica foram normalizados em relação à quantidade proteica presente no lisado e os resultados foram expressos como % de atividade tirosinase em relação ao controle (100%).

4.2.14 Avaliação da migração celular, pelo método *scratch assay*

Células B16-F10 e Melan-a foram semeadas, nas condições de cultivo, em placas de 24 poços e mantidas até a confluência. Utilizando uma ponteira de P200, foi feita uma ranhura em linha reta na monocamada, a fim de se mimetizar uma lesão. Imagens da fenda foram capturadas por uma câmera acoplada a um microscópio invertido as 0, 8, 24 e 48h após os tratamentos com a fração e controles, em pontos marcados. As imagens foram analisadas utilizando o software TScratch, para quantificação das áreas ocupadas pela lesão (Liang et al., 2007). Para eliminar o efeito da proliferação celular no fechamento da lesão, 500 µM de Hidroxiureia, inibidor de ribonucleotídeo redutase (Wilisch-Neumann et al., 2014), foi adicionado ao meio de cultura durante todo o período de exposição à amostra CMS-2. Os resultados foram expressos como % de fechamento da fenda, considerando como 0% a área medida no tempo zero.

4.2.15 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como médias \pm e.p.m e as análises estatísticas realizadas por meio de análise de variância (*one* ou *two way* ANOVA), seguidas pelos testes de múltiplas comparações, utilizando-se os métodos de Student Newman-Keuls ou Bonferroni. Valores de $p < 0,05$ foram considerados como significativos.

5. RESULTADOS

Para identificar proteínas em células tumorais e normais que tenham sua expressão modulada pelo tratamento com CMS-2, inicialmente esta fração proteolítica, derivada do látex de *Vasconcellea cundinamarzensis*, foi obtida, em quantidade suficiente para a realização do trabalho, e caracterizada. Em seguida, através da avaliação da viabilidade celular, determinou-se a Concentração inibitória para 50% da população (IC50), após 24h de exposição, em linhagens celulares de melanoma metastático (B16-F10) e melanócito (Melan-a), ambos murinos. Essa foi a concentração utilizada posteriormente nos estudos proteômicos, que se deu com a confecção de lisados celulares, comparação da abundância de expressão de *spots* e extração destes últimos em géis, para posterior identificação das proteínas e organização dos dados obtidos. Avaliações de eventos celulares relacionados com as proteínas com expressão alterada, tais como a proliferação e a migração celular, a senescência e a melanogênese, também foram realizados sob o efeito do tratamento com CMS-2.

5.1 Obtenção da fração CMS-2

O processo de obtenção de CMS-2 foi realizado conforme descrito no item 4.2.1. Após a aplicação de 5,0 g de P1G10 em coluna contendo resina de troca catiônica “CM-Sephadex”, foi possível obter o perfil cromatográfico mostrado na Figura 2A. Quatro picos principais são observados (CMS-0 a CMS-3) de acordo com o perfil proteico (absorbância 280 nm), sendo CMS-1 e CMS-2 os que concentram a maior quantidade de proteínas. Por sua vez, o perfil de atividade enzimática das frações eluídas mostrou que as proteínas que compõem CMS-1 apresentam atividade amidásica aproximadamente 3 vezes superior as de CMS-2, fato este comprovado pela determinação da atividade amidásica específica dos picos, que foram de 18,8 nM/mim/μg e 6,5 nM/mim/μg, respectivamente. As principais bandas protéicas presentes nas frações CMS-1 e CMS-2 são evidenciadas no gel de eletroforese (Figura 2B), correspondendo a massas moleculares de 23 a 27kDa.

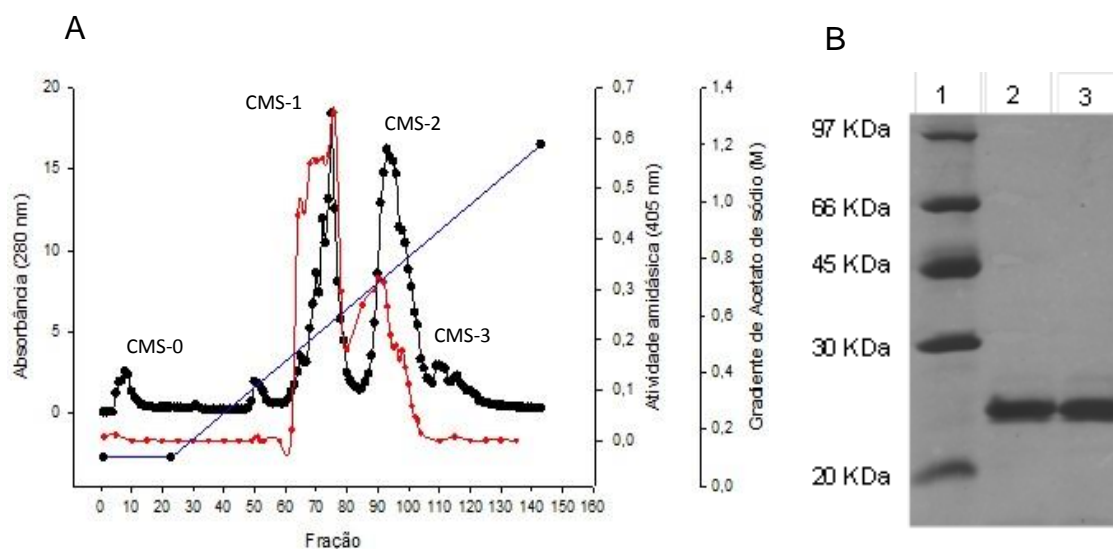


Figura 2: Obtenção e caracterização bioquímica de frações proteolíticas do látex de *V. cundinamarcensis*. A- Perfil cromatográfico representativo da fração P1G10 em coluna de troca iônica, CM-Sephadex. A solução de P1G10 foi inicialmente eluída com solução de acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0), fluxo de 0,5 mL/min. Após lavagem exaustiva, iniciou-se a aplicação do gradiente de acetato de amônio até 1,2 M. Frações de 20 mL foram coletadas para determinação do perfil protéico (absorbância a 280 nm – curva em preto) e atividade amidásica (curva em vermelho). B- Perfil eletroforético das frações CMS-1 e CMS-2 em gel SDS/PAGE 12% em condições desnaturantes. Trinta microgramos de cada amostra foram aplicados. Canaletas 1: padrão de peso molecular, 2: CMS-1 e 3: CMS-2.

5.2 Determinação da Concentração Inibitória (50%) da fração CMS-2

Para a avaliação da citotoxicidade, as linhagens celulares de melanoma murino metastático, B16-F10, e melanócito murino, Melan-a, foram expostas por 24h a concentrações crescentes (0,5 a 100 $\mu\text{g/mL}$) da fração proteolítica CMS-2 (Figura 3A e 3B, respectivamente). A partir da regressão não linear das curvas foi possível determinar os valores da concentração inibitória para 50% da população celular (IC₅₀). Podemos observar que CMS-2 apresenta valores próximos de IC₅₀ tanto para a linhagem tumoral quanto para a normal. Imagens ilustrativas das linhagens celulares B16F10 (Figuras 3C e 3D) e Melan-a (Figuras 3E e 3F) são apresentadas na ausência ou presença de 10,0 $\mu\text{g/mL}$ de CMS-2, respectivamente.

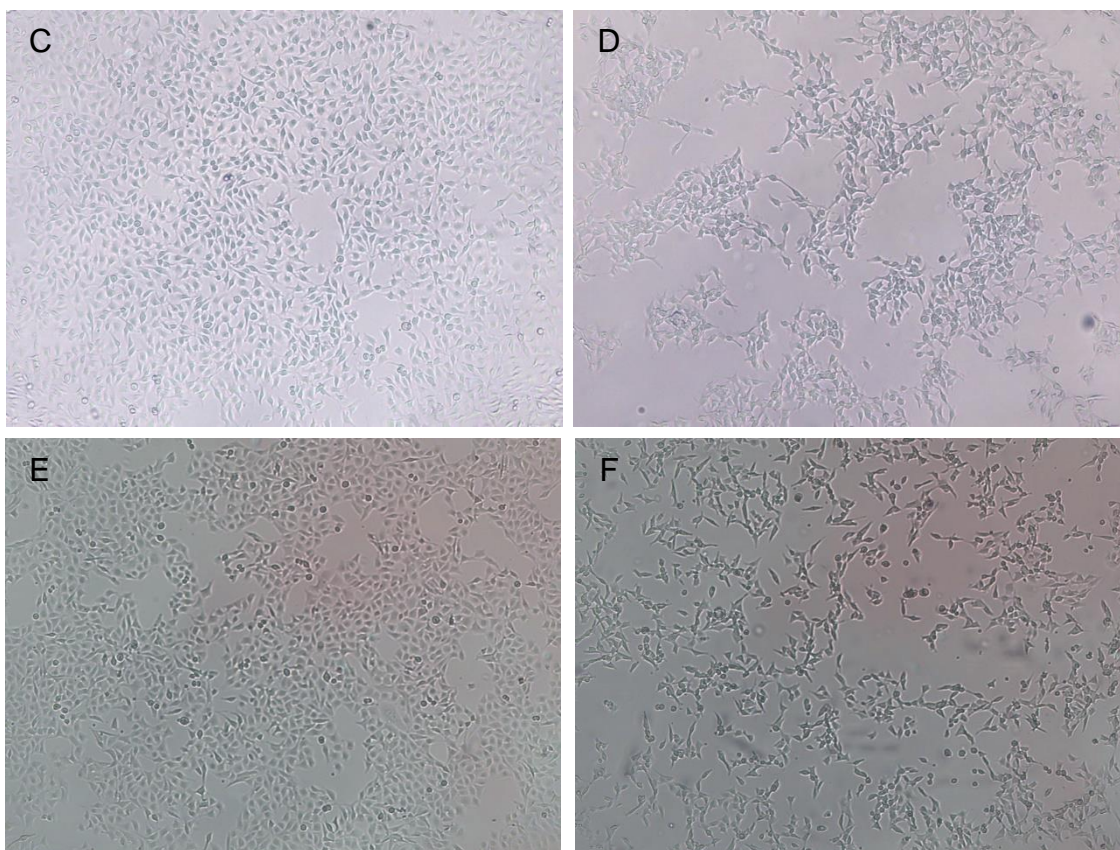
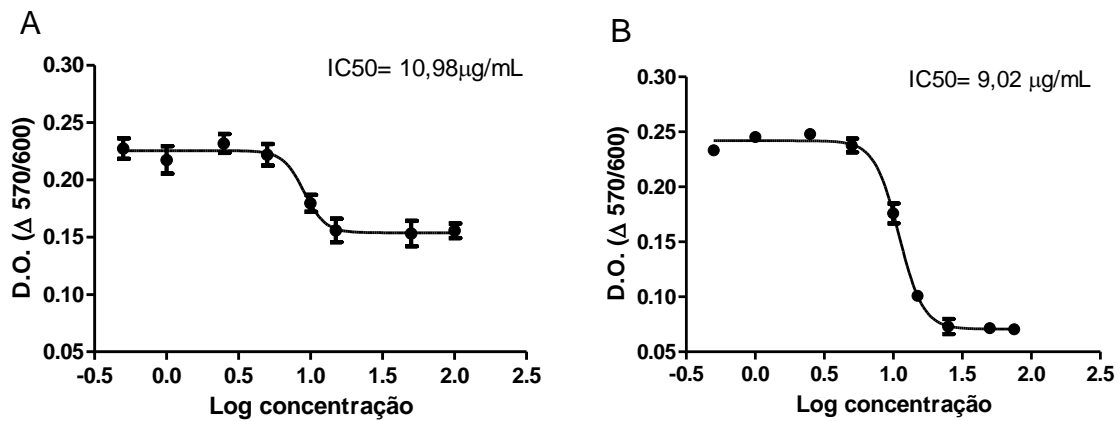


Figura 3: Avaliação da viabilidade celular após tratamento com CMS-2. Células B16-F10 (A) ou Melan-a (B) foram semeadas em placas de 96 poços, na densidade de 1×10^4 células/poço, e expostas à fração (0,5 – 100 µg/mL) por 24h. Após o tratamento a metabolização do sal de Resazurina foi quantificada espectrofotometricamente (570 e 600 nm). Valores de IC50 foram obtidos a partir da regressão não-linear das curvas Concentração *versus* Efeito. Imagens representativas das células sob o tratamento com 10 µg/mL de CMS-2: C: B16-F10 controle; D: B16-F10 tratado; E: Melan-a controle e F: Melan-a tratado. Aumento de 4x.

A integridade da membrana celular também foi avaliada como medida da atividade citotóxica da fração CMS-2. Conforme ilustrado na Figura 4, CMS-2 não promove a lise celular em concentrações menores os iguais a 10 µg/mL nas linhagens celulares analisadas, após 24h de exposição. Os valores de atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) nas células expostas ao tratamento se apresentaram comparáveis ao controle negativo (meio RPMI 1640 contendo 1% de FBS) e significativamente menores quando comparados ao controle positivo (1% de Triton X-100). Já as concentrações de 50 e 100 µg/mL, após 24h de exposição, promoveram uma diminuição da atividade de LDH em relação ao controle negativo.

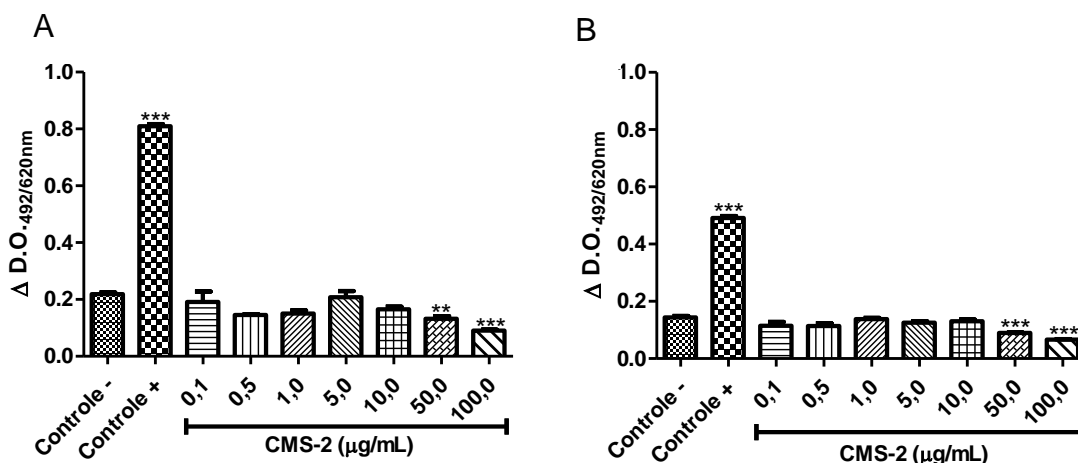


Figura 4: Avaliação da integridade da membrana celular após tratamento com CMS-2. Células B16-F10 (A) e Melan-a foram semeadas em placas de 96 poços, na densidade de 1×10^4 células/poço e, após adesão, foram expostas às amostras em meio RPMI 1640 suplementado com 1% de FBS. Após 24h de exposição, as placas foram centrifugadas e o sobrenadante coletado para análise da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH), seguindo o protocolo do fabricante (Cytotoxicity detection kit, Roche). O produto da reação foi quantificado espectrofotometricamente (492 e 620 nm) e o gráfico plotado com a diferença entre as absorvâncias. ** ou *** indicam resultados diferentes estatisticamente do controle negativo (RPMI 1640 contendo 1% de FBS), com $p < 0,01$ ou $0,001$, respectivamente (ANOVA seguida de pós-teste Bonferroni). Controle +: 1% de Triton X-100 em meio RPMI contendo 1% de FBS.

5.3 Estudo proteômico de lisados celulares extraídos de B16-F10 e Melan-a tratados com a fração CMS-2

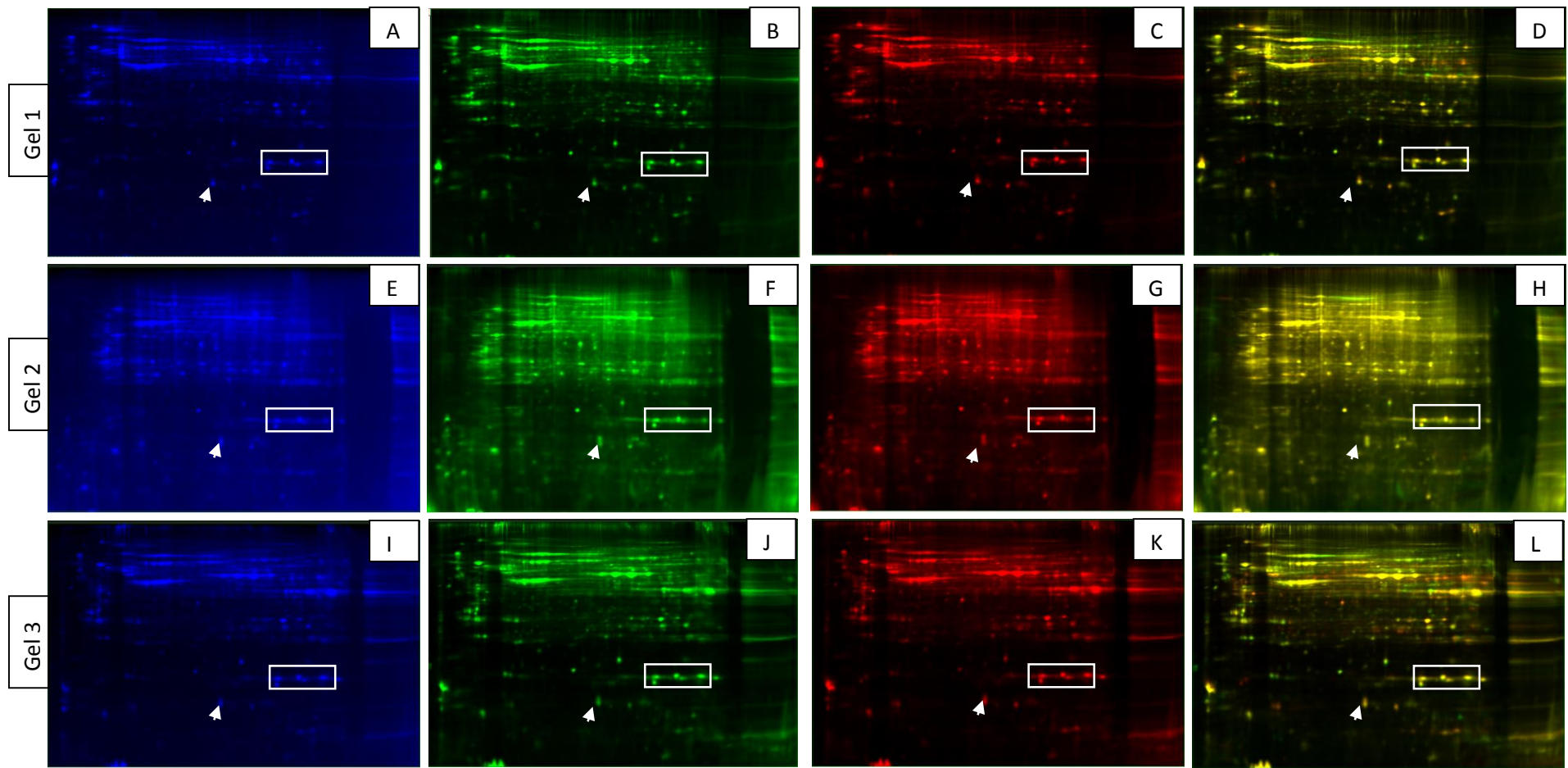
Com o intuito de se identificar possíveis proteínas que sejam moduladas pelo tratamento com CMS-2, utilizou-se neste trabalho o estudo do proteoma de lisados celulares normais e tumorais após exposição à esta amostra. Assim, células B16-F10 e Melan-a foram expostas por 24h à concentração de 10 µg/mL de CMS-2 (valor aproximado correspondente a IC50 – Figuras 3A e 3B). Em seguida, os lisados celulares de B16-F10 e Melan-a tratados ou controles foram obtidos pela incubação com tampão de lise contendo alta concentração de Ureia e Tiourea, além do detergente não iônico CHAPS e de inibidores de proteases, e a quantidade de proteína foi determinada com o auxílio do kit 2D QuantKit (GE Healthcare) (Tabela 2).

Tabela 2: Concentração proteica de lisados celulares de B16-F10 e Melan-a tratados ou não com CMS-2.

Condição experimental		Concentração proteica (µg/mL)
B16-F10 Controle	1	2,7 ± 0,3
	2	3,2 ± 0,3
	3	3,4 ± 0,2
B16-F10 Tratado	1	3,5 ± 0,2
	2	2,5 ± 0,2
	3	3,0 ± 0,2
Melan-a Controle	1	2,3 ± 0,2
	2	2,6 ± 0,3
	3	2,7 ± 0,2
Melan-a Tratado	1	2,7 ± 0,3
	2	2,1 ± 0,2
	3	2,2 ± 0,2

Após padronização da quantidade de proteína e condições de focalização para obtenção de géis bidimensionais com alta reprodutibilidade, < 70% de correlação entre triplicatas de géis de amostras biológicas independentes (resultados não mostrados), seguiu-se com os estudos usando a metodologia DIGE. Na Figura 5 são mostradas as imagens da marcação com Cy2 (488/520 nm), Cy3 (532/580 nm), Cy5 (633/670 nm) e sobreposição de Cy3 e Cy5 dos seis géis DIGE obtidos a partir de extratos protéicos de lisados celulares de B16-

F10 e Melan-a tratados e não tratados com CMS-2. Observa-se, de uma forma geral, uma ampla distribuição dos *spots* entre diferentes pontos isoelétricos e pesos moleculares, mostrando a complexidade das amostras de extratos proteicos utilizados. Além disso, sugere-se uma boa reprodutibilidade entre os géis, visto que vários *spots* são prontamente identificados nos diferentes géis apresentados (identificados com as setas e circulados). Esses géis DIGE foram analisados, utilizando o software DeCyder™ 2-D Differential Analysis Software v7.2 (GE - Healthcare), sendo detectados, após a avaliação e exclusão de artefatos, 1.128 *spots* no Gel 1 (B16-F10 e Melan-a controles), 1.279 no Gel 2 (Melan-a controle e tratado), 1.409 no Gel 3 (B16-F10 tratado e Melan-a controle), 1.354 no Gel 4 (B16-F10 e Melan-a tratados), 1.392 no Gel 5 (B16-F10 controle e Melan-a tratado) e 1.444 no Gel 6 (B16-F10 controle e tratado).



Continua/

/Continua

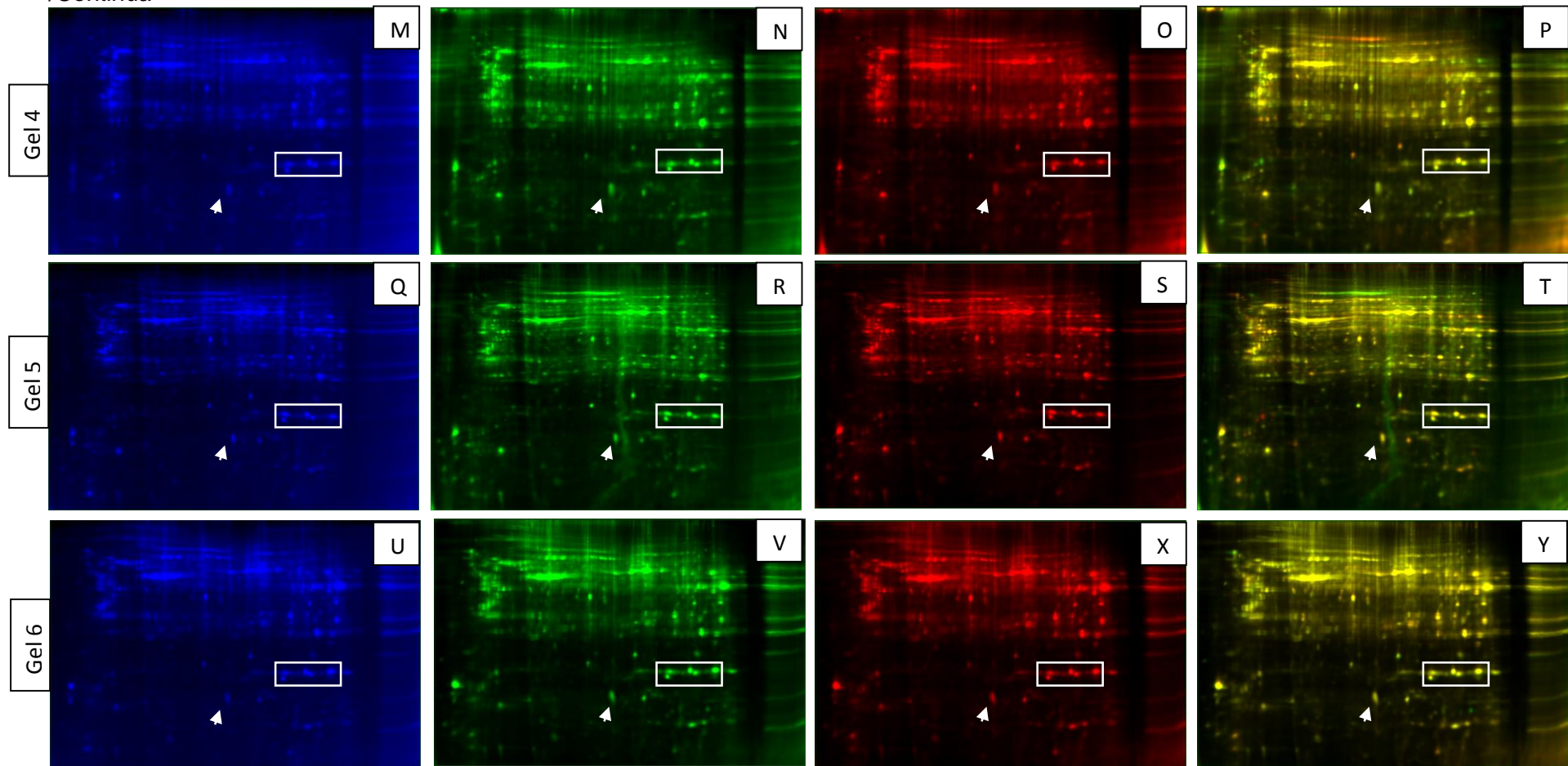


Figura 5: Géis Bidimensionais Fluorescentes de lisados de B16-F10 e Melan-a, em strips de 24 cm pH 3 – 11 NL. A, E, I, M, Q e U – Mix das amostras marcadas com Cy2 utilizado para a normalização, sendo o controle interno da reação; B, G, J – Melan-a Controle; F, O e R – Melan-a Tratado; C, S e V – B16-F10 Controle; K, N e X – B16-F10 Tratado; D, H, L, P, T e Y – Sobreposição das imagens com as marcações com Cy3 e Cy5 dos respectivos géis fluorescentes. As setas e os retângulos identificam spots visualizados em todas as imagens.

Ainda, utilizando o software DeCyder™ 7.2, realizou-se a sobreposição dos *spots* em comum entre cada imagem e a avaliação da diferença de expressão entre as condições experimentais, através dos testes estatísticos T Student e One-Way ANOVA ($P \leq 0,05$). Os *spots* com diferenças de expressão estatisticamente significativas foram selecionados para a excisão do gel e identificação por Espectrometria de Massas. Vinte e um *spots* apresentaram diferenças estatisticamente significativas na abundância de expressão, comparando-se a condição experimental B16-F10 controle (BC) *versus* tratado (BT). Já a comparação entre os grupos Melan-a controle (MC) *versus* BC renderam 71 selecionados e a comparação entre MC *versus* BT apresentou 78 *spots* diferentemente expressos. No entanto, quando comparados Melan-a controle *versus* tratado, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas no nível de expressão de qualquer *spot* analisado. Do total de 117 *spots* selecionados, 84 foram identificados, o que corresponde a aproximadamente 72%. Trinta e três *spots* não foram identificados por motivo de incerteza quanto à localização do mesmo no gel corado por Coomassie (16 *spots*) ou devido ao baixo *score* obtido após análise dos cromatogramas gerados no Programa MASCOT (Matrix Science, USA - <http://www.matrixscience.com>) (17 *spots*). A Figura 6 apresenta a distribuição das proteínas de interesse identificadas entre as diferentes condições experimentais, enquanto que a Figura 7 representa a localização destas no gel, mostrando a ampla distribuição nos diferentes pontos isoelétricos e pesos moleculares.

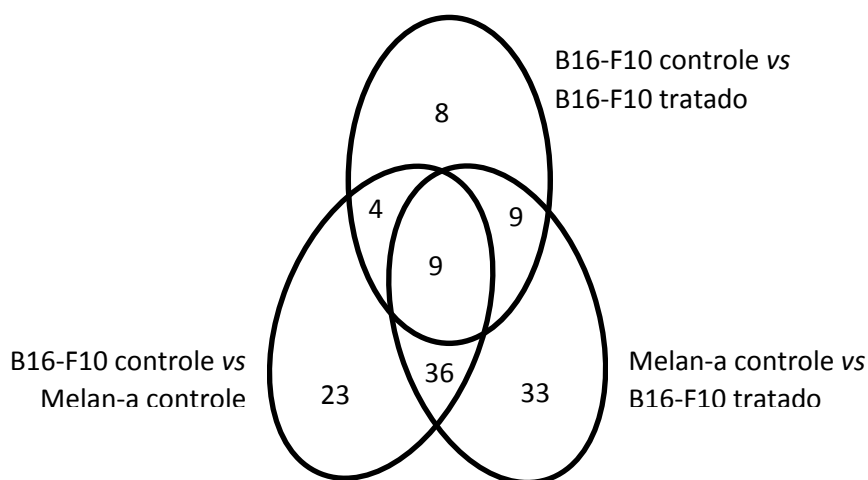
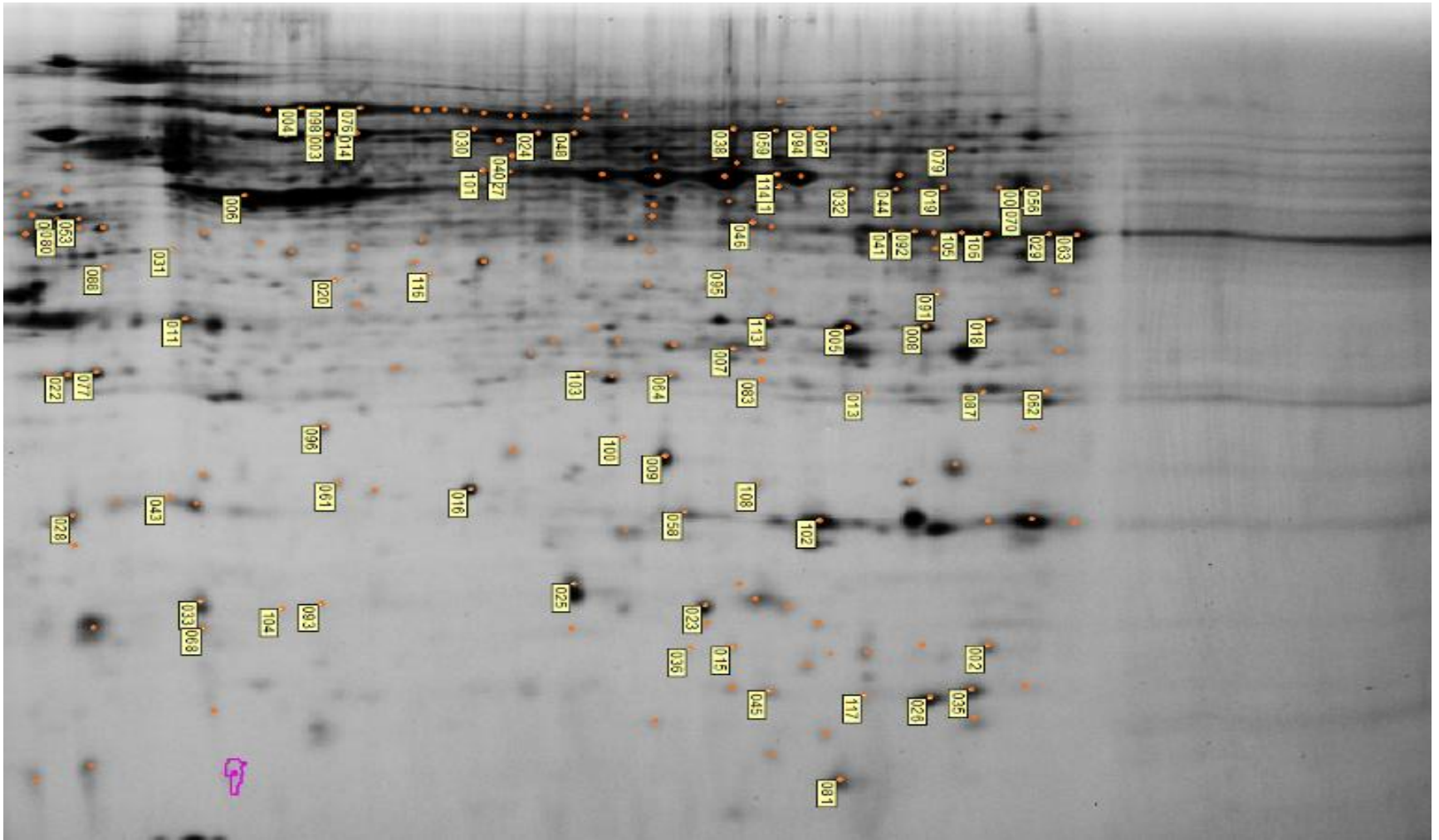


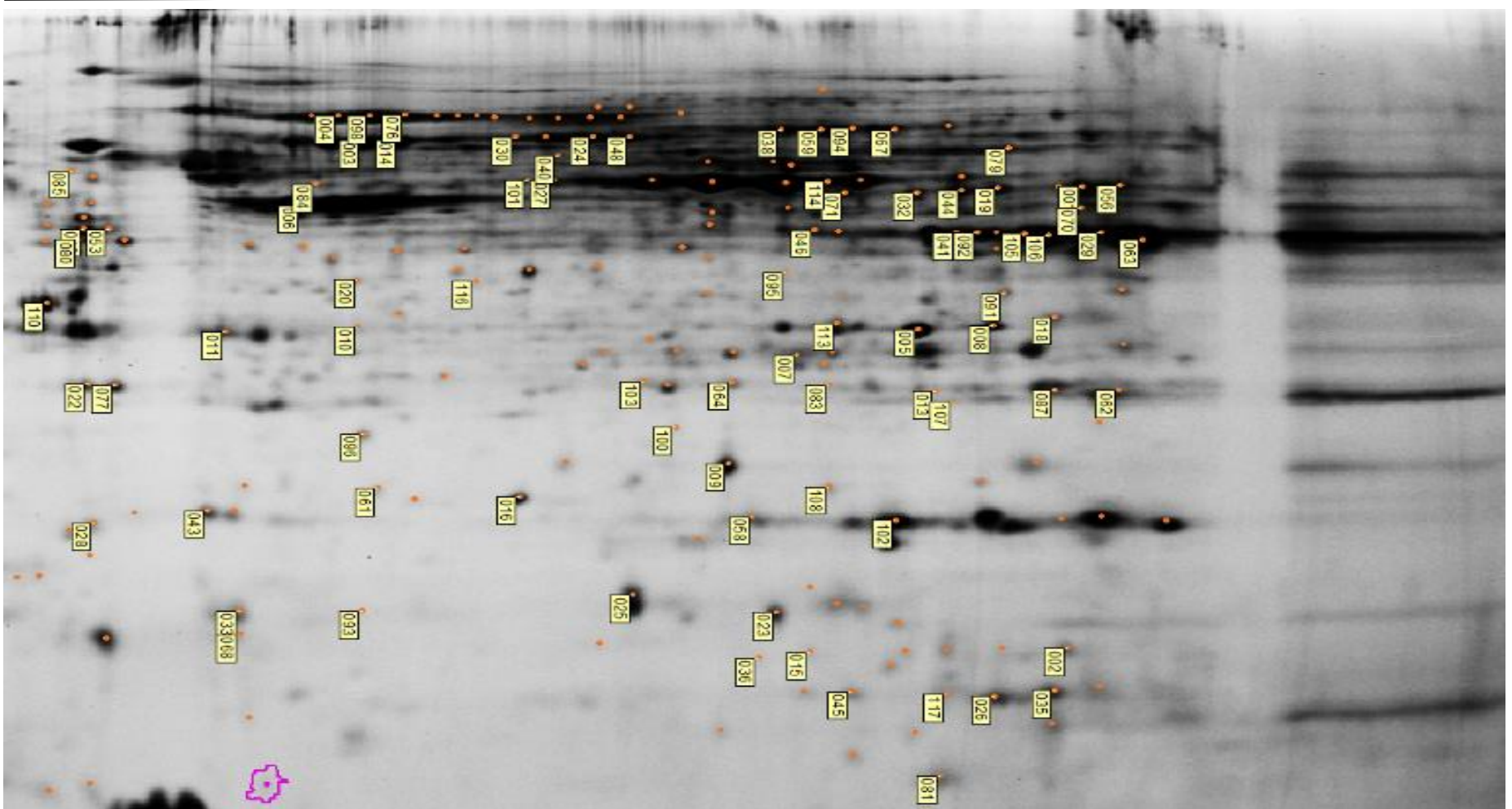
Figura 6: Diagrama de Venn mostrando as proteínas identificadas em cada comparação entre os grupos experimentais.

A 3



Continua/

B



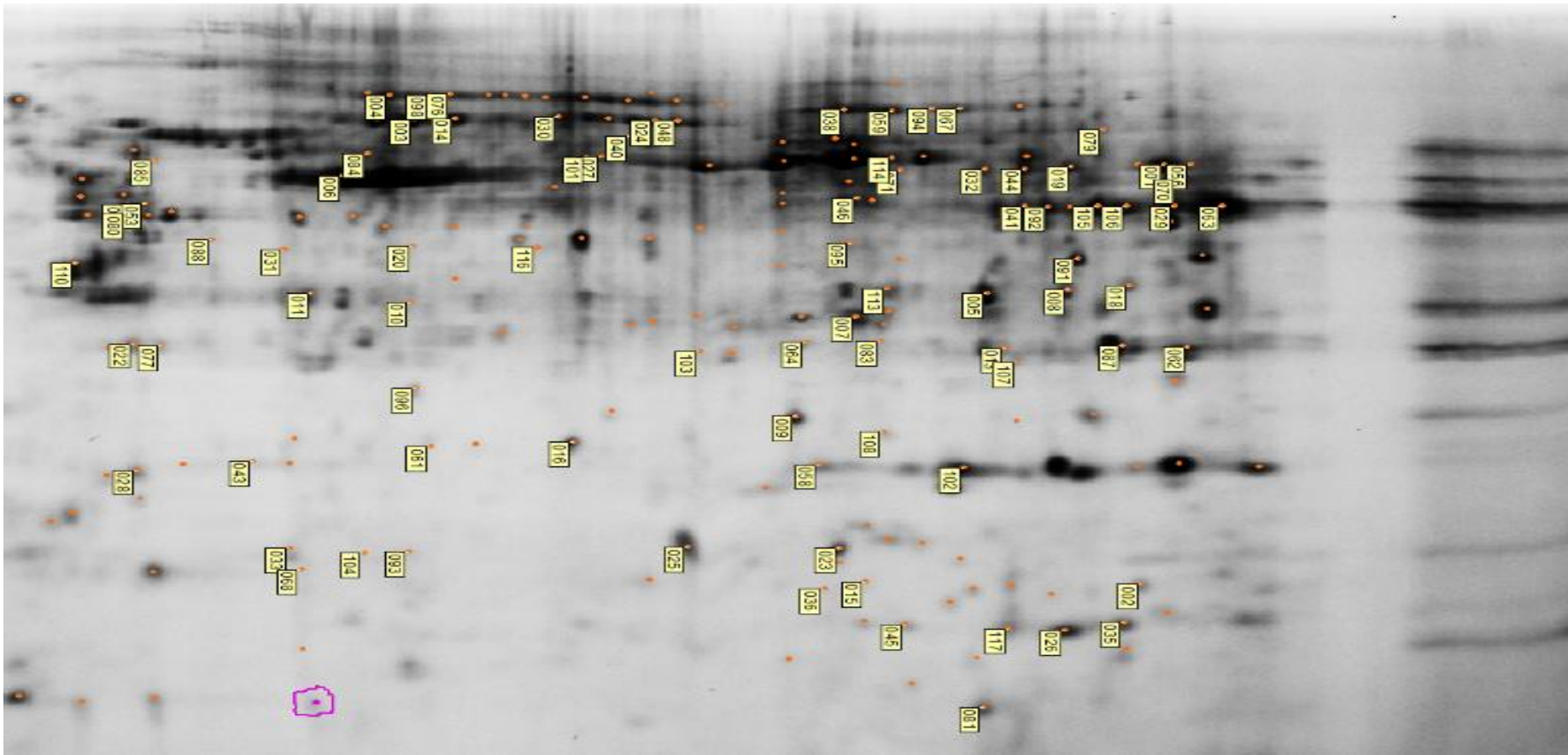


Figura 7: Imagens representativas de géis DIGE com os spots identificados, diferentemente expressos entre os grupos B16-F10 controle *versus* tratado (A), B16-F10 *versus* Melan-a controles (B) e B16-F10 tratado *versus* Melan-a controle (C). Spots selecionados através do Teste estatístico T-Student ($P \leq 0,05$) em géis bidimensionais, tiras de 24cm, pH 3 – 11 não linear.

Na Tabela 3 são apresentadas as proteínas correspondentes aos *spots* identificados, juntamente com a sua codificação GenInfo, a categoria funcional e a abundância desta em relação à comparação dos grupos BC *versus* BT, MC *versus* BC ou MC *versus* BT. Os 84 *spots* identificados corresponderam a 71 proteínas. Isso se deve ao fato de algumas proteínas terem sido encontradas várias vezes em diferentes *spots*, devido a presença de isoformas ou alterações pós-traducionais. Além disso, observa-se que vários *spots* apresentaram diferentes proteínas. No Anexo 1, são apresentadas informações adicionais sobre as proteínas correspondentes aos *spots* identificados: a sequência de peptídeos identificados, os pontos isoelétricos e as massas experimentais e preditas, a área de cobertura e o *score* da identificação.

As 71 proteínas foram agrupadas em 19 categorias funcionais, utilizando o banco de dados FunCat - Functional Catalogue of Proteins, MIPS – Munich Information Center for Protein Sequences (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/mfungd/index.html>), sendo as seguintes: 01. Metabolismo (50 proteínas); 02. Energia (21 proteínas); 10. Ciclo celular e processamento do DNA (12 proteínas); 11. Transcrição (2 proteínas); 12. Síntese proteica (7 proteínas); 14. Destino proteico (enovelamento, modificação, destino) (34 proteínas); 16. Proteína com função de ligação ou co-fator (estrutural ou catalítica) (69 proteínas); 18. Regulação do metabolismo e função proteica (3 proteínas); 20. Transporte celular, transporte de organelas e vias de transporte (14 proteínas); 30. Comunicação celular/mecanismo de tradução do sinal (5 proteínas); 32. Sobrevivência celular, defesa e virulência (20 proteínas); 34. Interação com o meio (10 proteínas); 36. Interação sistêmica com o meio (4 proteínas); 40. Destino da célula (10 proteínas); 41. Desenvolvimento (sistêmico) (3 proteínas); 42. Biogênese de componentes celulares (10 proteínas); 43. Diferenciação celular (4 proteínas) 45. Diferenciação tecidual (4 proteínas) e 47. Diferenciação de órgão (5 proteínas). Várias proteínas foram classificadas em dois ou mais grupos funcionais diferentes, e outras não foram categorizadas (12 proteínas) por não estarem depositadas no banco de dados escolhido. A Figura 8 sintetiza a distribuição das proteínas conforme a classificação funcional das proteínas.

Tabela 3: Proteínas diferencialmente expressas entre as condições experimentais.

Spot	Proteína	GI	Categoria funcional	Abundância
1	Fosfoglicerato quinase	gil202423	01. Metabolismo 02. Energia 14. Destino proteico (enovelamento, modificação, destino) 16. Proteína com função de ligação ou co-fator (estrutural ou catalítica)	BC<BT: 1.26 MC<BC: 2.33 MC<BT: 2.92
2	Enolase 1, (alfa)	gil59808815	01. Metabolismo 02. Energia 16. Proteína com função de ligação ou co-fator (estrutural ou catalítica)	BC>BT: 2.61 MC=BC MC>BT: 3.54
3	Proteína de choque térmico 65	gil51455	14. Destino proteico (enovelamento, modificação, destino)	BC>BT: 1.14 MC=BC MC=BT
	Beta-actina (aa 27-375), putativo	gil49868	16. Proteína com função de ligação ou co-fator (estrutural ou catalítica)	
4	Proteína de choque térmico 70 cognata	gil309319	10. Ciclo celular e processamento do DNA 14. Destino proteico (enovelamento, modificação, destino) 16. Proteína com função de ligação ou co-fator (estrutural ou catalítica) 32. Sobrevivência celular, defesa e virulência 34. Interação com o meio	BC>BT: 1.34 MC=BC MC=BT
5	Fosfoglicerato mutase 1	gil114326546	01. Metabolismo 02. Energia	BC<BT: 1.22 MC<BC: 1.27 MC<BT: 1.55
6	Gama-actina	gil809561	16. Proteína com função de ligação ou co-fator (estrutural ou catalítica) 42. Biogênese de componentes celulares	BC>BT: 1.13 MC=BC MC=BT
	Beta-actina (aa 27-375), putativo	gil49868	16. Proteína com função de ligação ou co-fator (estrutural ou catalítica)	
7	Triosefosfato isomerase	gil54855	01. Metabolismo 02. Energia	BC<BT: 1.42 MC=BC MC<BT: 1.56
	1-Cis peroxirredoxina	gil4139186	20. Transporte celular, transporte de organelas e vias de transporte 32. Sobrevivência celular, defesa e virulência	
8	Fosfoglicerato mutase 1	gil114326546	01. Metabolismo 02. Energia	BC<BT: 1.25 MC=BC MC<BT: 1.37

Continua/

/Continua

9	Cofilina-1	gil6680924	10. Ciclo celular e processamento do DNA 16. Proteína com função de ligação ou co-fator (estrutural ou catalítica) 34. Interação com o meio 40. Destino da célula 41. Desenvolvimento (sistêmico) 42. Biogênese de componentes celulares 47. Diferenciação de órgão	BC>BT: 1.35 MC=BC MC>BT: 1.50
10	Piruvato quinase M	gil551295	01. Metabolismo 02. Energia 16. Proteína com função de ligação ou co-fator (estrutural ou catalítica)	BC<BT: 1.12 MC=BC MC=BT
11	Proteína de choque térmico 70 cognata	gil309319	10. Ciclo celular e processamento do DNA 14. Destino proteico (enovelamento, modificação, destino) 16. Proteína com função de ligação ou co-fator (estrutural ou catalítica) 32. Sobrevivência celular, defesa e virulência 34. Interação com o meio	BC>BT: 1.12 MC>BC: 1.16 MC>BT: 1.30
	Inibidor da dissociação Rho GDP alfa (GDI)	gil13435747	18. Regulação do metabolismo e função proteica 30. Comunicação celular/mecanismo de tradução do sinal	
12	Nucleofosmina isoforma 1	gil6679108	14. Destino proteico (enovelamento, modificação, destino) 16. Proteína com função de ligação ou co-fator (estrutural ou catalítica) 32. Sobrevivência celular, defesa e virulência	BC>BT: 1.30 MC<BC: 1.40 MC=BT
13	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	gil6679937	01. Metabolismo	BC<BT: 1.26 MC=BC MC<BT: 1.23
	Glutationa S-transferase P 1	gil10092608	01. Metabolismo 32. Sobrevivência celular, defesa e virulência	
14	Proteína de choque térmico 65	gil51455	14. Destino proteico (enovelamento, modificação, destino)	BC>BT: 1.14 MC<BC: 1.18 MC=BT
	Chaperonina subunidade 8 (teta), isoforma CRA_b	gil148665922	Sem categorização	
15	Sui1 homólogo	gil4868333	12. Síntese proteica	BC>BT: 1.23 MC=BC MC>BT: 1.38
	Inibidor de peptidase Serina (ou cisteína), subtipo H, membro 1, isoforma CRA_a	gil148684430	Sem categorização	

Continua/

/Continua

16	Estatimina	gil9789995	10. Ciclo celular e processamento do DNA 16. Proteína com função de ligação ou co-fator (estrutural ou catalítica) 30. Comunicação celular/mecanismo de tradução do sinal 34. Interação com o meio 41. Desenvolvimento (sistêmico) 42. Biogênese de componentes celulares 43. Diferenciação celular 45. Diferenciação tecidual 47. Diferenciação de órgão	BC>BT: 1.20 MC>BC: 1.56 MC>BT: 1.87
18	Proteína ligante a calciclina	gil3142331	14. Destino proteico (enovelamento, modificação, destino)	BC>BT: 1.16 MC<BC: 1.21 MC=BT
	Fator de iniciação da tradução eucariótica 4H	gil15808988	12. Síntese proteica 16. Proteína com função de ligação ou co-fator (estrutural ou catalítica)	
19	Fosfoglicerato quinase	gil202423	01. Metabolismo 02. Energia 14. Destino proteico (enovelamento, modificação, destino) 16. Proteína com função de ligação ou co-fator (estrutural ou catalítica)	BC<BT: 1.28 MC<BC: 2.21 MC<BT: 2.83
20	Proibitina	gil6679299	10. Ciclo celular e processamento do DNA	BC<BT: 1.13 MC=BC MC=BT
	Proteína contendo domínio glioxalase 4	gil255003777	Sem categorização	
22	Proteína de controle da tradução tumoral	gil6678437	16. Proteína com função de ligação ou co-fator (estrutural ou catalítica) 40. Destino da célula	BC>BT: 1.26 MC>BC: 1.39 MC>BT: 1.75
	Prostaglandina E sintase 3	gil9790017	01. Metabolismo	
	Fator de iniciação da tradução eucariótica 3 subunidade K isoforma 1	gil21312044	12. Síntese proteica	
23	Proteína contendo tríade de histidina ligante de nucleotídeo 1	gil33468857	Sem categorização	BC=BT MC<BC: 1.68 MC<BT: 1.50
24	Proteína precursora de dissulfeto-isomerase A3	gil112293264	14. Destino proteico (enovelamento, modificação, destino) 40. Destino da célula	BC=BT MC<BC: 1.36 MC<BT: 1.31

Continua/

/Continua

25	Proteína ligante a ácido graxo, isoforma epidermal 1	gij6754450	01. Metabolismo 16. Proteína com função de ligação ou co-fator (estrutural ou catalítica) 20. Transporte celular, transporte de organelas e vias de transporte	BC=BT MC<BC: 1.35 MC<BT: 1.36
26	Proteína de choque térmico 10 kda, mitocondrial	gij6680309	14. Destino proteico (enovelamento, modificação, destino) 16. Proteína com função de ligação ou co-fator (estrutural ou catalítica)	BC=BT MC<BC: 1.57 MC<BT: 1.53
27	Enolase 1, (alfa)	gij59808815	01. Metabolismo 02. Energia 16. Proteína com função de ligação ou co-fator (estrutural ou catalítica)	BC=BT MC<BC: 1.33 MC=BT
28	Citocromo b5	gij13385268	01. Metabolismo 16. Proteína com função de ligação ou co-fator (estrutural ou catalítica) 20. Transporte celular, transporte de organelas e vias de transporte	BC=BT MC<BC: 5.28 MC<BT: 5.03
29	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	gij6679937	01. Metabolismo	BC=BT MC<BC: 1.21 MC<BT: 1.29
	L-lactato desidrogenase cadeia A isoforma 1	gij6754524	01. Metabolismo 02. Energia 16. Proteína com função de ligação ou co-fator (estrutural ou catalítica)	
30	Proteína precursora de dissulfeto-isomerase A3	gij112293264	14. Destino proteico (enovelamento, modificação, destino) 40. Destino da célula	BC=BT MC<BC: 1.29 MC=BT
	Alfa-fetoproteína, parcial	gij191765	01. Metabolismo 16. Proteína com função de ligação ou co-fator (estrutural ou catalítica) 20. Transporte celular, transporte de organelas e vias de transporte 45. Diferenciação tecidual 47. Diferenciação de órgão	
31	Fator de alongação 1-delta	gij13124192	12. Síntese proteica 16. Proteína com função de ligação ou co-fator (estrutural ou catalítica) 18. Regulação do metabolismo e função proteica	BC=BT MC>BC: 1.19 MC=BT

Continua/

/Continua

32	Fosfoglicerato quinase	gij202423	01. Metabolismo 02. Energia 14. Destino proteico (enovelamento, modificação, destino) 16. Proteína com função de ligação ou co-fator (estrutural ou catalítica)	BC=BT MC<BC: 1.80 MC<BT: 1.94
	Cadeia longa acil-coa desidrogenase	gij726095	01. Metabolismo 02. Energia 16. Proteína com função de ligação ou co-fator (estrutural ou catalítica) 20. Transporte celular, transporte de organelas e vias de transporte	
	Proteína ligante a heparina 44	gij220434	Sem categorização	
33	Proteína ligante a beta-galactosídeos	gij193442	16. Proteína com função de ligação ou co-fator (estrutural ou catalítica) 30. Comunicação celular/mecanismo de tradução do sinal	BC=BT MC<BC: 1.99 MC<BT: 1.97
35	Proteína de choque térmico 10 kda, mitocondrial	gij6680309	14. Destino proteico (enovelamento, modificação, destino) 16. Proteína com função de ligação ou co-fator (estrutural ou catalítica)	BC=BT MC<BC: 1.56 MC<BT: 1.69
	Fator de inibição da migração de macrófagos	gij6754696	01. Metabolismo 32. Sobrevivência celular, defesa e virulência 36. Interação sistêmica com o meio 40. Destino da célula	
36	D-dopacromo carboxilase	gij6753618	01. Metabolismo	BC=BT MC<BC: 2.05 MC=BT
38	Fosfoproteína induzida por estresse 1	gij13277819	16. Proteína com função de ligação ou co-fator (estrutural ou catalítica)	BC=BT MC>BC: 1.30 MC>BT: 1.46
	Matricina	gij347839	14. Destino proteico (enovelamento, modificação, destino) 16. Proteína com função de ligação ou co-fator (estrutural ou catalítica)	

Continua/

/Continua

40	Inibidor da dissociação de guanosina difosfato (GDP) 2	gil148700276	16. Proteína com função de ligação ou co-fator (estrutural ou catalítica) 18. Regulação do metabolismo e função proteica	BC=BT MC<BC: 1.19 MC=BT
41	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	gil6679937	01. Metabolismo	BC=BT MC<BC: 1.27 MC=BT
43	Citocromo b5	gil13385268	01. Metabolismo 16. Proteína com função de ligação ou co-fator (estrutural ou catalítica) 20. Transporte celular, transporte de organelas e vias de transporte	BC=BT MC>BC: 1.40 MC>BT: 1.72
	Fator de iniciação da tradução eucariótica 5a	gil148680531	12. Síntese proteica 40. Destino da célula	
44	Fosfoglicerato quinase	gil202423	01. Metabolismo 02. Energia 14. Destino proteico (enovelamento, modificação, destino) 16. Proteína com função de ligação ou co-fator (estrutural ou catalítica)	BC=BT MC<BC: 1.73 MC<BT: 2.09
45	Fator de inibição da migração de macrófagos	gil6754696	01. Metabolismo 32. Sobrevivência celular, defesa e virulência 36. Interação sistêmica com o meio 40. Destino da célula	BC=BT MC<BC: 1.50 MC<BT: 1.68
46	Proteína de choque térmico 70 cognata	gil309319	10. Ciclo celular e processamento do DNA 14. Destino proteico (enovelamento, modificação, destino) 16. Proteína com função de ligação ou co-fator (estrutural ou catalítica) 32. Sobrevivência celular, defesa e virulência 34. Interação com o meio	BC=BT MC>BC: 2.05 MC=BT
	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	gil6679937	01. Metabolismo	
48	Proteína precursora de dissulfeto-isomerase A3	gil112293264	14. Destino proteico (enovelamento, modificação, destino) 40. Destino da célula	BC=BT MC<BC: 1.35 MC<BT: 1.32

Continua/

/Continua

53	Nucleofosmina isoforma 1	gil6679108	14. Destino proteico (enovelamento, modificação, destino) 16. Proteína com função de ligação ou co-fator (estrutural ou catalítica) 32. Sobrevivência celular, defesa e virulência	BC=BT MC<BC: 1.47 MC=BT
56	Fosfoglicerato quinase	gil202423	01. Metabolismo 02. Energia 14. Destino proteico (enovelamento, modificação, destino) 16. Proteína com função de ligação ou co-fator (estrutural ou catalítica)	BC=BT MC<BC: 1.80 MC<BT: 2.22
58	Peptidil-prolil cis-trans isomerase A	gil6679439	14. Destino proteico (enovelamento, modificação, destino) 16. Proteína com função de ligação ou co-fator (estrutural ou catalítica) 43. Diferenciação celular	BC=BT MC<BC: 1.26 MC=BT
59	Fosfoproteína induzida por estresse 1	gil13277819	16. Proteína com função de ligação ou co-fator (estrutural ou catalítica)	BC=BT MC>BC: 1.40 MC>BT: 1.47
61	Proteína relacionada a dissulfeto isomerase 5	gil1710248	Sem categorização	BC=BT MC>BC: 1.47 MC>BT: 1.59
62	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	gil6679937	01. Metabolismo	BC=BT MC<BC: 1.22 MC<BT: 1.30
	Peroxirredoxina-1	gil6754976	20. Transporte celular, transporte de organelas e vias de transporte 32. Sobrevivência celular, defesa e virulência	
	Precursor de peroxirredoxina-4	gil7948999	32. Sobrevivência celular, defesa e virulência	
63	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	gil6679937	01. Metabolismo	BC=BT MC<BC: 1.26 MC<BT: 1.25
64	Glutationa S-transferase P 1	gil10092608	01. Metabolismo 32. Sobrevivência celular, defesa e virulência	BC=BT MC>BC: 1.30 MC>BT: 1.35
	Peróxido redutase dependente de tioredoxina, precursor mitocondrial	gil6680690	16. Proteína com função de ligação ou co-fator (estrutural ou catalítica) 32. Sobrevivência celular, defesa e virulência	
	Proteína nuclear contendo sinal proteolítico PEST	gil71480098	Sem categorização	

Continua/

/Continua

67	Fosfoproteína induzida por estresse 1	gij13277819	16. Proteína com função de ligação ou co-fator (estrutural ou catalítica)	BC=BT MC>BC: 1.41 MC>BT: 1.45
68	Cadeia E, Citocromo C Oxidase no estado de oxidação completa	gij1942990	Sem categorização	BC=BT MC<BC: 1.59 MC=BT
70	Aldolase C	gij229506	01. Metabolismo 02. Energia 16. Proteína com função de ligação ou co-fator (estrutural ou catalítica)	BC=BT MC<BC: 1.42 MC<BT: 1.67
71	Fosfoglicerato quinase	gij202423	01. Metabolismo 02. Energia 14. Destino proteico (enovelamento, modificação, destino) 16. Proteína com função de ligação ou co-fator (estrutural ou catalítica)	BC=BT MC<BC: 1.41 MC=BT
76	Proteína de choque térmico 70 cognata	gij309319	10. Ciclo celular e processamento do DNA 14. Destino proteico (enovelamento, modificação, destino) 16. Proteína com função de ligação ou co-fator (estrutural ou catalítica) 32. Sobrevivência celular, defesa e virulência 34. Interação com o meio	BC=BT MC>BC: 1.69 MC>BT: 1.98
	Proteína de estresse 70, mitocondrial	gij407341	14. Destino proteico (enovelamento, modificação, destino) 16. Proteína com função de ligação ou co-fator (estrutural ou catalítica) 20. Transporte celular, transporte de organelas e vias de transporte 32. Sobrevivência celular, defesa e virulência 34. Interação com o meio	
77	Prostaglandina E sintase 3	gij9790017	Sem categorização	BC=BT MC>BC: 1.33 MC>BT: 1.63
79	Piruvato quinase M	gij551295	01. Metabolismo 02. Energia 16. Proteína com função de ligação ou co-fator (estrutural ou catalítica)	BC=BT MC>BC: 1.19 MC=BT

Continua/

/Continua

80	Nucleofosmina isoforma 1	gil6679108	14. Destino proteico (enovelamento, modificação, destino) 16. Proteína com função de ligação ou co-fator (estrutural ou catalítica) 32. Sobrevivência celular, defesa e virulência	BC=BT MC<BC: 1.35 MC=BT
	Precursor de calreticulina	gil6680836	10. Ciclo celular e processamento do DNA 14. Destino proteico (enovelamento, modificação, destino) 16. Proteína com função de ligação ou co-fator (estrutural ou catalítica) 42. Biogênese de componentes celulares	
81	Mcg13235	gil148684097	Sem categorização	BC=BT MC>BC: 1.64 MC=BT
	Poliubiquitina, parcial	gil1675359	Sem categorização	
	NEDD8 precursor	gil6679034	11. Transcrição 14. Destino proteico (enovelamento, modificação, destino) 16. Proteína com função de ligação ou co-fator (estrutural ou catalítica)	
83	Alfa-fetoproteína, parcial	gil191765	01. Metabolismo 16. Proteína com função de ligação ou co-fator (estrutural ou catalítica) 20. Transporte celular, transporte de organelas e vias de transporte 45. Diferenciação tecidual 47. Diferenciação de órgão	BC=BT MC>BC: 1.38 MC>BT: 1.26
84	Gama-actina	gil809561	16. Proteína com função de ligação ou co-fator (estrutural ou catalítica) 42. Biogênese de componentes celulares	BC=BT MC<BC: 1.05 MC=BT
	Beta-actina (aa 27-375), putativo	gil49868	16. Proteína com função de ligação ou co-fator (estrutural ou catalítica)	
	Fator de iniciação da tradução eucariótica 3, subunidade F	gil47682703	12. Síntese proteica	
85	Vimentina	gil55408	16. Proteína com função de ligação ou co-fator (estrutural ou catalítica) 42. Biogênese de componentes celulares	BC=BT MC>BC: 1.30 MC=BT
87	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	gil6679937	01. Metabolismo	BC=BT MC=BC MC<BT: 1.20

Continua/

/Continua

88	Anexina A5	gij6753060	16. Proteína com função de ligação ou co-fator (estrutural ou catalítica) 36. Interação sistêmica com o meio	BC=BT MC=BC MC>BT: 1.33
91	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	gij6679937	01. Metabolismo	BC=BT MC=BC MC<BT: 1.45
	Aldolase C	gij229506	01. Metabolismo 02. Energia 16. Proteína com função de ligação ou co-fator (estrutural ou catalítica)	
92	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	gij6679937	01. Metabolismo	BC=BT MC=BC MC<BT: 1.41
	Álcool desidrogenase [NADP(+)]	gij10946870	01. Metabolismo	
93	Proteína ligante a beta-galactosídeos	gij193442	16. Proteína com função de ligação ou co-fator (estrutural ou catalítica) 30. Comunicação celular/mecanismo de tradução do sinal	BC=BT MC=BC MC<BT: 1.40
94	Proteína 1 do complexo T, subunidade zeta	gij6753324	14. Destino proteico (enovelamento, modificação, destino) 16. Proteína com função de ligação ou co-fator (estrutural ou catalítica)	BC=BT MC=BC MC>BT: 1.23
95	Fosfoglicerato quinase	gij202423	01. Metabolismo 02. Energia 14. Destino proteico (enovelamento, modificação, destino) 16. Proteína com função de ligação ou co-fator (estrutural ou catalítica)	BC=BT MC=BC MC<BT: 1.59
96	1,2-dihidroxi-3-ceto-5-metiltiopenteno dioxigenase	gij19527270	01. Metabolismo 16. Proteína com função de ligação ou co-fator (estrutural ou catalítica)	BC=BT MC=BC MC>BT: 1.21
	Proteína ribossomal 39S L12, precursor mitocondrial	gij22164792	12. Síntese proteica 16. Proteína com função de ligação ou co-fator (estrutural ou catalítica)	

Continua/

/Continua

98	Proteína de choque térmico 70 cognata	gil309319	10. Ciclo celular e processamento do DNA 14. Destino proteico (enovelamento, modificação, destino) 16. Proteína com função de ligação ou co-fator (estrutural ou catalítica) 32. Sobrevivência celular, defesa e virulência 34. Interação com o meio	BC=BT MC=BC MC>BT: 1.70
	Proteína de estresse 70, mitocondrial	gil407341	14. Destino proteico (enovelamento, modificação, destino) 16. Proteína com função de ligação ou co-fator (estrutural ou catalítica) 20. Transporte celular, transporte de organelas e vias de transporte 32. Sobrevivência celular, defesa e virulência 34. Interação com o meio	
100	Proteína 25 associada a proteína de organização vacuolar isoforma 2	gil25092662	10. Ciclo celular e processamento do DNA 11. Transcrição 20. Transporte celular, transporte de organelas e vias de transporte 42. Biogênese de componentes celulares	BC=BT MC=BC MC<BT: 1.28
101	Piruvato quinase M	gil551295	01. Metabolismo 02. Energia 16. Proteína com função de ligação ou co-fator (estrutural ou catalítica)	BC=BT MC=BC MC<BT: 1.35
	Cadeia beta-5 da tubulina	gil7106439	01. Metabolismo 10. Ciclo celular e processamento do DNA 14. Destino proteico (enovelamento, modificação, destino) 16. Proteína com função de ligação ou co-fator (estrutural ou catalítica) 20. Transporte celular, transporte de organelas e vias de transporte 42. Biogênese de componentes celulares	
102	Peptidil-prolil cis-trans isomerase A	gil6679439	14. Destino proteico (enovelamento, modificação, destino) 16. Proteína com função de ligação ou co-fator (estrutural ou catalítica) 43. Diferenciação celular	BC=BT MC=BC MC<BT: 1.13

Continua/

/Continua

103	Peróxido redutase dependente de tioredoxina, precursor mitocondrial	gil6680690	16. Proteína com função de ligação ou co-fator (estrutural ou catalítica) 32. Sobrevivência celular, defesa e virulência	BC=BT MC=BC MC>BT: 1.54
	Proteína de tráfico de partícula, complexo subunidade 4	gil11140825	16. Proteína com função de ligação ou co-fator (estrutural ou catalítica) 20. Transporte celular, transporte de organelas e vias de transporte 41. Desenvolvimento (sistêmico) 43. Diferenciação celular	
	Proteína do complexo de membrana ER, subunidade 8	gil6754870	Sem categorização	
104	Proteína ligante a beta-galactosídeos	gil193442	16. Proteína com função de ligação ou co-fator (estrutural ou catalítica) 30. Comunicação celular/mecanismo de tradução do sinal	BC=BT MC=BC MC<BT: 1.62
105	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	gil6679937	01. Metabolismo	BC=BT MC=BC MC<BT: 1.46
106	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	gil6679937	01. Metabolismo	BC=BT MC=BC MC<BT: 1.37
107	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	gil6679937	01. Metabolismo	BC=BT MC=BC MC<BT: 1.18
108	Destrina	gil9790219	10. Ciclo celular e processamento do DNA 16. Proteína com função de ligação ou co-fator (estrutural ou catalítica) 34. Interação com o meio 42. Biogênese de componentes celulares	BC=BT MC=BC MC>BT: 1.30
110	14-3-3 proteína epsilon	gil13928824	14. Destino proteico (enovelamento, modificação, destino) 16. Proteína com função de ligação ou co-fator (estrutural ou catalítica)	BC=BT MC=BC MC<BT: 1.16
113	Fosfoglicerato mutase 1	gil114326546	01. Metabolismo 02. Energia	BC=BT MC=BC MC<BT: 1.32
	Proteína ligante a calciclina	gil3142331	14. Destino proteico (enovelamento, modificação, destino)	

Continua/

/Continua

114	Enolase 1, (alfa)	gij59808815	01. Metabolismo 02. Energia 16. Proteína com função de ligação ou co-fator (estrutural ou catalítica)	BC=BT MC=BC MC<BT: 1.29
116	Alfa-fetoproteína, parcial	gij191765	01. Metabolismo 16. Proteína com função de ligação ou co-fator (estrutural ou catalítica) 20. Transporte celular, transporte de organelas e vias de transporte 45. Diferenciação tecidual 47. Diferenciação de órgão	BC=BT MC=BC MC<BT: 1.40
	Proteína de cobertura da F-actina subunidade beta isoforma A	gij83649737	16. Proteína com função de ligação ou co-fator (estrutural ou catalítica) 40. Destino da célula 42. Biogênese de componentes celulares	
117	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	gij6679937	01. Metabolismo	BC=BT MC=BC MC<BT: 1.46
	Fator de inibição da migração de macrófagos	gij6754696	01. Metabolismo 32. Sobrevivência celular, defesa e virulência 36. Interação sistêmica com o meio 40. Destino da célula	

GI: codificação GenInfo; Categoria Funcional: classificação funcional da proteína através do banco de dados FunCat - Functional Catalogue of Proteins, MIPS – Munich Information Center for Protein Sequences (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/mfunqd/index.html>), Abundância: relação entre intensidade do spot do grupo B16-F10 controle (BC) versus B16-F10 tratado (BT) ou Melan-a controle (MC) versus BC ou MC versus BT.

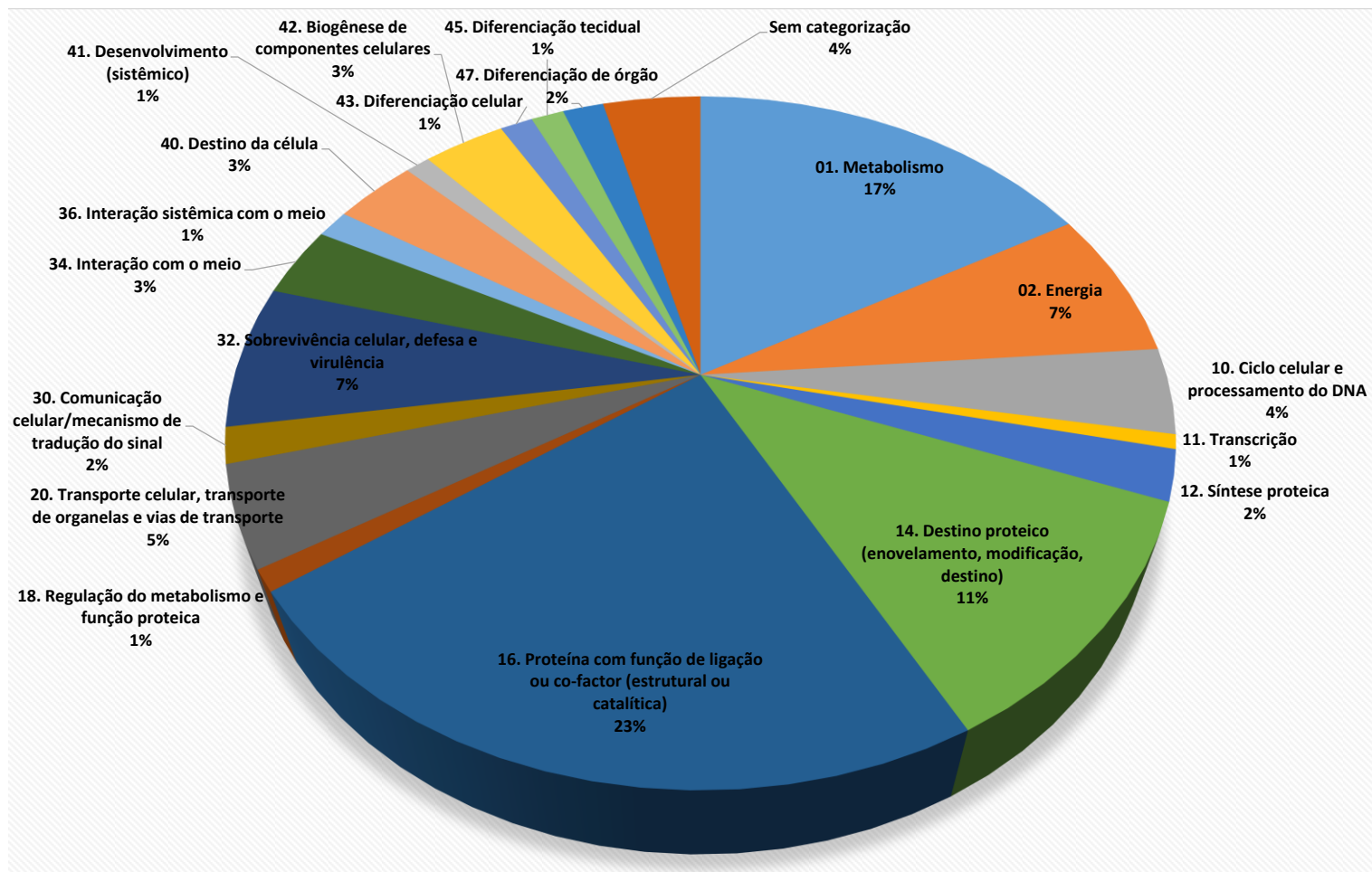


Figura 8: Categorização funcional das proteínas identificadas por Espectrometria de Massa a partir de lisado celular de B16-F10 ou Melan-a tratados ou não com a fração CMS-2. Ao todo, as proteínas 71 proteínas identificadas foram agrupadas em 19 categorias funcionais pelo banco de dados FunCat - Functional Catalogue of Proteins, MIPS – Munich Information Center for Protein Sequences (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/mfungd/index.html>).

Analisando a abundância de cada proteína identificada, considerando as comparações entre os grupos BC *versus* BT e MC *versus* BC ou BT, e agrupando tais informações com relação às categorias funcionais, podemos verificar algumas tendências de expressão (Figura 9). Por exemplo, quando comparado os grupos BC *versus* BT (Figura 9A), observa-se que a maioria (71%) se apresenta super expressa no grupo controle nas diferentes categorias funcionais, à exceção das categorias 01. Metabolismo, 02. Energia e 20. Transporte celular, transporte de organelas e vias de transporte.

Já quando comparados os grupos MC e BC (Figura 9B), vale ressaltar que a maioria das proteínas se encontra super expressa no grupo MC (58%) nas diferentes categorias funcionais. No entanto, categorias como 01. Metabolismo, 02. Energia, 14. Destino proteico (enovelamento, modificação, destino), 16. Proteína com função de ligação ou co-factor (estrutural ou catalítica), 20. Transporte celular, transporte de organelas e vias de transporte, 32. Sobrevivência celular, defesa e virulência e 40. Destino da célula, tiveram mais proteínas super expressa no grupo BC.

Na Figura 9C é apresentada a comparação entre os grupos MC *versus* BT. O grupo BT apresenta maior número de proteínas com abundância superior a MC especialmente nas categorias 01. Metabolismo, 02. Energia, 11. Transcrição, 14. Destino proteico (enovelamento, modificação, destino), 16. Proteína com função de ligação ou co-factor (estrutural ou catalítica), 20. Transporte celular, transporte de organelas e vias de transporte, 30. Comunicação celular/mecanismo de tradução do sinal, 36. Interação sistêmica com o meio e 40. Destino da célula.

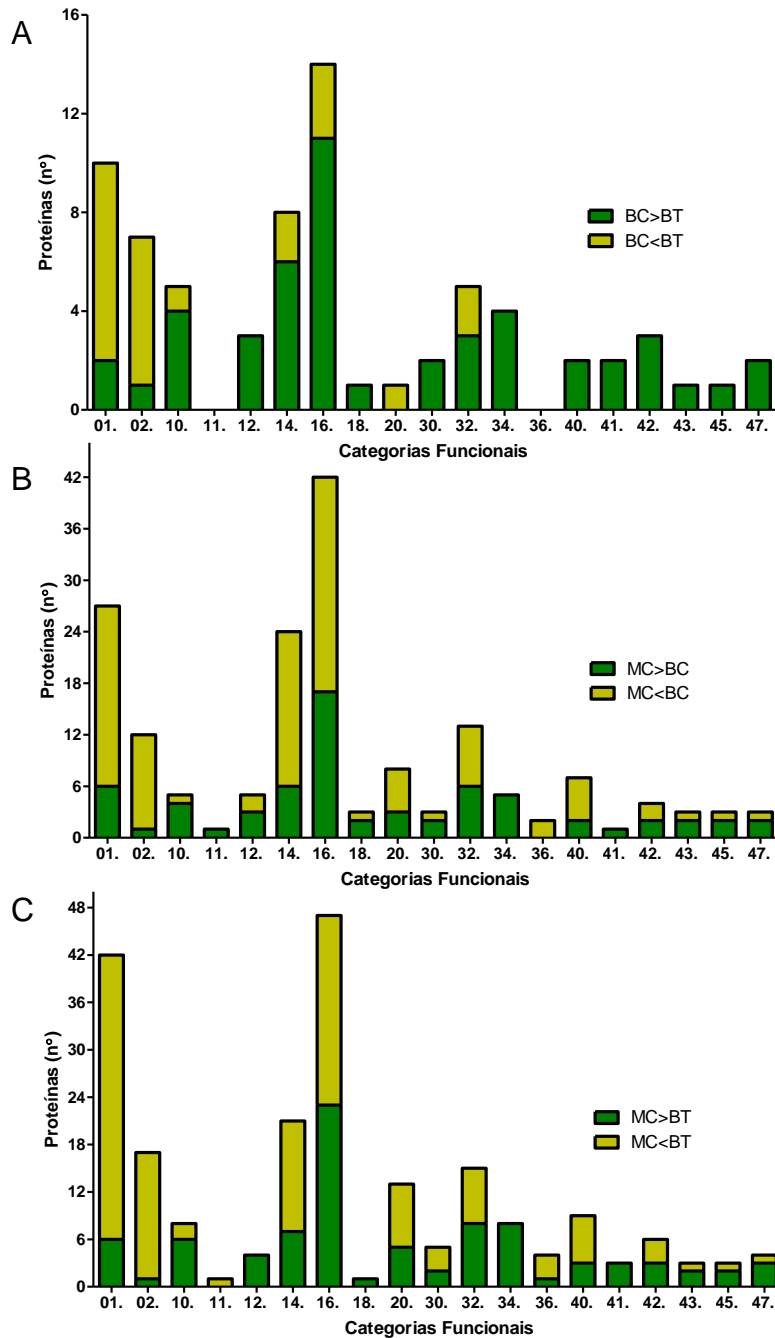


Figura 9: Comparação da abundância de expressão das proteínas organizadas nas diferentes categorias funcionais. Comparação da abundância de expressão entre os grupos (A) B16-F10 controle (BC) *versus* tratado (BT); (B) Melan-a controle (MC) *versus* BC e (C) MC *versus* BT. Categorias: 01. Metabolismo; 02. Energia; 10. Ciclo celular e processamento do DNA; 11. Transcrição; 12. Síntese proteica; 14. Destino proteico (enovelamento, modificação, destino); 16. Proteína com função de ligação ou co-fator (estrutural ou catalítica); 18. Regulação do metabolismo e função proteica; 20. Transporte celular, transporte de organelas e vias de transporte; 30. Comunicação celular/mecanismo de tradução do sinal; 32. Sobrevivência celular, defesa e virulência; 34. Interação com o meio; 36. Interação sistêmica com o meio; 40. Destino da célula; 41. Desenvolvimento (sistêmico); 42. Biogênese de componentes celulares; 43. Diferenciação celular; 45. Diferenciação tecidual e 47. Diferenciação de órgão.

As análises de predições de interações entre proteínas foram realizadas neste trabalho através do banco de dados String 9.1 (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins - <http://string-db.org>). Para isso, inicialmente, foram consideradas quatro proteínas, nucleofosmina isoforma 1, proteína de choque térmico 65, proteína ligante a calciclina e fator de iniciação da tradução eucariótica 4H, que se mostraram estatisticamente aumentadas no grupo BC em comparação com os grupos MC ou BT, mas não apresentaram diferenças entre estes dois últimos grupos (Figura 10).

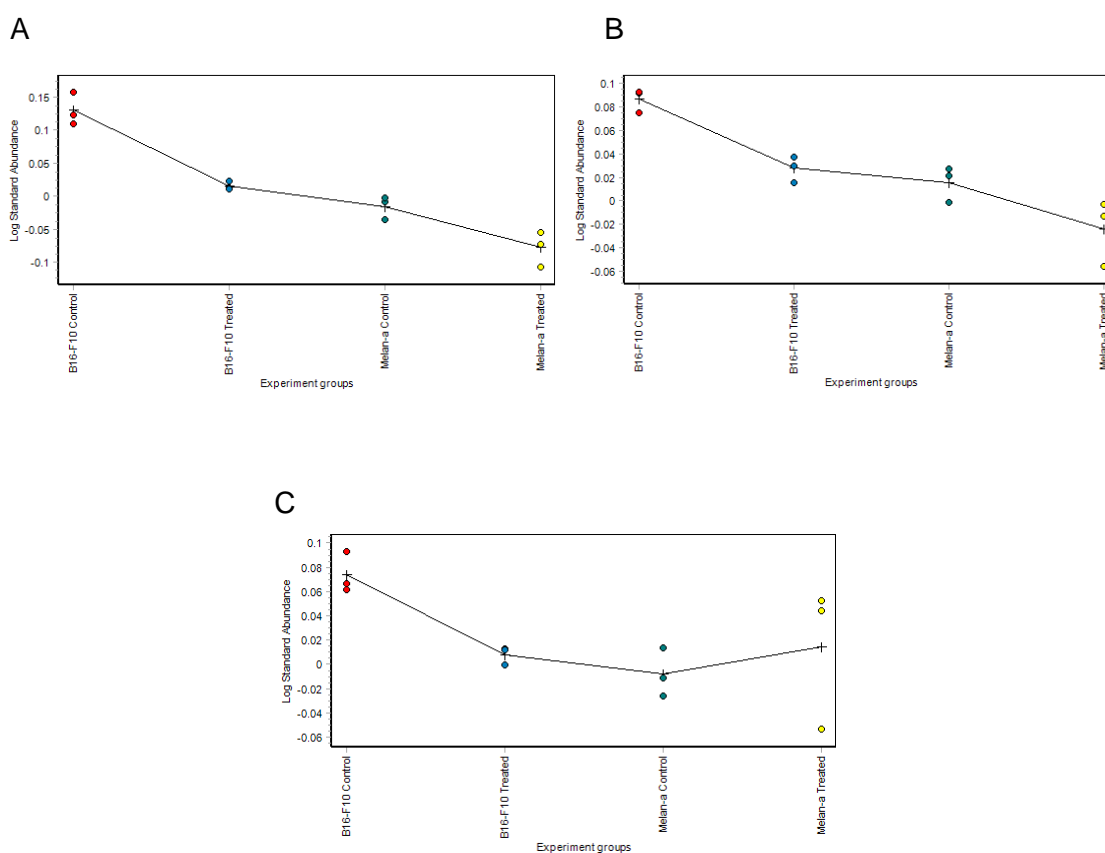


Figura 10: Quatro proteínas superexpressas em B16-F10 se igualaram aos padrões de expressão de célula normal Melan-a após o tratamento com CMS-2. Gráficos referentes à abundância de expressão dos *spots* 12 (A) - nucleofosmina isoforma 1, 14 (B) - proteína de choque térmico 65 e 18 (C) - proteína ligante a calciclina e fator de iniciação da tradução eucariótica 4H, nos grupos experimentais B16-F10 controle (vermelho) e tratado (azul) e Melan-a controle (verde) e tratado (amarelo).

Como pode ser observado na Figura 11, muitas são as possíveis interações entre as proteínas identificadas neste estudo e outras macromoléculas que possuem diversas funções celulares. Dentre essas, vale destacar as possibilidades de interação com Cdk2 (quinase dependente de ciclina 2), Caspase 3, Mapk14 (proteína quinase ativada por mitógeno 14), Trp53 (proteína 53), Cdkn2 (inibidor de quinase dependente de ciclina 2), PCNA (antígeno nuclear de célula em proliferação), MDM2 (*Murine double minute 2*), proteínas Myc e Akt, várias proteínas ribossomais, receptores do tipo Toll (TLR) isoformas 1, 2, 4 e 6 e várias proteínas de choque térmico. A lista completa de proteínas presentes na rede de interação se encontra no Anexo 2.

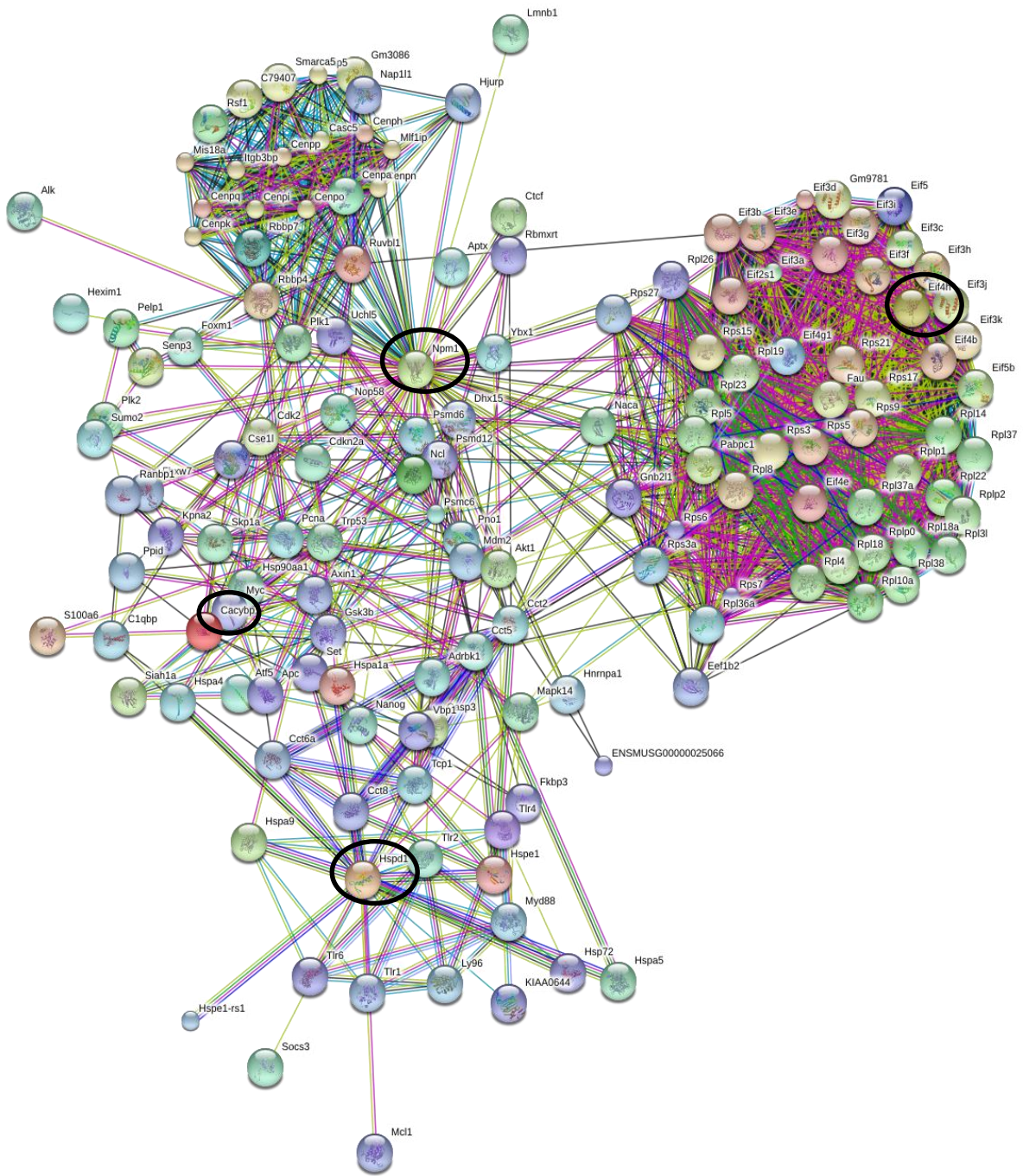


Figura 11: Rede de interações entre proteínas identificadas que apresentaram abundância diferentemente significativa entre os grupos B16-F10 controle *versus* Melan-a controle ou B16-F10 tratado, sem diferenças entre os grupos Melan-a controle *versus* B16-F10 tratado. As predições das possíveis interações foram realizadas através do banco de dados String 9.1 (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins - <http://string-db.org>). As proteínas circuladas em vermelho foram identificadas neste trabalho: Nucleofosmina isoforma 1(Npm1); Proteína de choque térmico 65 (Hspd1); Proteína ligante a calciclina (Cacybp) e Fator de iniciação da tradução eucariótica 4H (Eif4h).

Em seguida, na Figura 12, são apresentadas as proteínas que se mostraram diferentemente expressas quando comparados os grupos BT *versus* BC e BT *versus* MC, não sendo diferentes BC e MC. Essa comparação foi realizada com o intuito de se entender o efeito do tratamento de CMS-2, independente da linhagem celular. Observa-se que as proteínas enolase 1 (alfa) e cofilina-1 se apresentaram com expressão reduzida após o tratamento com CMS-2, enquanto que triosefosfato isomerase, 1-cis peroxirredoxina, fosfoglicerato mutase 1, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e glutathiona S-transferase P 1 se mostraram aumentadas.

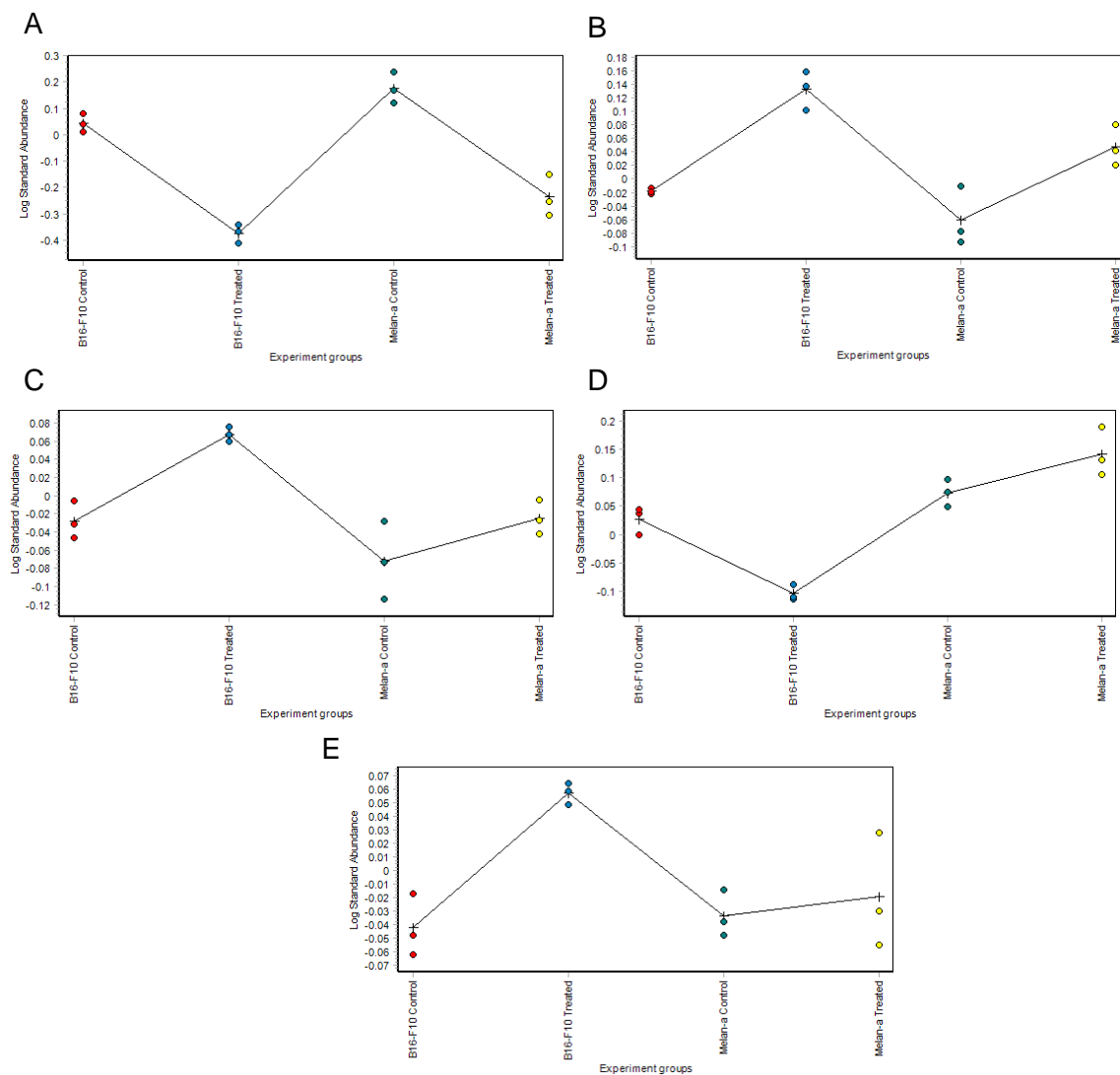


Figura 12: Sete proteínas apresentaram expressão alterada após o tratamento com CMS-2, independentemente da comparação ser feita com a linhagem normal ou tumoral. Gráficos referentes à abundância de expressão dos *spots* 2 (A) - enolase 1, (alfa), 7 (B) - triosefosfato isomerase e 1-cis peroxirredoxina, 8 (C) - fosfoglicerato mutase 1, 9 (D) cofilina-1 e 13 (E) gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e glutathiona S-transferase P 1, nos grupos experimentais B16-F10 controle (vermelho) e tratado (azul) e Melan-a controle (verde) e tratado (amarelo).

Para a construção da rede predição de interação entre proteínas, a enolase 1, (alfa), triosefosfato isomerase, 1-cis peroxirredoxina, fosfoglicerato mutase 1, cofilina-1, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e glutathione S-transferase P 1 foram submetidas à análise no banco de dados String 9.1 (Figura 13). Proteínas como várias glutathione peroxidases, sintetases e redutases, glutamil-transferases, várias subfamílias do citocromo p450, receptor de fator de crescimento epidermal (EGFR), MAPK, p53, Myc, Akt, caspase 3, Hras, TLR, interleucina (Il) 2 e 6, fator de necrose tumoral (TNF), fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) podem também ser moduladas pela ação do tratamento com CMS-2, visto que estas se encontraram na rede de predição de interação. A lista completa de proteínas presentes na rede de interação se encontra no Anexo 3.

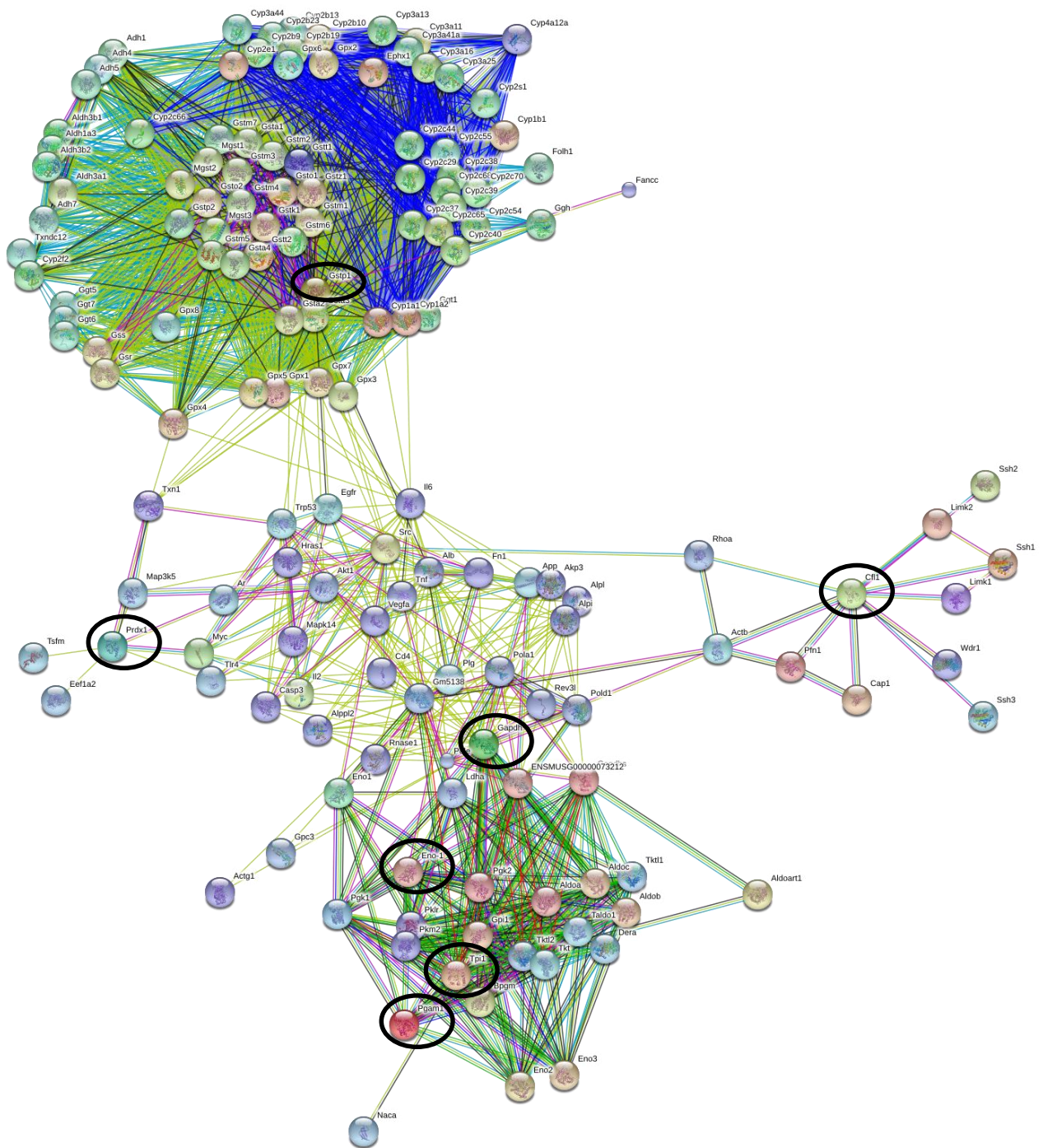


Figura 13: Rede de interações entre proteínas identificadas que apresentaram abundância diferentemente significativa entre os grupos B16-F10 tratado *versus* Melan-a ou B16-F10 controles, sem diferenças entre os grupos Melan-a *versus* B16-F10 controles. As predições das possíveis interações foram realizadas através do banco de dados String 9.1 (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins - <http://string-db.org>). As proteínas circuladas em vermelho foram identificadas neste trabalho: Enolase 1, (alfa) (Eno1), Triosefosfato isomerase (Tpi1), 1-Cis peroxirredoxina (Prdx1), Fosfoglicerato mutase 1 (Pgam 1), Cofilina-1 (Cfl1), Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (Gapdh) e Glutaciona S-transferase P 1 (Gstp1).

Também as proteínas que se encontraram diferentemente expressas somente na comparação entre BC *versus* BT, sem diferenças estatísticas entre BC e MC ou MC *versus* BT (Figura 14), foram submetidas à análise de predição de interação. Observa-se que as proteínas de choque térmico 65 e 70 cognata e beta-actina (aa 27-375), putativo se apresentaram com expressão reduzida após o tratamento com CMS-2, enquanto que gama e beta-actina (aa 27-375), putativo, piruvato quinase M e proibitina 1 se mostraram aumentadas.

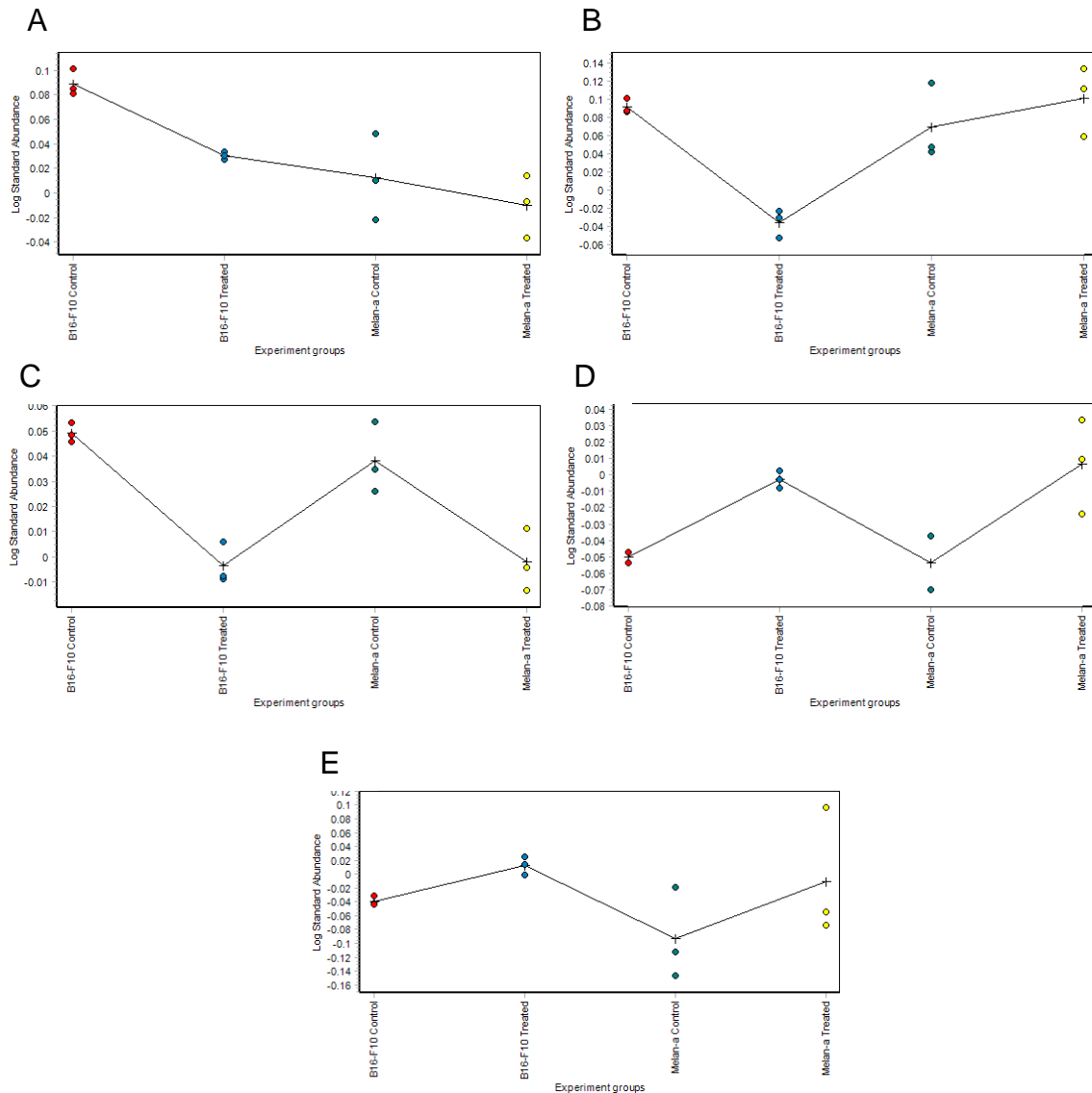


Figura 14: Seis proteínas apresentaram expressão alterada após o tratamento com CMS-2 somente quando comparado à linhagem tumoral. Gráficos referentes à abundância de expressão dos spots 3 (A) - Proteína de choque térmico 65, beta-actina (aa 27-375), putativo, 4 (B) - proteína de choque térmico 70 cognata, 6 (C) gama e beta-actina (aa 27-375), putativo, 10 (D) - piruvato quinase M e 20 (E) - proibitina, nos grupos experimentais B16-F10 controle (vermelho) e tratado (azul) e Melana controle (verde) e tratado (amarelo).

Proteína de choque térmico 65, beta-actina (aa 27-375), putativo, proteína de choque térmico 70 cognata, gama-actina, piruvato quinase M e proibitina foram submetidas ao software String 9.1, o que gerou a seguinte lista de possíveis interações com promissor potencial: caspase 3, proteína quinase C (PKC), várias isoformas de adenilato ciclase e de polimerase, MAPK, várias integrinas, TLR 1, 4 e 6, e catenina (Figura 15). A lista completa de proteínas presentes na rede de interação se encontra no Anexo 4.

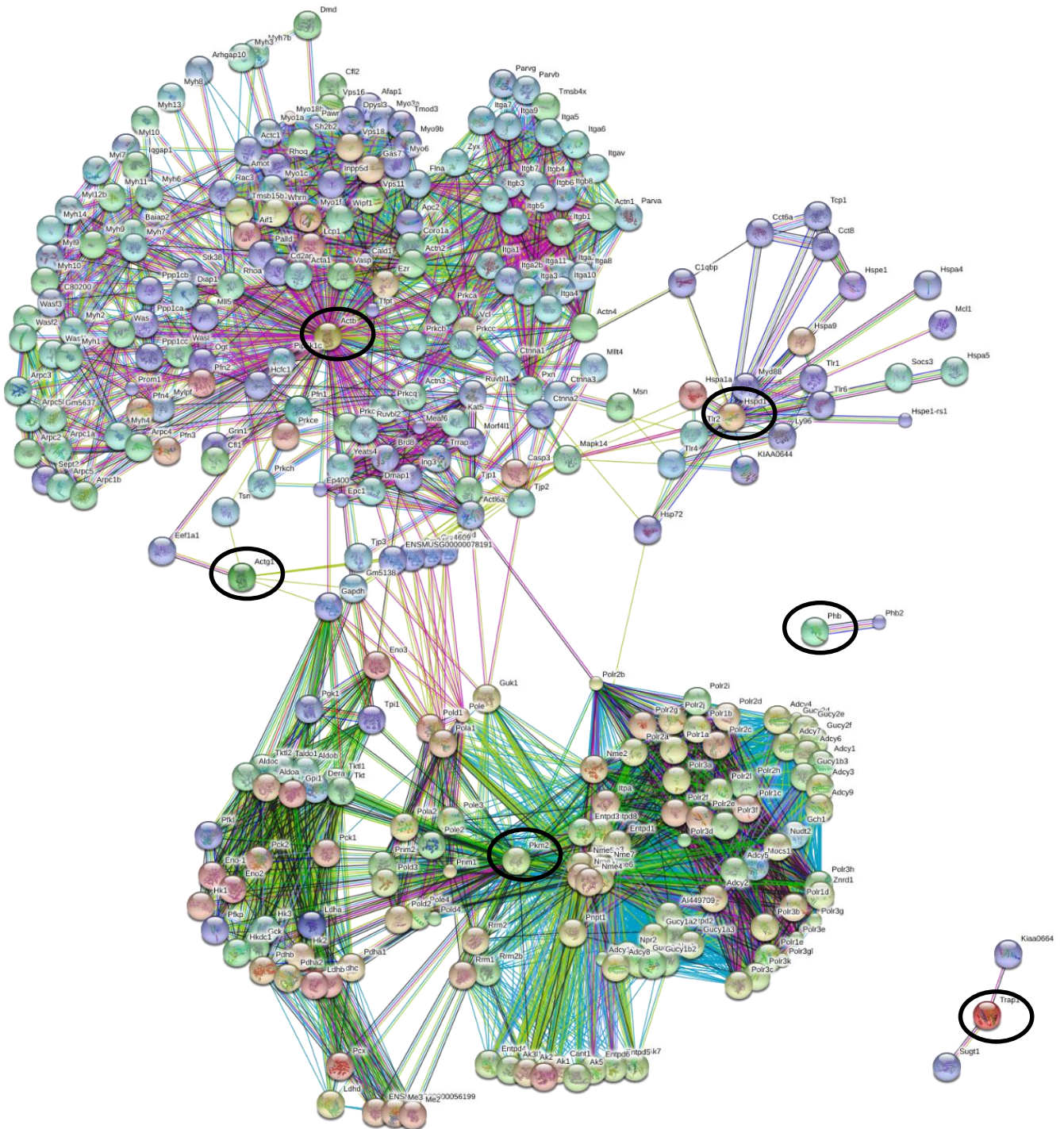
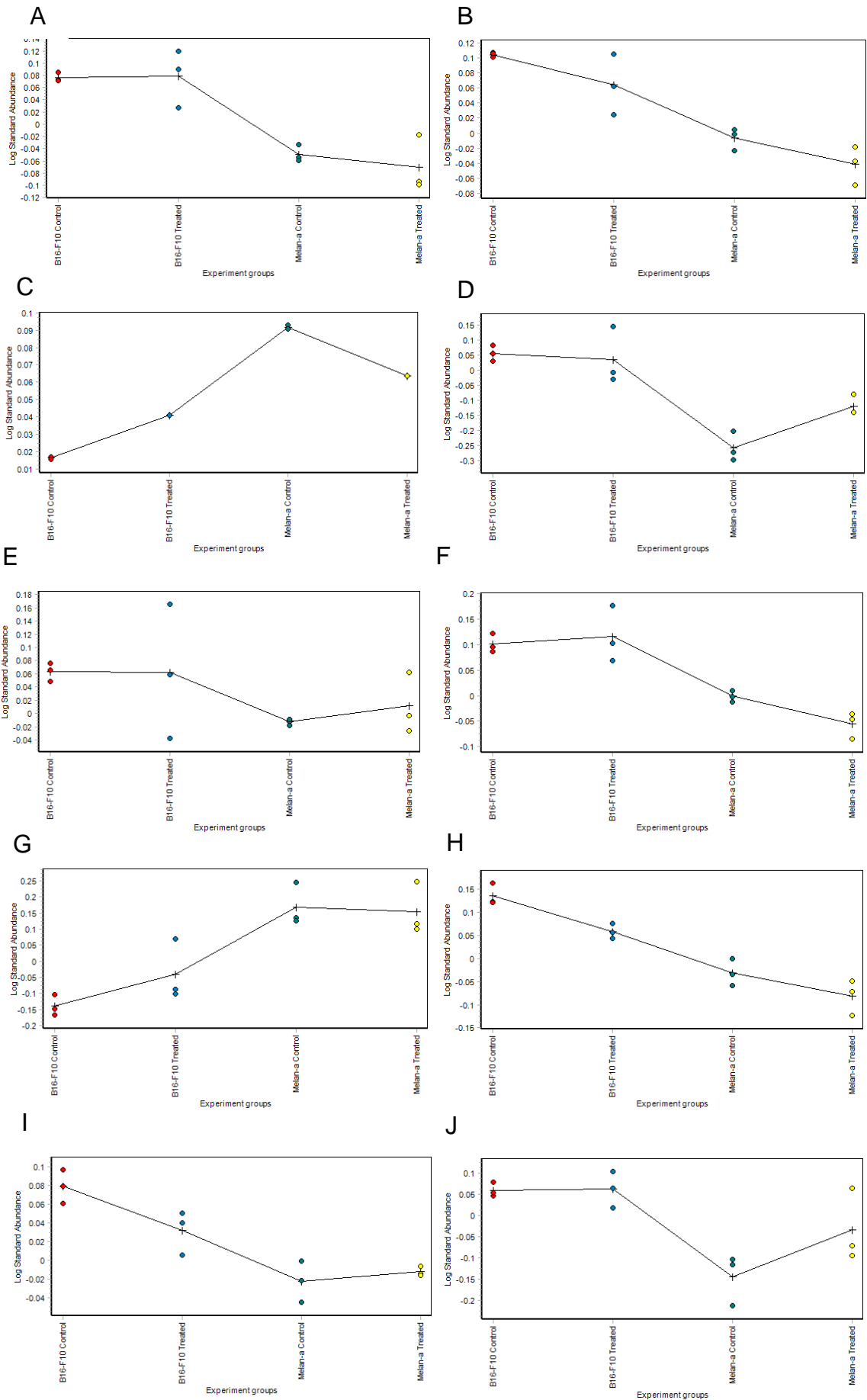


Figura 15: Rede de interações entre proteínas identificadas que apresentaram abundância diferentemente significativa entre os grupos B16-F10 controle e tratado, sem diferenças entre os grupos Melan-a controle versus B16-F10 controle ou tratado. As predições das possíveis interações foram realizadas através do banco de dados String 9.1 (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins - <http://string-db.org>). As proteínas circuladas em vermelho foram identificadas neste trabalho: Proteína de choque térmico 65 (Hspd1), Beta-actina (aa 27-375), putativo (Actb), Proteína de choque térmico 70 cognata (Trap1), Gama-actina (Actg1), Piruvato quinase M (Pkm2) e Proibitina (Phb).

Por último, uma avaliação de predição de interação entre proteínas foi realizada considerando as mesmas que se encontraram diferentemente expressas entre Melan-a *versus* B16-F10 controles, sem diferenças promovidas com o tratamento com CMS-2 (Figura 16). Dessas, as proteínas que se encontraram mais expressas em BC, quando comparado com MC, foram: Enolase 1, (alfa), Proteína precursora de dissulfeto-isomerase A3, alfa-fetoproteína parcial, D-dopacromo decarboxilase, Inibidor da dissociação de guanosina difosfato (GDP) 2, Fosfoglicerato quinase, Nucleofosmina isoforma 1, peptidil-prolil cis-trans isomerase A, precursor da calreticulina, gama e beta-actina (aa 27-375), putativo e fator de iniciação da tradução eucariótica 3, subunidade F. Já o fator de alongação 1-delta, Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, Proteína de choque térmico 70 cognata, piruvato quinase M, NEDD8 precursor e Vimentina se encontraram diminuídos em BC.



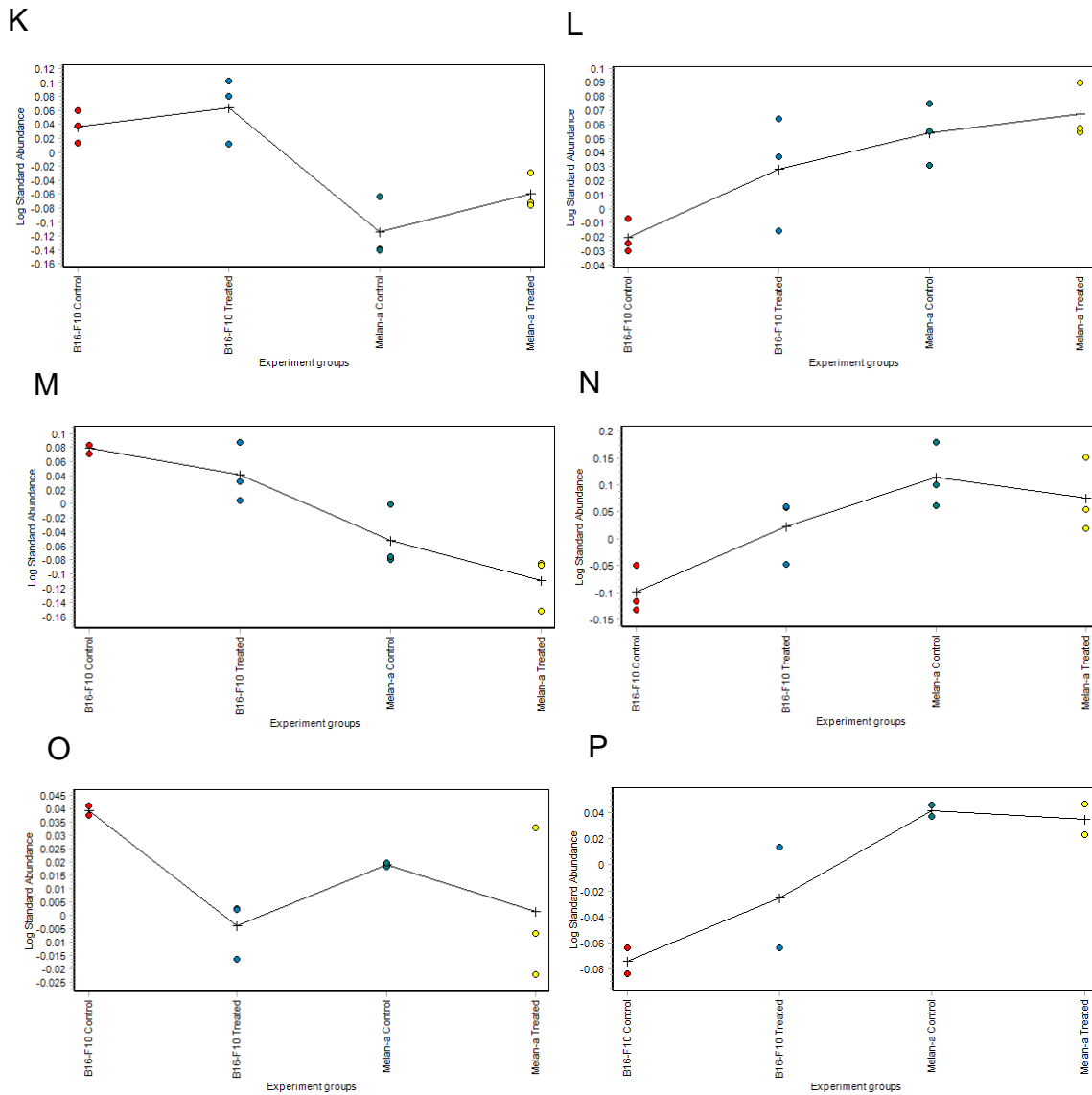


Figura 16: Proteínas diferentemente expressas entre MC e BC e que foram parcialmente moduladas pelo tratamento com CMS-2. Gráficos referentes à abundância de expressão dos spots 27 (A) - Enolase 1, (alfa), 30 (B)- Proteína precursora de dissulfeto-isomerase A3, alfa-fetoproteína parcial, 31 (C)- Fator de alongação 1-delta, 36 (D) - D-dopacromo decarboxilase, 40 (E)- Inibidor da dissociação de guanosina difosfato (GDP) 2, 44 (F)- Fosfoglicerato quinase, 46 (G)- Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, Proteína de choque térmico 70 cognata, 53 (H)- Nucleofosmina isoforma 1, 58 (I)- peptidil-prolil cis-trans isomerase A, 68 (J) , 71 (K)- Fosfoglicerato quinase, 79 (L)- piruvato quinase M, 80 (M)- Nucleofosmina isoforma 1 e precursor da calreticulina, 81 (N)- NEDD8 precursor, 84 (O)- gama-actina, Beta-actina (aa 27-375), putativo, Fator de iniciação da tradução eucariótica 3, subunidade F e 85 (P)- Vimentina. Os grupos experimentais são: B16-F10 controle (vermelho) e tratado (azul) e Melan-a controle (verde) e tratado (amarelo).

Dentre várias interações apresentadas na Figura 17, vale destacar as possíveis com Caspases 6 e 8, caderina 1 e 2, CDK 1 e 2, PKC, Akt, Stat 3, interleucina 2, adenilato e guanilato ciclasas, Trp53, fibronectina 1, integrinas, fator de crescimento transformante beta 1 (TGF β) e óxido nítrico sintase 3 (NOS3). A lista completa de proteínas presentes na rede de interação se encontra no Anexo 5.

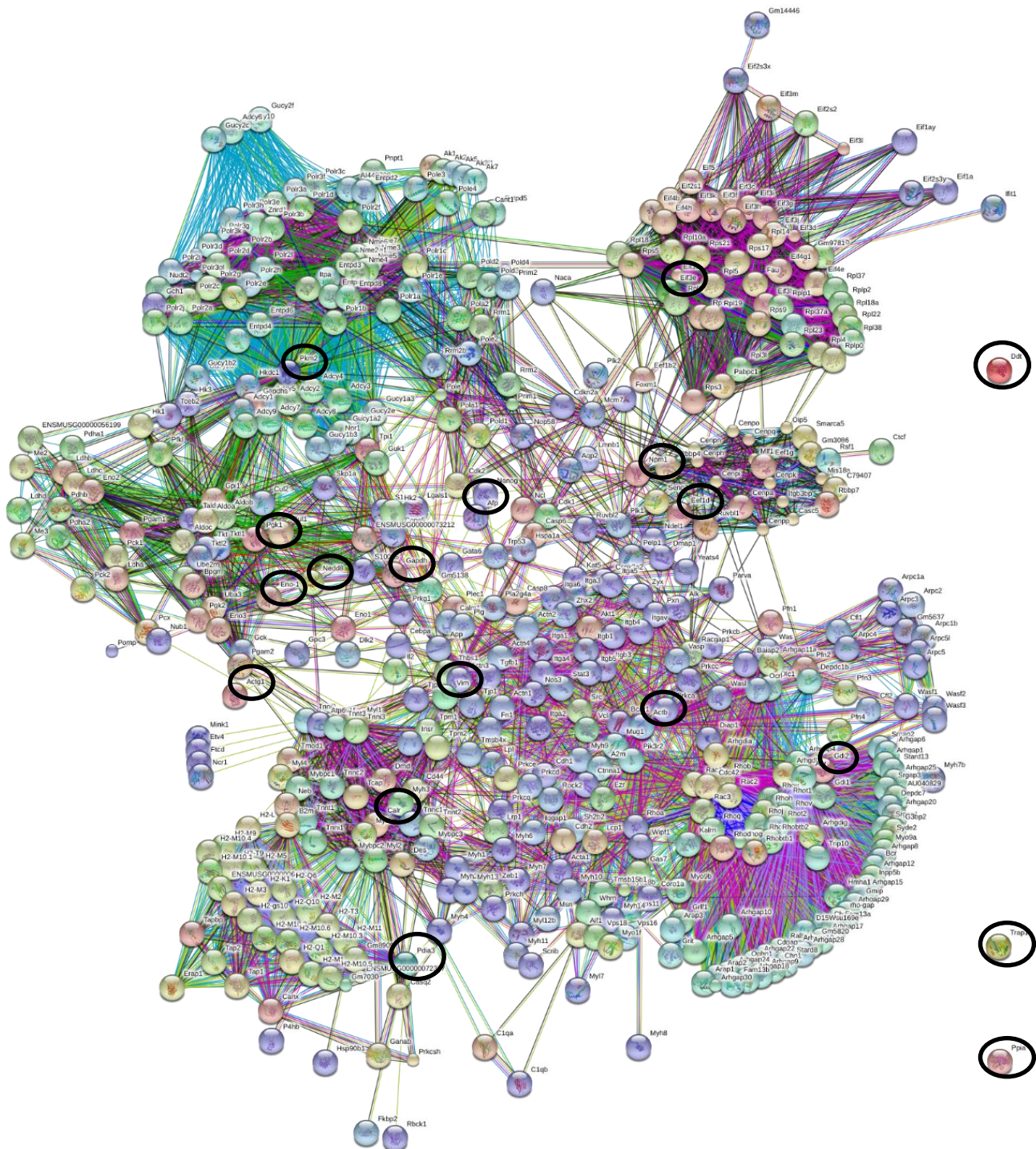


Figura 17: Rede de interações entre proteínas identificadas que apresentaram abundância diferentemente significativa entre os grupos Melan-a versus B16-F10 controles, sem diferenças entre os grupos B16-F10 tratado versus Melan-a ou B16-F10 controles. As predições das possíveis interações foram realizadas através do banco de dados String 9.1 (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins - <http://string-db.org>). As proteínas circuladas em vermelho foram identificadas neste trabalho: Enolase 1, (alfa) (Eno1), Proteína precursora de dissulfeto-isomerase A3 (Pdia3), Fator de alongação 1-delta (Eef1d), D-dopacromo descarboxilase (Ddt), Inibidor da dissociação de guanosina difosfato (GDP) 2 (Gdi2), Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (Gapdh), Proteína de choque térmico 70 cognata (Trap1), Nucleofosmina isoforma 1 (Npm1), peptidil-proil cis-trans isomerase A (Ppia), Cadeia E, Citocromo C Oxidase no estado de oxidação completa, Fosfoglicerato quinase (Pkg1), piruvato quinase M (Pkm2), precursor da calreticulina (Calr), NEDD8 precursor(Nedd8), gama-actina (Actg1), Beta-actina (aa 27-375), putativo (Actb), Fator de iniciação da tradução eucariótica 3, subunidade F (Eif3e) e Vimentina (Vim).

A Figura 18 sintetiza o efeito de CMS-2 na modulação da expressão de proteínas na linhagem B16-F10 e apresenta possíveis outros alvos moleculares identificados pela rede de interação entre proteínas.

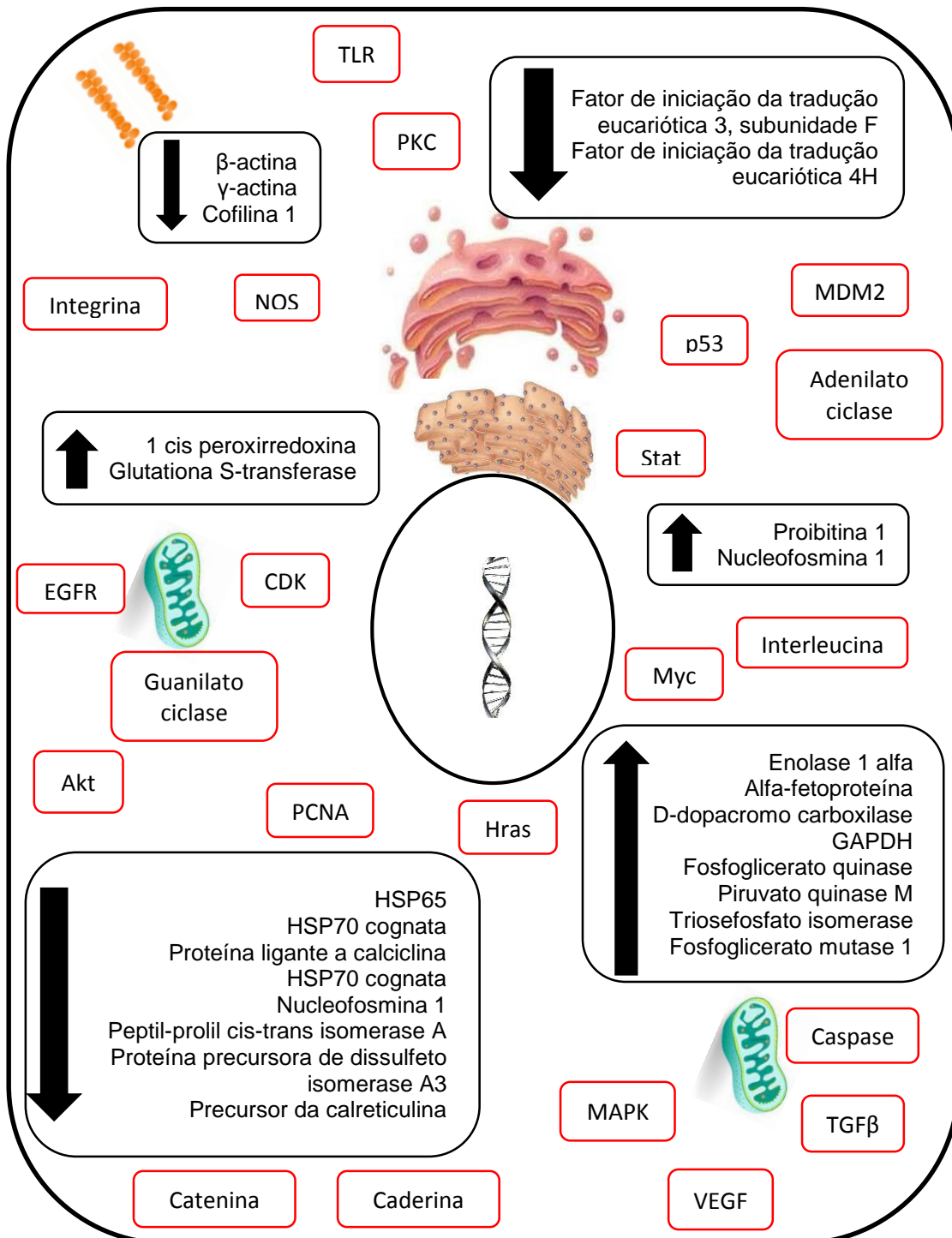


Figura 18: Proteínas expressas em B16-F10 que foram moduladas pelo tratamento com CMS-2. As proteínas circuladas em preto foram identificadas neste trabalho, onde as setas para cima e para baixo indicam super ou redução da expressão após o tratamento com CMS-2, enquanto que as circuladas em vermelho foram indiretamente identificadas via predições de possíveis interações entre proteínas, através do banco de dados String 9.1 (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins - <http://string-db.org>).

5.4 Efeitos celulares promovidos por CMS-2 em linhagens celulares de melanoma metastático B16-F10 e melanócito Melan-a.

Considerando a diversidade de proteínas que se mostraram diferentemente expressas entre BC *versus* BT, BC *versus* MC e MC *versus* BT que estão relacionadas com eventos biológicos conhecidamente importantes para o desencadeamento e desenvolvimento tumoral, tais como a proliferação, diferenciação e migração celular, no presente trabalho foram feitas avaliações do efeito de CMS-2 nestes eventos.

Inicialmente, a fração CMS-2 foi avaliada quanto à capacidade de alterar a síntese de DNA, verificado através da técnica de incorporação de BrdU (análogo de pirimidina). Conforme ilustrado na Figura 19, qualquer das concentrações avaliadas de CMS-2 não interfere na proliferação celular induzida por 5% de FBS. Já na linhagem Melan-a, a incorporação de BrdU se mostrou estatisticamente diminuída, em relação ao controle, após o tratamento com CMS-2 em todas as concentrações avaliadas, chegando a concentração de 10,0 µg/mL a se equiparar à ausência de FBS.

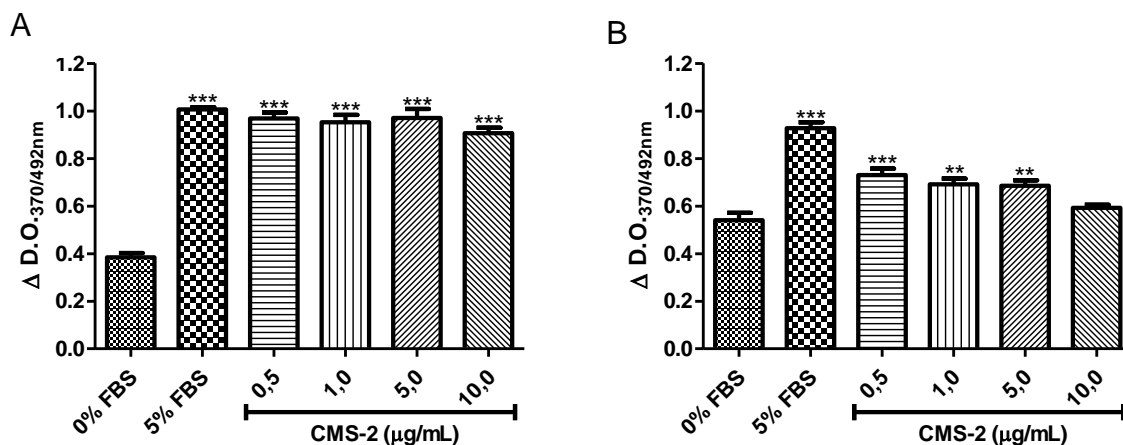


Figura 19: Avaliação da proliferação celular após tratamento com CMS-2. Células B16-F10 (A) e Melan-a (B) foram semeadas em placas de 96 poços, na densidade de 1×10^4 células/poço, e após adesão, foram carenciadas da presença de FBS por 24h. Após esse período, as células foram expostas às amostras de CMS-2, em meio RPMI suplementado com 5% de FBS, juntamente com o BrdU. As células foram processadas 24h após a adição do marcador, seguindo o protocolo do fabricante (Cell proliferation kit, Roche). O produto da reação foi quantificado espectrofotometricamente (370 e 492 nm). ** ou *** indicam resultados diferentes estatisticamente do controle 0% de FBS, com $p < 0,01$ e $0,001$, respectivamente (ANOVA seguida de pós-teste Bonferroni).

A senescência também foi avaliada nas linhagens celulares estudadas sobre o efeito do tratamento com CMS-2, através da verificação de um dos marcadores desse evento celular, a atividade da enzima β -galactosidase em pH 6,0. Na Figura 20 é possível observar que o número de células positivas para esse marcador é reduzido (menos de 3,5% do total de células no campo) nas imagens referentes ao grupo controle negativo (5% de FBS) e CMS-2 10 μ g/mL, ao contrário da imagem do grupo controle positivo (2h de exposição a H_2O_2 , 5 ou 10 μ M, para Melan-a e B16-F10, respectivamente), onde se observa um número maior de células coradas em verde (mais de 30%), especialmente na linhagem B16-F10.

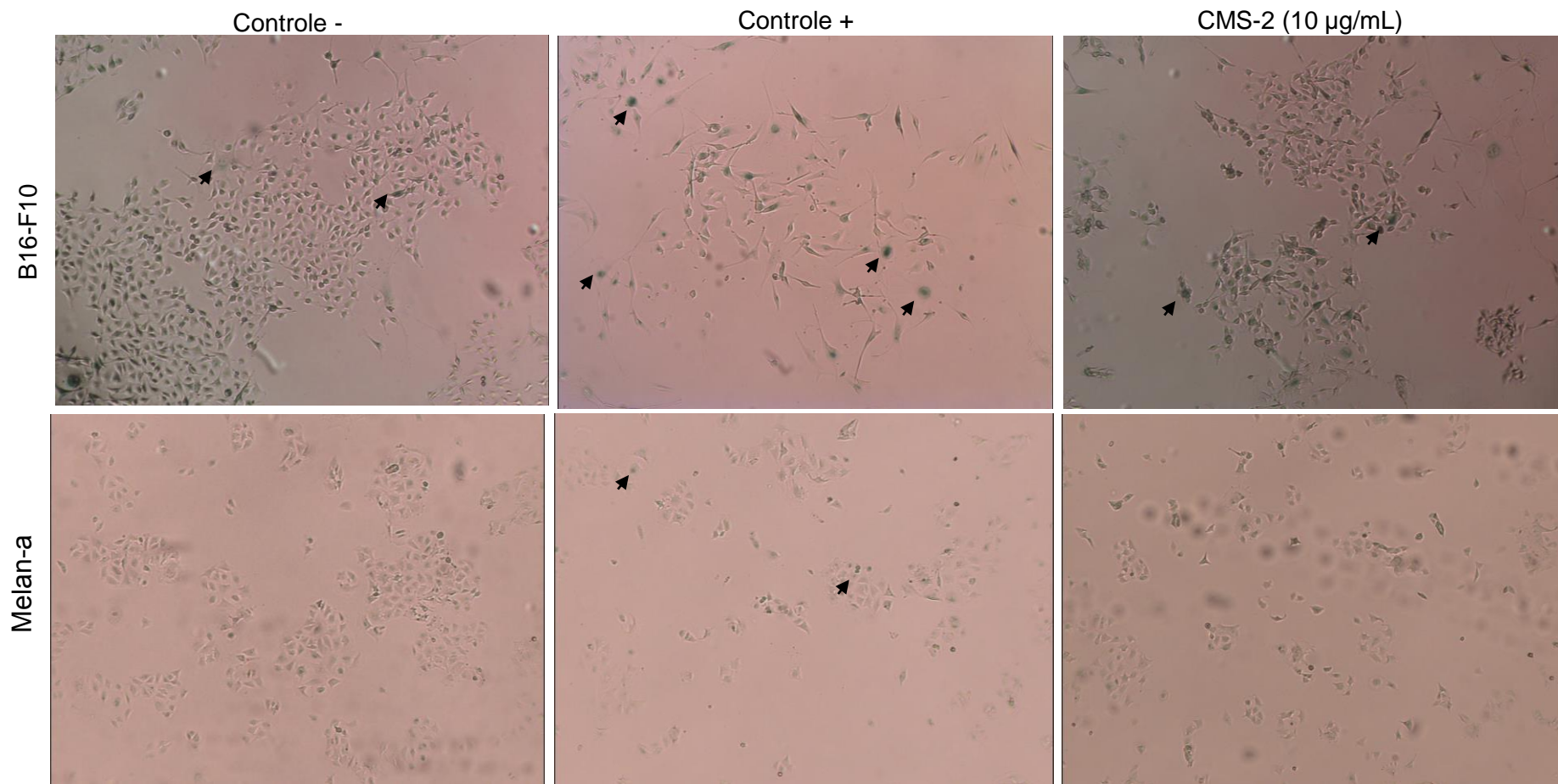


Figura 20: Avaliação da atividade da enzima β -galactosidase após exposição das linhagens B16-F10 e Melan-a a CMS-2. Células das linhagens B16-F10 e Melan-a foram semeadas em placas de 6 poços ($2,5 \times 10^4$ ou $7,5 \times 10^4$ células/poço, respectivamente) e, após adesão, o meio de cultura foi substituído por outro contendo as amostras. Após 72h de exposição, as células foram lavadas, fixadas, e seguiu-se com o procedimento de marcação da enzima β -galactosidase, conforme o fabricante (Cell Signaling). Controle -: FBS 5%; Controle +: H_2O_2 5 ou 10 μM , para Melan-a ou B16-F10, respectivamente, CMS-2 10 $\mu\text{g/mL}$. As setas indicam células positivas para β -Galactosidase.

Como avaliação do efeito de CMS-2 na melanogênese, foi determinada a quantidade de melanina e a atividade da principal enzima envolvida na produção desta última, a tirosinase. Como pode ser visto na Figura 21A, CMS-2 nas concentrações de 5,0 e 10,0 $\mu\text{g/mL}$ foi capaz de aumentar o conteúdo de melanina presente nos lisados celulares de B16-F10 após 24h de exposição. Já na linhagem de melanócito (Melan-a), o conteúdo de melanina se mostrou aumentado em todas as concentrações avaliadas de CMS-2, após 24h de exposição (Figura 21B).

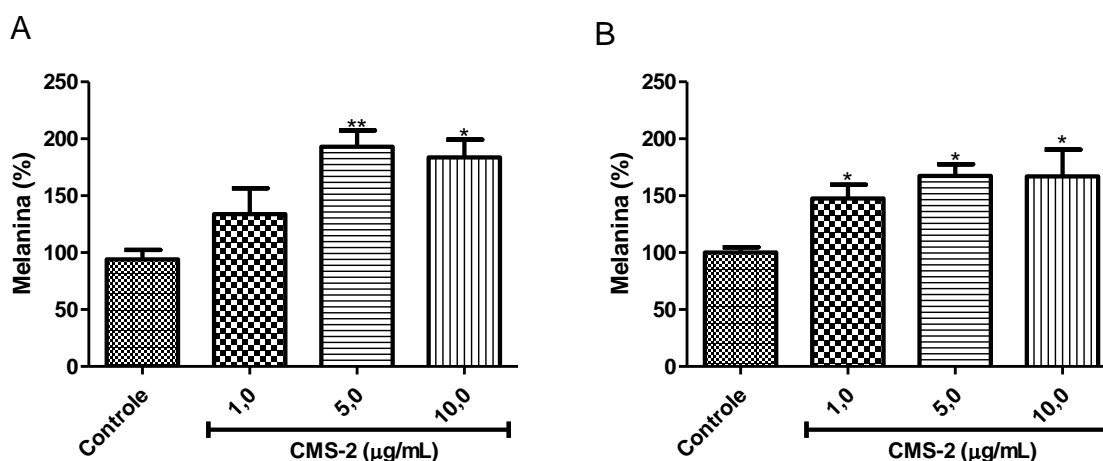


Figura 21: Efeito de CMS-2 na produção de melanina em melanoma B16-F10 e melanócito Melan-a. Células B16-F10 (A) e Melan-a (B) foram semeadas em placas de 6 poços ($2,0 \times 10^5$ células/poço) e após adesão, foram expostas por 24h a CMS-2 (1,0 – 10 $\mu\text{g/mL}$). A monocamada foi lavada com PBS e as células lisadas com NaOH 1M. Os lisados foram incubados a 80°C por 2h, sonificados e a absorbância do corante dissolvido foi determinada a 405 nm. Os dados foram normalizados considerando 100% de Melanina os valores dos controles. * e ** indicam resultados diferentes estatisticamente do controle, com $p < 0,05$ ou 0,01, respectivamente (ANOVA seguida de pós-teste Student Newman Keuls).

A atividade da enzima tirosinase também se mostrou aumentada após o tratamento com 10,0 $\mu\text{g/mL}$ de CMS-2 por 24h, tanto na linhagem celular de melanoma B16-F10 (Figura 22A), quanto no melanócito Melan-a (Figura 22B).

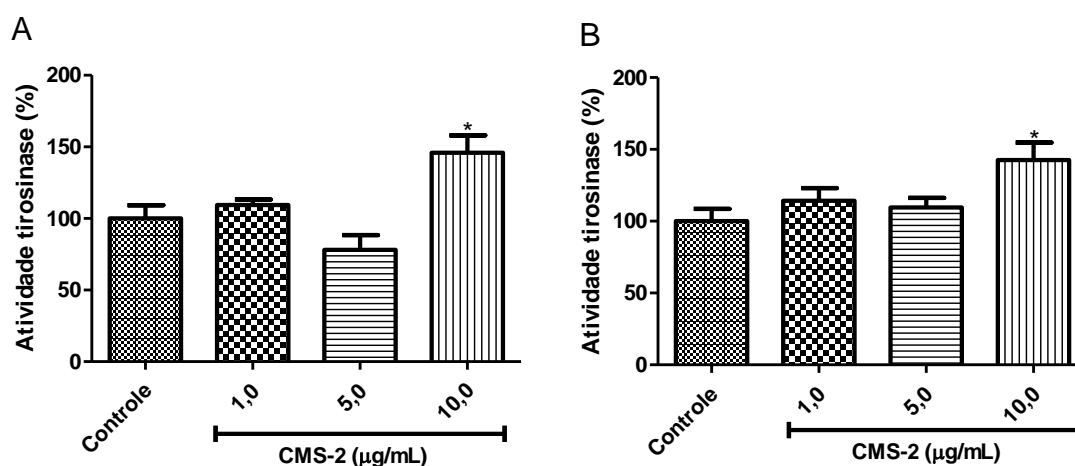


Figura 22: Efeito de CMS-2 na atividade de tirosinase em melanoma B16-F10 e melanócito Melan-a. Células B16-F10 (A) e Melan-a (B) foram semeadas em placas de 6 poços ($2,0 \times 10^5$ células/poço) e após adesão, foram expostas por 24h a CMS-2 (1,0 – 10 µg/mL). A monocamada foi lavada com PBS e as células lisadas com 1% de Triton X-100 em PBS. Os lisados foram incubados a 37°C por 2h com solução contendo L-dopa (2 mg/mL) e a absorbância do produto da reação foi determinada a 405 nm. Os dados foram normalizados considerando 100% de atividade tirosinase os valores dos controles. * indicam resultados diferentes estatisticamente do controle, com $p < 0,05$ (ANOVA seguida de pós-teste Student Newman Keuls).

Na presença de CMS-2, foi avaliada a capacidade de migração das linhagens celulares B16-F10 e Melan-a pelo método *in vitro Scratch Assay*. Como pode ser observado na Figura 23, CMS-2, nas concentrações de 7,5 e 10,0 µg/mL impediu a migração de células B16-F10 em todos os tempos avaliados (Figura 23B). O mesmo efeito foi observado na linhagem Melan-a (Figura 24B). Já quando as células foram expostas ao tratamento juntamente com um inibidor de proliferação celular (na menor concentração que promove a inibição da mitogênese sem promover morte celular), observa-se que todas as concentrações testadas de CMS-2 inibiram a migração celular (Figura 25B) em B16-F10. Imagens representativas da migração, às 8 e 48h de avaliação, são apresentadas nas Figuras 23A, 24A e 25A.

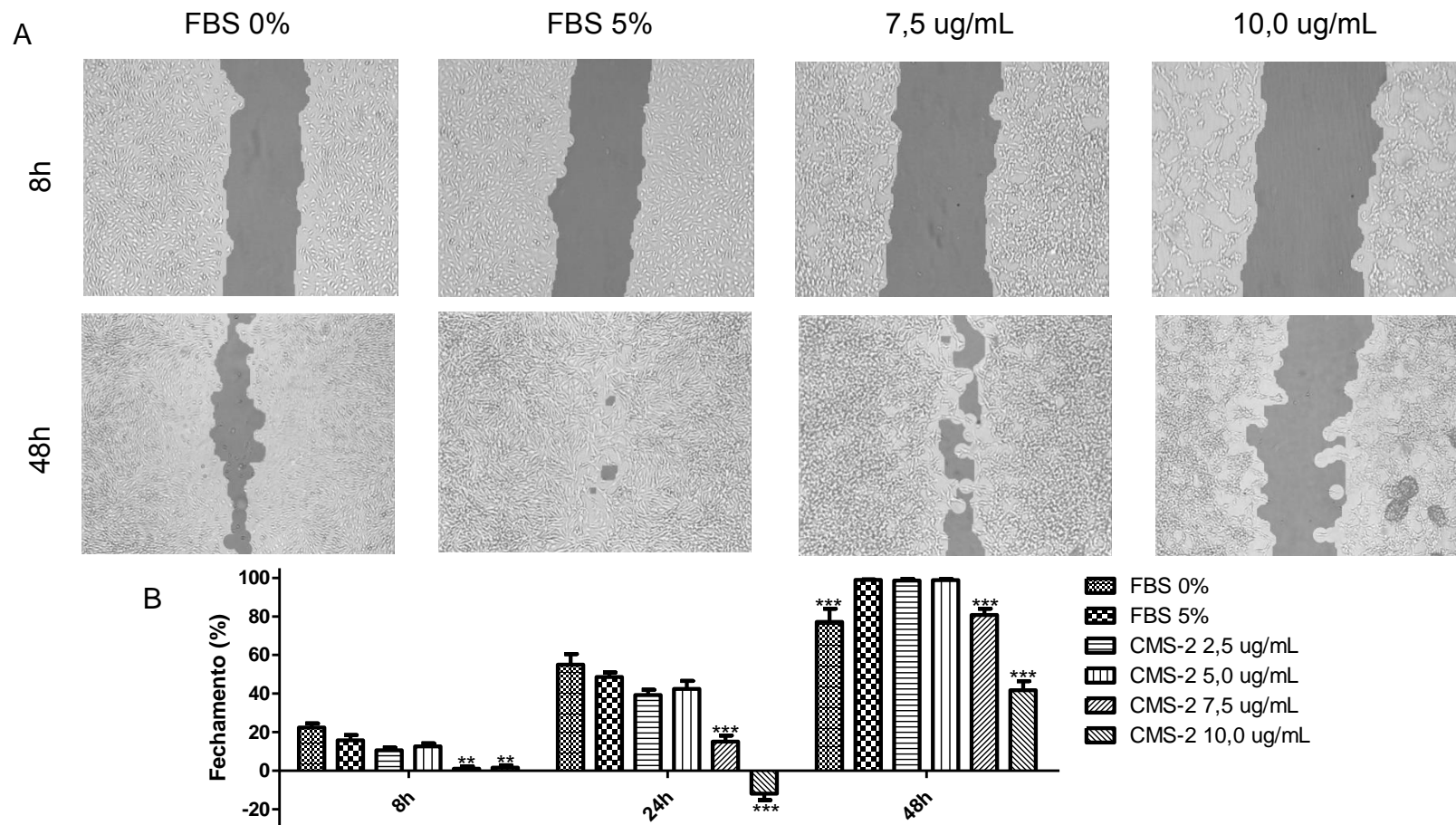


Figura 23: Efeito inibitório da migração *in vitro* de CMS-2 sobre células B16-F10. Na monocamada de B16-F10 foi feita uma lesão e as células foram tratadas com CMS-2 (2,5-10,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Fotos da fenda formada foram tomadas às 8 e 48h (A). A área da lesão foi medida em diferentes tempos utilizando o programa *TScratch* (B). Os resultados são apresentados como fechamento (%). ** ou*** indicam resultados estatisticamente diferentes do controle, com $p < 0,01$ e $0,001$ respectivamente (2-way *Anova*, pós-teste Bonferroni).

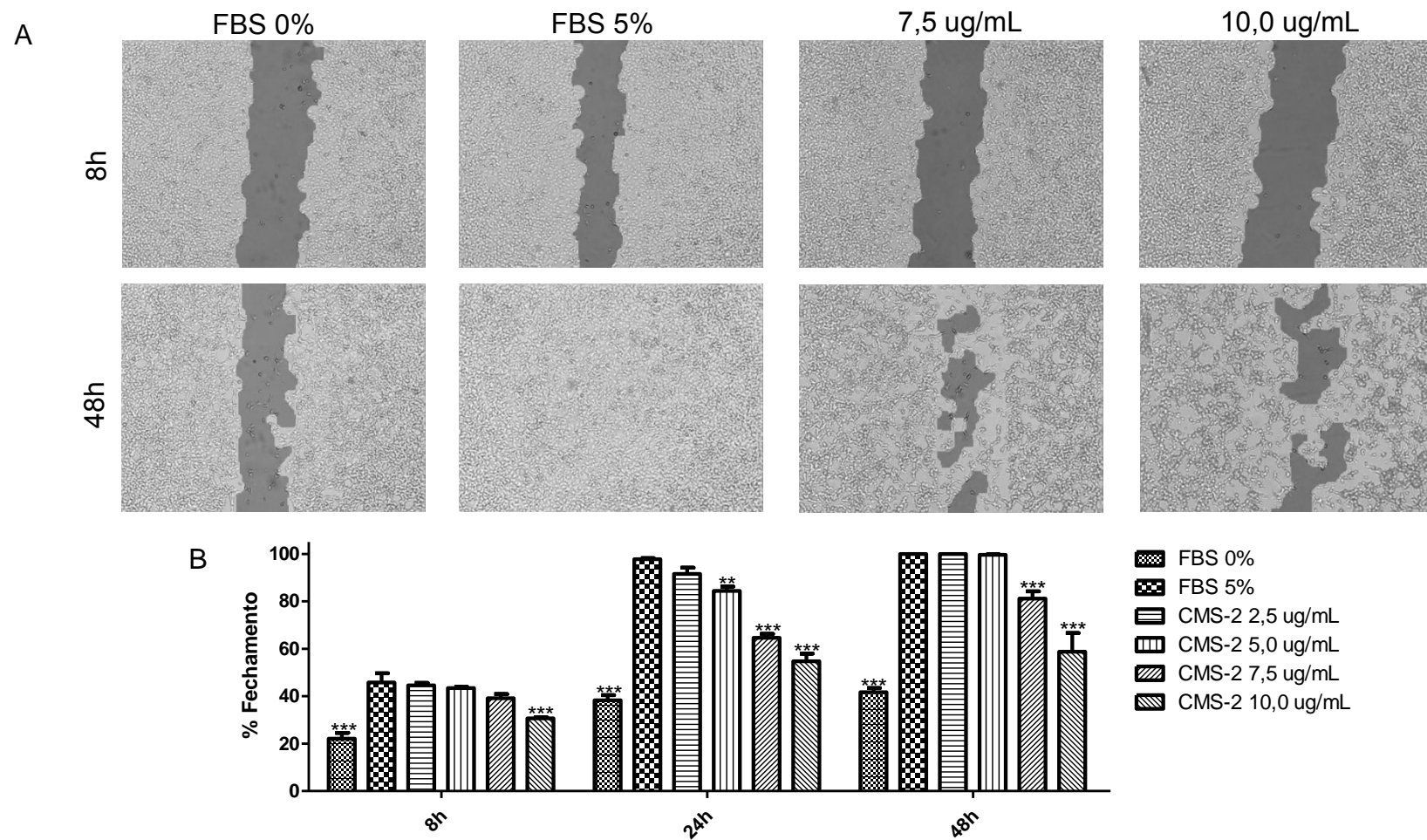


Figura 24: Efeito inibitório da migração *in vitro* de CMS-2 sobre células Melan-a. Na monocamada de Melan-a foi feita uma lesão e as células foram tratadas com CMS-2 (2,5-10,0 $\mu\text{g/mL}$). Fotos da fenda formada foram tomadas às 8 e 48h (A). A área da lesão foi medida em diferentes tempos utilizando o programa *TScratch* (B). Os resultados são apresentados como fechamento (%). ** ou*** indicam resultados estatisticamente diferentes do controle, com $p < 0,01$ e $0,001$ respectivamente (2-way *Anova*, pós-teste Bonferroni).

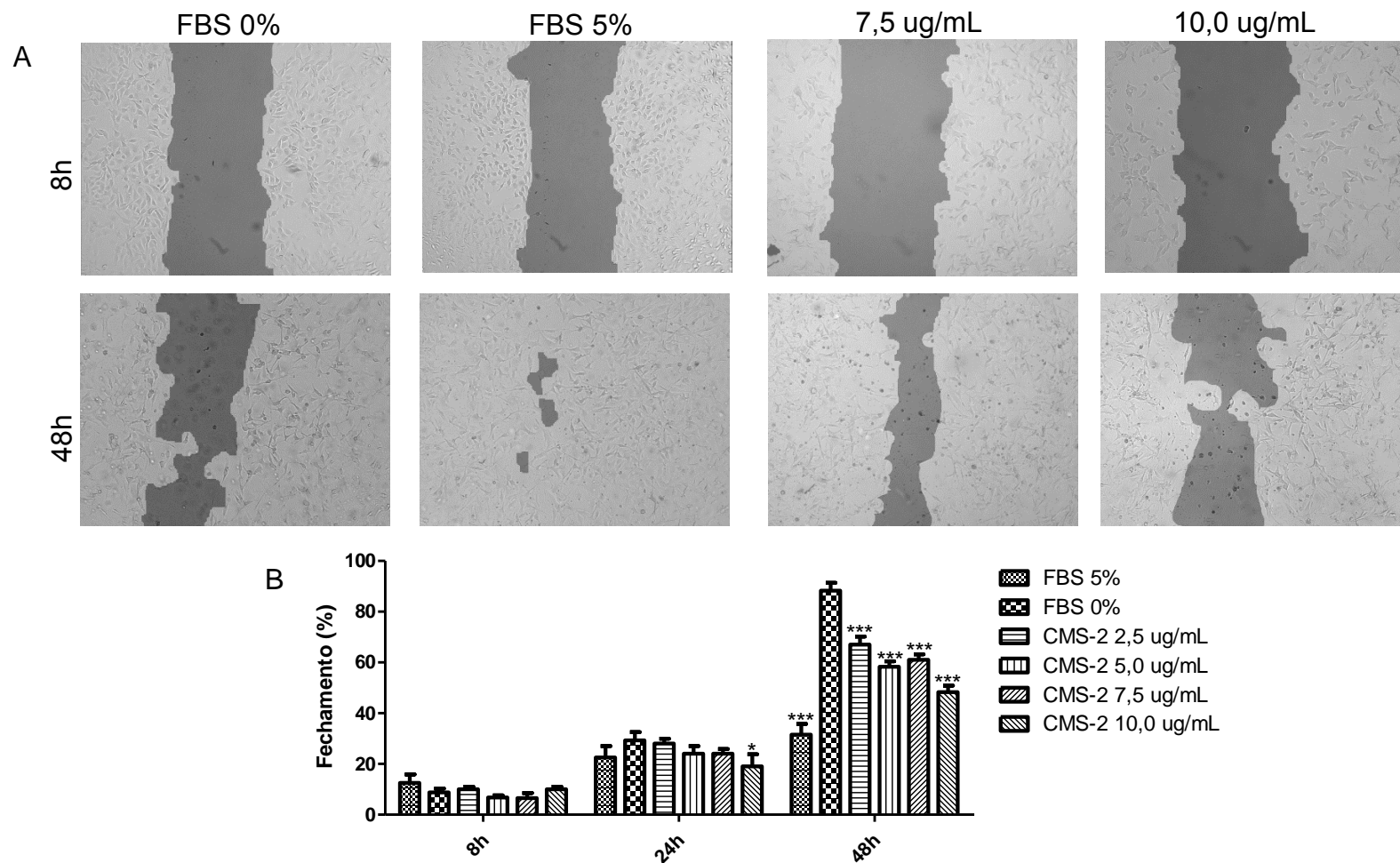


Figura 25: Efeito inibitório da migração *in vitro* de CMS-2 sobre células B16-F10 tratadas com Hidroxiureia. Na monocamada de B16-F10 foi feita uma lesão e as células foram tratadas com CMS-2 (2,5-10,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) na presença de Hidroxiureia (500 μM). Fotos da fenda formada foram tomadas às 8 e 48h (A). A área da lesão foi medida em diferentes tempos utilizando o programa *TScratch* (B). Os resultados são apresentados como fechamento (%). * ou *** indicam resultados estatisticamente diferentes do controle, com $p < 0,05$ e 0,001 respectivamente (2-way *Anova*, pós-teste Bonferroni).

6. DISCUSSÃO

Neste estudo, buscou-se identificar proteínas que tivessem suas expressões moduladas pela fração proteolítica CMS-2, obtida do látex de *Vasconcellea cundinamarzensis*, que possam estar envolvidas nos mecanismos de ação antimetastático em modelo B16-F10, conforme previamente descrito *in vivo* (Dittz, 2011). Para efeito de comparação com células normais, foram utilizadas os melanócitos murinos normais da linhagem Melan-a.

A linhagem B16-F10 foi estabelecida a partir de células tumorais de melanoma murino B16, após 10 ciclos de seleções sucessivas de pontos de metástases presentes no pulmão, previamente inoculadas no flanco de camundongos C57BL (Ishiguro et al., 1996). Assim como as células B16 e outras originárias desta, a B16-F10 tem sido largamente utilizada como modelo para o estudo de diversos aspectos da biologia do câncer, incluindo oncogenes e genes supressores tumorais, interações entre proteínas, angiogênese, invasão tecidual e metástase, e também nas pesquisas de agentes terapêuticos contra tumores sólidos e focos metastáticos (Kim et al., 2009).

Também originária de camundongos C57BL, o que facilita a sua utilização em estudos comparativos com as linhagens originadas de B16, a linhagem Melan-a retém todas as características de melanócito normal, exceto a senescência e a resposta proliferativa frente à toxina colérica na presença de Forbol 12-miristato-13-acetato (PMA). Essas células possuem cromossomos diploides e não formam tumores quando inoculadas em camundongos singênicos ou *nude*. Assim como observado nas linhagens utilizadas no presente trabalho, quando morfológicamente comparada à B16-F10, Melan-a se apresenta aproximadamente 40% menor e com mais prolongamentos dendríticos e pigmentos de melanina visíveis. Além disso, essas células cessam a proliferação quando em alta densidade em monocamada, não proliferam na ausência de PMA ou equivalente e possuem tempo de replicação de aproximadamente 30 h. Já as B16-F10, continuam proliferando mesmo quando em alta densidade, sendo que as células vão se empilhando ou são liberadas para o meio de cultura, proliferam na ausência de PMA e o tempo de replicação é de apenas cerca de 14 h (Bennett et al., 1987).

Inicialmente, realizamos a avaliação da citotoxicidade de CMS-2 sobre as linhagens celulares para a determinação da concentração desta amostra a ser utilizada no estudo proteômico. Para isso, células das linhagens de melanoma B16-F10 e de melanócito Melan-a foram expostas por 24h a concentrações crescentes de CMS-2 (Figura 3). Observa-se que a fração diminuiu a viabilidade celular de forma concentração-dependente, entretanto, não há seletividade quanto ao efeito citotóxico em relação ao tipo celular, tumoral ou normal (IC50 aproximadamente de 10 µg/mL). Ao contrário do que foi observado neste trabalho, Dittz (2011) relatou uma diferença considerável entre os valores de IC50 da fração CMS-2 em linhagens normais e tumorais. Valores de IC50 de 1,1 e 10,5 µg/mL foram obtidos para as linhagens celulares tumorais de B16-F10 e CT26.WT (carcinoma de cólon murino), enquanto que para as linhagens normais CHO (epitélio de ovário de hamster chinês) e BHK-21 (fibroblasto de rim de hamster chinês) foram obtidos 454,0 e 440, µg/mL de IC50, respectivamente, todos após 72 h de exposição e determinados pela metabolização do MTT – sal de tetrazólio a formazana. Vale ressaltar que as linhagens celulares normais, os tempos de exposição e as metodologias empregadas para as avaliações, foram diferentes nos dois trabalhos.

Uma vez que a fração CMS-2 não apresentou atividade citotóxica seletiva entre as linhagens tumoral e normal, e por esta amostra se tratar de uma mistura de enzimas com atividade proteolítica, inicialmente sugeriu-se um efeito deletério inespecífico, tal como a lise celular. Para testar essa hipótese, a fração CMS-2 teve a sua atividade proteolítica inibida pela ligação com Iodoacetamida - IAA (dados não mostrados). A IAA se liga irreversivelmente a resíduos de cisteína presentes na porção do sítio catalítico de cisteíno-proteases, o que leva a uma completa inativação destas enzimas (Salvesen & Nagase, 1990). Quando B16-F10 e Melan-a foram expostas por 24h a CMS-2 inibida, não foi possível determinar os valores de IC50, visto que até a concentração máxima avaliada (100 µg/mL) não obtivemos alterações significativas de viabilidade celular, verificada pela metabolização da resazurina (dados não mostrados).

Esse último resultado nos levou a avaliar a integridade da membrana plasmática na presença de CMS-2, através da dosagem da atividade da enzima Lactato Desidrogenase (LDH) no sobrenadante de células tratadas com a

amostra. Essa enzima se encontra no citoplasma das células e é responsável pela conversão de piruvato em lactato, sendo que para isso há a oxidação de NADH (Jurisic et al, 2000). A Figura 4 mostra que a fração CMS-2 não promove o rompimento da membrana celular de B16-F10 ou Melan-a após 24h de exposição, mesmo nas mais altas concentrações. Ao contrário, nas concentrações de 50,0 e 100,0 µg/mL, observou-se uma redução significativa no conteúdo de LDH presente no sobrenadante, quando comparado com os valores basais (controle negativo). Esses resultados descartam a hipótese de que a atividade proteolítica de CMS-2 promova, de forma aguda, lise celular.

Para a identificação das proteínas moduladas por CMS-2, realizamos a análise proteômica dos lisados celulares das linhagens B16-F10 e Melan-a, expostas à concentração de 10 µg/mL da subfração por 24h. Essa técnica permite uma investigação global de eventos moleculares que ocorrem em sistemas biológicos, sendo um instrumento para análise de doenças e potenciais terapias (Kim et al., 2009). Como apresentado na Figura 3, C a F, essa concentração de CMS-2 foi capaz de alterar visivelmente o número e a morfologia das células, sendo que estas se apresentaram mais fusiformes e com mais dendritos quando comparadas aos respectivos controles, que possuem o formato tipo epitelial, de acordo com a descrição da célula no American Type Culture Collection (ATCC, 2014). No entanto, a diferença de número de células nas linhagens não se retratou em diferenças estatísticas do conteúdo proteico presente nos lisados celulares, Teste *T-student* (Tabela 3). Vale ressaltar que o tratamento com CMS-2 não reduziu a síntese de DNA, estimulada pelo FBS, nas células B16-F10, enquanto que na linhagem Melan-a, a fração promoveu uma redução significativa (Figura 14). Entretanto, a hipótese de que CMS-2 promove a parada do ciclo celular após a fase S (duplicação do cromossomo) deve ser testada, o que poderia justificar a nítida redução do número de células de B16-F10 após o tratamento, mesmo sem alteração na fase de síntese de DNA.

Quanto à possível alteração da morfologia após o tratamento com CMS-2, é descrito na literatura que os dendritos apresentados pelos melanócitos servem como principais condutores dos melanosomos para a transferência dos mesmos aos queratinócitos (Boissy, 2003). Outro trabalho mostrou que os prolongamentos dendríticos estão fortemente relacionados com uma diminuição

no potencial migratório de células de melanoma (Hata et al., 2003). Outras alterações morfológicas estão implicadas com o comportamento celular, como o descrito por Carreira e colaboradores (2006). Esses autores demonstraram que a destruição da organização da actina, que culmina com a mudança de uma forma mais alongada para um fenótipo arredondado, está relacionada ao aumento da capacidade de invasão das mesmas. Essas observações quanto à mudança do fenótipo das linhagens na presença de CMS-2 nos permite formar uma hipótese de que esta mistura proteica altera a morfologia celular e, como consequência, reduz a capacidade de migração, como visto nas Figuras 23, 24 e 25. No entanto, se faz necessário melhor caracterizar essa alteração morfológica, como por exemplo, avaliando a relação entre actina glomerular e fibrilar (Cortes et al., 2000).

Após padronização da quantidade de proteína e condições de focalização para obtenção de géis bidimensionais com alta reprodutibilidade, < 70% de correlação entre triplicatas de géis de amostras biológicas independentes (resultados não mostrados), seguiu-se com os estudos usando a metodologia 2-D Fluorescence Difference Gel Electrophoresis - DIGE. Trata-se de uma adaptação da técnica 2-DE com a vantagem de ser mais sensível e com maior acurácia na quantificação, o que aumenta a confiança estatística (Kim et al., 2009). Na Figura 5 são mostradas as imagens dos seis géis DIGE produzidos com lisados celulares de B16-F10 e Melan-a tratados ou não com CMS-2. Uma ampla distribuição dos *spots* entre diferentes pontos isoelétricos (3 a 11) e pesos moleculares (14 a 97 kDa) é visivelmente constatada, evidenciando a complexidade das amostras de extratos proteicos utilizados no estudo. Além disso, novamente em uma avaliação visual, sugere-se uma boa reprodutibilidade, visto que alguns *spots* são prontamente identificados nos diferentes géis apresentados, como evidenciados na Figura 5. Essa reprodutibilidade foi constatada por valores de número de *spots* próximos entre os géis fluorescentes e, também, por um alto índice de sobreposição entre os *spots* (dados não mostrados).

A avaliação da diferença de expressão entre as condições experimentais também foi determinada, através dos testes estatísticos *t-Student* e *One-Way ANOVA* ($p \leq 0,05$). Na comparação entre B16-F10 controle (BC) *versus* tratado

(BT), foi possível selecionar 21 *spots* diferentemente expressos (Figura 6). No entanto, quando comparados Melan-a controle (MC) *versus* Melan-a tratado (MT), nenhum *spot* apresentou diferença de expressão estatisticamente significativa. Essa ausência de diferença pode ser explicada pelas limitações da técnica empregada, uma vez que alterações biológicas importantes foram observadas nessa linhagem sob o efeito de CMS-2, tais como redução da viabilidade, da proliferação e da migração celular (Figuras 3B, 16B e 24, respectivamente) e indução da melanogênese – aumento do conteúdo de melanina e da atividade da enzima tirosinase (Figuras 21B e 22B, respectivamente). Os métodos 2-DE clássico e, também, o DIGE são tecnicamente limitados no que se refere a detecção de alguns tipos de proteínas, tais como as de baixa expressão e as de membrana, estas últimas por serem insolúveis no tampão de lise adequado a estas técnicas, ou por adsorver ou precipitar na matriz da *strip* (Tan et al., 2008). Além disso, essas técnicas proteômicas não possuem capacidade suficiente para resolver proteomas mais complexos. Por exemplo, a maioria das células de mamíferos é provavelmente constituída por mais de 20 mil proteínas, enquanto que um típico formato grande de gel 2-D (24 cm) resolve, apenas, cerca de 10% deste total (de 1.500-2.000 *spots* ou menos) (Han et al., 2008).

Já quando comparados os grupos MC *versus* BC, um total de 71 *spots* foram diferentemente expressos, enquanto que a comparação entre as condições experimentais MC *versus* BT totalizou 78 *spots*. Desse total, 41 *spots* são comuns à comparação BC *versus* MC, o que nos leva a inferir que são proteínas que não foram moduladas pelo tratamento com CMS-2 (Figura 6).

Vale destacar, como evidenciado na Figura 9B, que as proteínas identificadas e que foram mais expressas em BC quando comparado a MC, são categorizadas com funções relacionadas ao Metabolismo, Energia, Destino proteico (enovelamento, modificação, destino), Proteína com função de ligação ou co-factor (estrutural ou catalítica), Transporte celular, transporte de organelas e vias de transporte, Sobrevivência celular, defesa e virulência e Destino da célula, conforme classificação do Banco de Dados FunCat (Ruepp et al., 2004). Também utilizando abordagem proteômica, Carta e colaboradores (2005) identificaram proteínas estruturais, de estresse ou enzimas envolvidas na

produção de ATP como diferentemente expressas entre culturas primárias de melanomas e melanócitos humanos. Já na comparação de tecido de carcinoma colorretal humano e normal, observou-se que proteínas classificadas nas categorias metabolismo, regulação de processos biológicos e organização celular e biogênese foram as mais abundantes no tumoral (Alfonso et al., 2008). Na comparação de células humanas de sarcoma uterino resistentes ou não a doxorubicina, MES-SAS e MES-SAS/Dx5, respectivamente, as categorias funcionais mais abundantes foram as de enovelamento de proteína, metabolismo e transdução do sinal, e as menos representativas foram as de reparo do DNA, transporte de elétrons e resposta imune (Lin et al., 2012).

Quando comparados BT *versus* BC (Figura 9A) e BT *versus* MC (Figura 9C), um padrão de expressão foi observado após o tratamento com CMS-2, estando superexpressas as proteínas envolvidas no Metabolismo e Energia. Proteínas como enolase 1 alfa, triosefosfato isomerase, fosfoglicerato mutase 1, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase e piruvato quinase M, são enzimas envolvidas na glicólise celular e que se mostraram estatisticamente aumentadas no grupo BT *versus* BC e BT *versus* MC. Já a enzima fosfoglicerato quinase, que também tem função na glicólise, se apresentou aumentada apenas na comparação entre BC *versus* MC. Sabe-se que ajustes no metabolismo energético, com o intuito de suprir o crescimento e a divisão celular que ocorre de forma exacerbada, são observados durante o desenvolvimento tumoral. Mesmo na presença de oxigênio, as células tumorais podem reprogramar o metabolismo, limitando-o à glicólise, a chamada glicólise aeróbica ou efeito Warburg (Hanahan & Weinberg, 2011). Apesar desse metabolismo energético ter menos eficiência na produção de ATP em relação à fosforilação oxidativa, durante a glicólise são formados diversos intermediários envolvidos em várias cascatas de biossíntese (Vander Heiden et al., 2009), bem como possuem efeito protetor para a célula, por exemplo reduzindo a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Lu et al., 2014).

Dessa forma, em um primeiro momento, o aumento no nível de expressão de enzimas glicolíticas promovido por um possível agente antitumoral / antimetastático, nos parece contraditório, visto que pode garantir às células tumorais um aporte de ATP e de intermediários essenciais para a proliferação

celular, e ainda, mecanismos de escape de morte celular. No entanto, estudar a cinética da expressão dessas enzimas pode nos revelar outro aspecto como, por exemplo, ser este aumento um efeito secundário resultante de uma redução inicial, tanto da fosforilação oxidativa, visto indiretamente pela diminuição da metabolização de resazurina – Figura 3, quanto da glicólise. Assim, investigar melhor tal modulação se faz necessário, incluindo avaliar o nível de transcrito e das isoformas ou alterações pós-traducionais promovidas por CMS-2 e, também, verificar o efeito desta amostra na atividade de cada enzima, ou seja, a ativação ou inativação destes alvos moleculares.

Na comparação entre BC e BT, também foi observado que o tratamento com CMS-2 reduziu a expressão, especialmente, de proteínas relacionadas ao Ciclo celular e processamento do DNA, Transcrição, Síntese proteica, Destino proteico (enovelamento, modificação, destino), Regulação do metabolismo e função proteica; Comunicação celular/mecanismo de tradução do sinal, Biogênese de componentes celulares, Sobrevivência celular, defesa e virulência e Destino da célula (Figura 9A). Destaca-se o fato de que essas duas últimas categorias citadas se encontravam super expressas no grupo BC em comparação com o MC (Figura 9B). Além disso, vale ressaltar que todas funções reduzidas após o tratamento com CMS-2 estão diretamente relacionadas com a proliferação e sobrevivência celular, eventos de suma importância para o desenvolvimento tumoral e de metástases (Leong et al., 2012).

Considerando a quantidade de proteínas identificadas no presente trabalho, a complexidade de informações que estas fornecem sobre o efeito de CMS-2 e o restrito espaço para a análise de todas, nos propomos a agrupar as proteínas que apresentaram perfis comuns de expressão entre as diferentes condições experimentais, tais como: a) diferenças de expressão entre MC e BC e entre BC e BT, mas igualdade entre MC e BT; b) diferenças de expressão entre BC e BT e entre MC e BT, mas igualdade entre MC e BC; c) diferenças de expressão somente entre BC e BT; e d) diferenças de expressão somente entre MC e BC e igualdade entre BC *versus* BT e MC *versus* BT.

Quatro das 71 proteínas identificadas neste trabalho se mostraram estatisticamente super expressas no grupo BC em comparação com os grupos BT e MC, sendo a comparação das mesmas entre BT e MC sem diferenças

significativas (Figura 10). Nucleofosmina isoforma 1; Proteína de choque térmico 65, Proteína ligante a calciclina e Fator de iniciação da tradução eucariótica 4H são proteínas que tem a sua expressão alterada em células tumorais, mas que o tratamento com CMS-2 conseguiu reverter este padrão aos valores comparáveis à célula normal (Tabela 3).

A nucleofosmina 1 possui funções categorizadas de Destino proteico (enovelamento, modificação, destino), Proteína com função de ligação ou co-factor (estrutural ou catalítica) e Sobrevivência celular, defesa e virulência (Ruepp et al., 2004) (Tabela 3). Souza e colaboradores (2006) também observaram o aumento de nucleofosmina em células transformadas, obtidas a partir do impedimento da adesão de Melan-a ao substrato (crescimento independente de ancoragem), em comparação aos melanócitos. Essa proteína, também designada de Nucleofosmina B23 ou numatrina 1, é uma fosfoproteína de aproximadamente 37 kDa abundante e altamente conservada. Essa pode ser fosforilada em vários resíduos por diferentes quinases, incluindo CDK1-Ciclina B (proteína quinase 1 dependente de ciclina B), caseína quinase II e CDK2-Ciclina E (proteína quinase 2 dependente de ciclina E), esta última está envolvida em eventos finais que promovem a duplicação do centrômetro, durante a fase S-G2 (Okuwaki et al., 2002).

A nucleofosmina se localiza no nucléolo, mas transloca rapidamente para o citoplasma (Borer et al., 1989; Yun et al., 2003), o que justifica a sua participação em vários processos celulares: transporte de partículas pré-ribossomal e biogênese de ribossomos, resposta ao estímulo ao estresse tais como irradiação UV e hipóxia, manutenção da estabilidade genômica através do controle da ploidia celular, participação no processo de reparo ao DNA e regulação da transcrição do DNA através da modulação da condensação de cromatina. Além disso, essa proteína está envolvida na regulação da atividade e estabilidade de supressores tumorais como o Rb (Retinoblastoma) (Takemura et al., 1999), p53 e ARF (Quadro de leitura alternativa do locus INK4a/ARF) (Grisendi et al., 2006).

Já foi relatado na literatura que a Nucleofosmina 1 se encontra superexpressa em células em proliferação ou malignas, inclusive em melanoma quando comparado à melanócitos (Bernand et al., 2003), bem como que a

indução da sua expressão leva ao aumento do crescimento e proliferação celular e à inibição da diferenciação e apoptose, características estas de transformação neoplásica (Hsu & Yung, 1998). Ao contrário, os níveis de nucleofosmina diminuem em células que não estão em proliferação ou estão em processo de apoptose, e a redução do seu mRNA retarda a progressão no ciclo celular e o início da mitose (Jiang. & Yung, 1999). Dessa forma, podemos considerar a hipótese de que a redução da expressão da Nucleofosmina na célula B16-F10 após o tratamento com CMS-2 leve à diferenciação, uma vez que foi observado o aumento da produção de melanina e da atividade da enzima tirosinase na linhagem de melanoma, Figuras 21A e 22A. Já quanto à proliferação celular e apoptose, mesmo levando à subexpressão de Nucleofosmina 1, a exposição à CMS-2 não altera os níveis de síntese de DNA em B16-F10 quando as células são estimuladas com 5% de FBS (Figura 19A) bem como não promove o aumento do DNA subdiploide na concentração de 10 µg/mL (Dittz, 2011).

O envolvimento da Nucleofosmina 1 na resposta proliferativa se dá por diferentes mecanismos, seja pela indução da atividade da DNA-polimerase α ou pela sustentação da maquinaria ribossomal, mesmo com funcionamento aberrante (Takemura et al., 1999). Quanto à sobrevivência celular, essa proteína pode funcionar como anti-apoptótica através de mecanismos indiretos, tais como aumentando o reparo do DNA e levando à superexpressão do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), componente essencial para a maquinaria de reparo (Wu et al., 2002). A nucleofosmina também inativa o supressor tumoral IRF1, fator de transcrição envolvido na apoptose induzida por dano ao DNA e parada no ciclo celular (Grisendi et al., 2006). Há também relatos na literatura que correlacionam a super expressão de nucleofosmina 1 e a sobrevivência de células mesmo sob hipóxia. Isto pode indicar que, durante a progressão tumoral há um aumento da expressão de nucleofosmina, que é um alvo transcricional do fator induzido por hipóxia alfa 1 (HIF1 α) e do proto-oncogene Myc, levando a inibição da ativação de p53 e, assim, a sobrevivência celular (Zeller et al., 2001).

Outros mecanismos pelos quais nucleofosmina pode funcionar como um repressor da apoptose já foram reportados. A quinase dependente de fita dupla de RNA (PKR), induzida por interferon, é uma proteína de resposta antiviral capaz de inibir a tradução de mRNA através da fosforilação e inativação do fator

de iniciação da tradução 2 α (EIF2 α). Em células normais, PKR induz apoptose em resposta a vários estímulos extra e intracelulares, já em células que superexpressam nucleofosmina, esta última se associa com PKR e inibe a sua ativação (Grisendi et al., 2006). A nucleofosmina também possui atividade anti-apoptótica por formar um complexo nuclear com PIP3 (Fosfatidilinositol 3 fosfato), inibindo a atividade da DNase ativada por caspase (CAD), também chamada de fator de fragmentação de DNA 40 kDa. Vale ressaltar que a cascata da fosfatidilinositol 3-quinase se encontra frequentemente alterada em células malignas (Ahn et al., 2005).

As proteínas supressoras tumorais p53 e ARF (Quadro de leitura alternativa do locus INK4a/ARF) também são alvos da nucleofosmina 1 (Colombo et al., 2002; Wong et al., 2013). Acredita-se que a nucleofosmina inibe a fosforilação de p53 no resíduo de serina 15, e subsequentemente bloqueia a indução de p21WAF1/CIP1 (inibidor de quinase dependente de ciclina 1), efeito este visto em células em hipóxia. Essa inibição de p53 se reflete em diminuição da apoptose e/ou senescência (Colombo et al., 2002; Wong et al., 2013), evento celular caracterizado por parada irreversível do ciclo celular mesmo com condições favoráveis para o crescimento. Apesar da verificação de que CMS-2 reduz os níveis de expressão de nucleofosmina na linhagem B16-F10, o número de células marcadas positivamente para a enzima β -galactosidase, um marcador de senescência, se encontra no mesmo nível do controle negativo após o tratamento (Figura 20). No entanto, outras evidências de que essa fração leva à senescência devem ser investigadas, tais como parada no ciclo e alteração da morfologia celular, com células mais alongadas, núcleo proeminente e aumento da granulosidade citoplasmática (Muñoz-Espín & Serrano, 2014). Quanto à ARF, que é uma proteína nuclear envolvida no acionamento dos programas de parada do ciclo celular e apoptose, ocorre sua associação com a nucleofosmina, formando um complexo estável com alta massa molecular. Essa associação impede que a ARF iniba o regulador negativo de p53, MDM2 (*Murine double minute 2*) (Bertwistle et al., 2004).

A relação entre a super expressão de nucleofosmina e a migração e invasão celular também já foi relatada (Loubeau et al., 2014). Em células LNCap, linhagem de câncer de próstata, quando o gene da nucleofosmina foi silenciado,

observou-se uma redução da proliferação, formação de colônias, migração e invasão celular. Ao contrário, quando se induziu a expressão dessa proteína, observou-se um fenótipo celular mais agressivo, com alta taxa de replicação. No presente trabalho foi observado que o tratamento da linhagem B16-F10 com CMS-2 promoveu uma redução da capacidade de migração celular (Figuras 23 e 25), o que pode estar relacionado com a redução da expressão de nucleofosmina (Tabela 3). Sabe-se que a nucleofosmina também é capaz de se ligar e estabilizar K-Ras (GTPase) em uma forma ativa, o que leva à ativação da cascata de sinalização da MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno) (Weber & Gioeli, 2004; Inder et al., 2009 e 2010).

Provavelmente não só a nucleofosmina 1 se encontra com os níveis de expressão alterados pelo tratamento com CMS-2, mas também as proteínas relacionadas com a sua função, tais como CDK2-Ciclina E, várias proteínas ribossomais (S5, S21, S9, L8, S3, S15 e S17), PCNA, produto gênico de Myc, p53, Akt, MDM2 e MAPK. Essas proteínas se apresentam na rede de predições de interações entre proteínas (Franceschini et al., 2013) que estão diferentemente expressas em B16-F10 após o tratamento com CMS-2 (Figura 11). Efeitos moduladores de proteases exógenas em proteínas envolvidas no processo de desenvolvimento tumoral já foram anteriormente descritos. Kalra e colaboradores (2008), verificaram que a cisteína protease bromelina, em modelo *in vivo* de carcinogênese, aumentou a expressão das proteínas pró-apoptóticas p53, Bax e caspases 3 e 9, enquanto que Bcl-2 (função anti-apoptótica) foi reduzida em amostras de pele de camundongos expostos aos agentes mutagênicos iniciadores e promotores, DMBA (7,12-Dimetilbenz(a)antraceno) e TPA (12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato), respectivamente. Ainda nessas amostras de tecido, verificou-se que o conteúdo da ciclooxigenase 2, do fator de transcrição NF- κ B e das proteínas reguladoras do crescimento celular p-38, ERK e Akt fosforilados estavam diminuídos após o tratamento com bromelina. Esses efeitos moleculares descritos para a bromelina foram confirmados posteriormente pelo mesmo grupo de pesquisa (Bhui et al., 2009), levando os autores à conclusão de que a bromelina apresenta efeito quimioprotetor por possuir efeito anti-iniciador e anti-promotor tumoral e por modular proteínas envolvidas nos processos de desenvolvimento tumoral.

A Proteína de choque térmico 65 (HSP65), com função classificada como de Destino proteico (enovelamento, modificação, destino), também se mostrou significativamente aumentada no grupo BC em comparação aos grupos MC e BT, não apresentando nível de expressão diferente entre os dois últimos grupos (Tabela 3). Souza e colaboradores (2006) mostraram que essa proteína está aumentada em células de melanócitos transformados em relação à linhagem normal. Esse mesmo perfil foi observado em estudos proteômicos realizados em tecidos parafinizados obtidos de tumores de pacientes portadores de melanoma (Schowalter et al., 2014). Diferenças de expressão de HSP65 entre melanoma primário e metastático também foram descritas, estando aumentada nas células metastáticas, o que leva a correlacionar a sua expressão com a agressividade do tumor (Carta et al., 2005).

No geral, as proteínas de choque térmico (HSP) são um grupo de moléculas ubíquas presentes nas células, altamente conservadas entre as diferentes espécies e induzidas após exposição a fatores estressantes, tais como alta temperatura e hipoxia. As HSPs são expressas de forma constitutiva na homeostase e têm funções de chaperonas, ligando-se a proteínas desnaturadas ou dissociando agregados, a fim de regular o seu correto enovelamento. Além disso, participam do transporte de polipeptídeos sintetizados para as organelas alvo, o que representa um importante mecanismo de controle de qualidade de proteínas (Hartl, 1996). As HSPs também são importantes alvos da resposta imune mediada por células T na epiderme, onde há o reconhecimento destas proteínas, levando a liberação de citocinas e o recrutamento de linfócitos (Morris, 2002; Van Eden et al., 2003). Vale ressaltar que, receptores do tipo Toll participam dessa resposta imunológica e, possivelmente, se encontram diferentemente expressos comparando os grupos BC e BT, visto que as isoformas 1, 2, 4 e 6 foram observadas na rede de predições de interações de proteínas (Figura 11).

Ainda sobre a HSP65, além de contribuir para o desenvolvimento tumoral com a sua atividade chaperona, também participa da inibição da apoptose (Jaattela, 1999), do aumento da imunogenicidade tumoral (Tamura et al., 1997; Srivastava, 2002) e da angiogênese (Calderwood et al., 2006). Yang e colaboradores (2013) mostraram que a administração de HSP65 em

camundongos portadores de melanoma B16-F10 foi capaz de inibir significativamente o crescimento, a angiogênese e o desenvolvimento de metástase, além de aumentar a sobrevivência dos animais. Os autores explicam que essa administração funcionou como uma vacina, uma vez que altos níveis de anticorpos anti-HSP65 foram detectados nos sangues dos animais tratados.

Nas comparações entre os grupos BC *versus* BT e MC *versus* BT a proteína ligante a calciclina também se apresentou diferentemente expressa, com aumento em BC em relação aos demais grupos (Tabela 3). Essa proteína é funcionalmente classificada em Destino proteico (enovelamento, modificação, destino) (Ruepp et al., 2004) e foi, primeiramente, descrita em células de tumor ascítico de Ehrlich (Schneider & Filipek, 2011). A proteína ligante à calciclina participa de vários processos celulares, com ubiquitinação, proliferação, diferenciação, tumorigênese, rearranjo do citoesqueleto e regulação da transcrição (Chen et al., 2013).

Além da própria calciclina (que foi observada na rede de interação de proteínas – Figura 11), várias são as proteínas que podem interagir com a proteína ligante a calciclina, tais como a tubulina, actina, tropomiosina (Schneider et al., 2010) e as quinases ERK 1/2 (quinase regulada por sinal extracelular) (Kilanczyk et al., 2009). Quanto à superexpressão da proteína ligante à calciclina, esta já foi observada em células metastáticas de tumor de cólon, em comparação à linhagem de tumor primário. Além disso, essa linhagem primária modificada para super expressar a proteína ligante à calciclina apresentou maior capacidade de migração, invasão e proliferação, em relação à célula *wild type*, especialmente por aumentar o nível de expressão de diversas integrinas (Ghosh et al., 2013). Além disso, em linhagens de câncer gástrico (Zhao et al., 2002; Shi et al., 2004) e pancreático (Chen et al., 2013), observou-se que a super expressão da proteína ligante à calciclina está relacionada à resistência à quimioterápicos. No entanto, as bases moleculares desse efeito ainda não estão elucidadas.

Já o Fator de iniciação da tradução eucariótica 4H (eIF4H), proteína que também se mostrou super expressa no grupo BC em comparação com MC, mas que o tratamento com CMS-2 reverteu e igualou ao nível de expressão da célula normal, é categorizada em Síntese proteica e Proteína com função de ligação ou

co-factor (estrutural ou catalítica) (Ruepp et al., 2004) (Tabela 3). Essa proteína foi, primeiramente, identificada em reticulócitos de coelho e se acredita que eIF4H estimula a síntese proteica por aumentar a atividade helicase da eIF4A (Fator de iniciação da tradução eucariótica 4A) (Richter-Cook et al., 1998 e 1999). Já foi descrita a super expressão dessa proteína em câncer de colo-retal humano, o que sugere que o controle da tradução do mRNA (RNA mensageiro) é uma função importante na carcinogênese. Acredita-se que eIF4H esteja envolvido na transformação celular por aumentar a eficiência traducional de mRNAs responsáveis pelo controle do crescimento celular e apoptose (Tomonaga et al., 2004).

O gene que codifica eIF4H é conhecido por produzir duas variantes por *splicing* alternativo, isoformas 1 (27 kDa) e 2 (25 kDa). Entre essas formas, observa-se a super expressão da isoforma 1 em câncer de cólon (Martindale et al., 2000). No trabalho de Wu e colaboradores (2011), foi observado que a super expressão de eIF4H isoforma 1 em fibroblasto murino imortalizado leva ao desenvolvimento de uma massa tumoral em camundongos *nude*. Juntamente com a super expressão de eIF4H se observou o aumento dos níveis da ciclina D1, proteína envolvida na proliferação celular. Ao contrário, o silenciamento desse mRNA, e não da isoforma 2, inibe a proliferação e induz a apoptose em linhagens de câncer de cólon, além de inibir o crescimento tumoral *in vivo*. Vale ressaltar que vários outros fatores de iniciação da tradução eucariótica podem também ser modulados pelo tratamento com CMS-2 (eIF1B2, eIF2S1, eIF3 A – K, eIF4B, eIF4E, eIF4G1, eIF5 e eIF5B), visto que foram relacionadas na rede de predição de interações de proteínas (Figura 11).

Assim, considerando os efeitos de CMS-2 na redução da expressão de proteínas diretamente envolvidas processos de proliferação, sobrevivência, diferenciação e migração celular - Nucleofosmina 1, HSP65, proteína ligante à calciclina e eIF4H, podemos sugerir que esta modulação contribui para a inibição da migração e a indução da diferenciação celular (medida pela melanogênese), parâmetros que podem justificar a atividade antimetastática da fração.

As proteínas relacionadas à glicólise Enolase 1 alfa, Triosefosfato isomerase, Fosfoglicerato mutase 1, Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, classificadas funcionalmente em Metabolismo e Energia, 1 cis peroxirredoxina e

Glutathione S-transferase (GST), classificadas em Sobrevivência celular, defesa e virulência, a cofilina 1, que dentre várias classificações possui a função de Biogênese de componentes celulares, e Sui homólogo, sem classificação FunCat (Ruepp et al., 2004), foram também identificadas neste trabalho e formam um grupo que tem a expressão alterada nas células tratadas, independentemente da comparação ser feita com a linhagem normal ou tumoral (Figura 12). Assim como as proteínas envolvidas na glicólise, como descrito anteriormente, a 1 cis peroxirredoxina e GST se encontram estatisticamente reduzidas nos grupos BC e MC em comparação com o grupo BT, sendo a comparação das expressões destas proteínas entre BC e MC sem diferenças significativas (Tabela 3).

As peroxirredoxinas são enzimas antioxidantes pertencentes à família de peroxidases, que utilizam cisteínas ativas para reduzir peróxidos. Apresentam-se altamente conservadas entre as espécies e são induzidas por estresse oxidativo (Zhang et al., 2009). Alterações nos níveis de expressão de peroxirredoxinas foram observadas em vários tipos de cânceres, sendo que elevações nos níveis de peroxirredoxina 1 aumentam a sobrevivência e agressividade de células tumorais, bem como conferem aumento de resistência à quimioterapia e radioterapia (Liu et al, 2013). Já a GST faz parte do sistema de detoxificação de Fase II (Tew & Townsend, 2012) e por isso, apresenta um papel de citoproteção crucial contra carcinógenos e ROS. A catálise de reações de conjugação envolvendo a glutathione, torna os substratos inativos e aumenta a sua solubilidade, o que facilita a sua excreção (Lee et al., 2013). A maioria de células tumorais humanas, especialmente as selecionadas *in vitro* que apresentam resistência aos quimioterápicos, super expressam GST. Uma correlação quantitativamente significativa foi descrita entre a atividade enzimática, o total de proteína e o mRNA, em uma variedade de cânceres humanos quando comparada com o tecido normal ao redor. Além disso, altos níveis de GST têm sido relacionados não só com a resistência a quimioterápicos, mas também com a progressão tumoral (Laborde, 2010). Proteínas como várias glutathione peroxidases, sintetases e redutases, glutamil-transferases (metabolização de Fase II), diversas subfamílias do citocromo P450 (metabolização de Fase I) podem ser também moduladas por CMS-2, visto que

foram observadas na rede de predição de interação de proteínas (Figura 13) e pelos relatos de que enzimas de metabolização de Fase I e II se encontram fortemente associadas, geralmente ocorrendo a modulação dos dois sistemas simultaneamente (Lee et al., 2013).

Considerando que a fração CMS-2 leva à melanogênese nas linhagens B16-F10 e Melan-a, verificados pelo aumento do conteúdo de melanina e da atividade da enzima tirosinase, Figuras 21 e 22, respectivamente, podemos justificar o aumento da expressão de enzimas antioxidantes, como a peroxirredoxina e GST. Sabemos que os melanócitos e melanomas (em todos os estágios de progressão tumoral) geram ROS, através do próprio metabolismo celular ou em resposta a estímulos imunes, mas principalmente por sintetizar melanina (Cunha et al., 2012). Assim, essas células desenvolveram um sistema antioxidante capaz de evitar o estresse oxidativo, ao invés de entrar em apoptose, conforme descrito por Swalwell e colaboradores (2012). Já foi descrito o efeito de ROS, especialmente H₂O₂, como indutores de senescência (Fripiat et al., 2001). Essa eficiência das linhagens no controle do estresse oxidativo aparentemente se reflete, também, na ausência do efeito senescência após o tratamento de B16-F10 e Melan-a com CMS-2, uma vez que não houve aumento significativo no número de células marcadas para β-galactosidase (Figura 20).

Supomos que CMS-2 promova, inicialmente, um estresse oxidativo, direta ou indiretamente, via indução da produção de melanina, e na sequência, tanto em células tumorais como em normais, haveria um aumento da expressão de enzimas antioxidantes como mecanismo de citoproteção. Da mesma forma que o proposto acima, para as enzimas da via glicolítica, uma análise cinética da produção de ROS e das enzimas antioxidantes seria adequada para comprovar essa hipótese.

Quanto à proteína cofilina 1, que se mostrou reduzida com o tratamento com CMS-2, é uma das principais proteínas envolvidas na motilidade celular, uma vez que é ligante à actina, responsável pela sua polimerização. A atividade da cofilina 1 é regulada por fosforilação e desfosforilação de resíduos conservados de serina. Em baixas concentrações a cofilina 1 dissocia os filamentos de actina (F-actina) em monômeros (G-actina) e em altas concentrações se liga a estes filamentos, estabilizando-os. Também a cofilina 1

induz a formação de lamelopodias, saliências citoplasmáticas de dão direção à motilidade celular (Tahtamouni et al., 2013). Já foi observado que a expressão de cofilina 1 está aumentada em várias linhagens tumorais humanas, sendo este aumento correlacionado com uma alta velocidade de migração celular e baixo grau de diferenciação das células. Além disso, a super expressão de cofilina 1 aumenta a expressão de enzimas que degradam a matriz extracelular, tais como as metaloproteinases 2 e 14 em melanoma (Van-Troys et al., 2008). Por outro lado, o silenciamento da expressão da cofilina 1 promoveu um atraso no desenvolvimento de metástase e prolongou a sobrevida dos animais inoculados com células de adenocarcinoma pulmonar (Peng et al., 2011).

Considerando a relação entre a super expressão de cofilina 1 e a maior motilidade celular, podemos sugerir que a redução da migração celular das linhagens B10-F10 e Melan-a sob efeito do tratamento com CMS-2, conforme apresentado nas Figura 23, 24 e 25, ocorre, pelo menos parcialmente, pela diminuição da expressão desta proteína. Além disso, existe a possibilidade de que o receptor de fator de crescimento epidermal (EGF), MAPK e fibronectina também contribuam com a redução da capacidade migratória das células expostas à CMS-2, uma vez que são proteínas envolvidas com a migração celular (Breindel et al., 2013) e que foram observadas na rede de predição de interação entre proteínas modulas por este tratamento (Figura 13).

Na avaliação das proteínas que se mostraram apenas diferentemente expressas nas comparações entre BC *versus* BT, sem alterações quando comparados MC *versus* BC e MC *versus* BT, tem-se as proteínas de choque térmico HSP65 e HSP70 cognata, a piruvato quinase M, as actinas beta e gama e a proibitina 1. Sobre as HSPs e a piruvato quinase consideramos o descrito e discutido anteriormente. Quanto às isoformas de actina beta e gama, estas se encontram diminuídas em B16-F10 frente ao tratamento com CMS-2 (Tabela 3). Vários são os estudos relatando diferenças nos níveis de expressão de actina entre células tumorais e normais (Verrills et al., 2006, Kumar & Hall, 2009). Por exemplo, no melanoma ocorre sua super expressão, e esta observação está associada com o aumento de invasividade destas células (Wang et al., 2013). Esse efeito pode ser explicado pela importante participação da polimerização da actina nos eventos de motilidade celular (Guo, et al., 2013). Portanto, a redução

da expressão das isoformas não musculares de actina promovida por CMS-2, também, corroboram os resultados de diminuição da capacidade de migração das linhagens B16-F10 e Melan-a expostas à esta amostra (Figuras 23 a 25), bem como podem justificar as alterações de morfologia observadas após o tratamento (Figuras 3C-F).

Quanto à proibitina 1, esta se mostrou aumentada na linhagem B16-F10 tratada com CMS-2 (Tabela 3). Essa macromolécula pertence a uma família de proteínas altamente conservada e distribuída, que apresenta funções envolvidas em diversos processos celulares, tais como regulação da transcrição e proliferação celular, desenvolvimento e função mitocondrial (Mishra et al., 2010). O papel da proibitina na proliferação de células tumorais e/ou supressão tumoral permanece controverso, especialmente por esta se encontrar aumentada em muitos tipos celulares tumorais e diminuída em outros. No núcleo, a proibitina 1 interage com os supressores tumorais p53 e Rb, regulando-os. Sabe-se que a ligação entre proibitina 1 e p53 aumenta a atividade transcricional desta última proteína, por favorecer a sua ligação ao DNA (Wang, et al., 1999; Fusaro et al., 2003). Ao contrário, a degradação de proibitina 1 leva à atenuação da atividade de p53. Quanto à interação de proibitina com Rb, viu-se que esta impede a atividade de fatores de transcrição da família E2F. Assim, justifica-se a parada do ciclo celular promovida pela super expressão de proibitina 1, enquanto que o seu silenciamento acelera o crescimento tumoral.

No entanto, em células HeLa, verificou-se que a interação direta entre proibitina 1 e Ras leva a ativação de C-Raf, ativação esta requerida para a indução de migração celular. Acredita-se que a proibitina 1 funcione como uma chaperona ou promova uma ancoragem do complexo (proibitina 1/Ras/C-Raf) na membrana (Chowdhury et al., 2014). Além disso, foi descrito que a expressão de proibitina 1 está associada com a resistência aos fármacos, uma vez que o seu silenciamento aumentou a sensibilidade das células à apoptose promovida por quimioterápicos. Viu-se, também, que os níveis de proibitina 1 estão aumentados na superfície de células resistentes a quimioterápicos em comparação com as sensíveis (Gregory-Bass et al., 2008). Conforme Theiss & Sitaraman (2011), os efeitos opostos da proibitina 1 podem ser explicados pela sua localização subcelular, uma vez que a sua expressão aumentada na membrana plasmática

pode facilitar a tumorigênese, enquanto que no núcleo leva à parada do ciclo celular, senescência e apoptose. Considerando o aumento de proibitina 1 na linhagem B16-F10 tratada com CMS-2, se faz necessário determinar a localização celular preferencial desta proteína, para inferir sua atuação como produto do tratamento.

Além da proibitina 1 e das actinas beta e gama, as proteínas presentes na rede de possíveis interações (Figura 15), caspase 3, MAPK, PKC e várias integrinas (α 1-11, α V, β 1, β 3-7), podem também ser moduladas por CMS-2. Tratam-se de proteínas envolvidas na sobrevivência, apoptose, proliferação, migração e diferenciação (Sabbah et al., 2008) e, juntamente com o que foi discutido até então, podem explicar os efeitos *in vitro* e *in vivo* observados após o tratamento com CMS-2.

Por fim, uma avaliação foi realizada entre proteínas diferentemente expressas entre os grupos MC *versus* BC, mas que não apresentaram diferenças nas comparações entre BC *versus* BT e MC *versus* BT. Essas proteínas foram moduladas pelo tratamento com CMS-2 a ponto de não haver mais diferenças significativas entre MC e BT. Por outro lado, o tratamento promoveu diferenças de expressão, embora não significativas, entre BC e BT. As proteínas que se enquadram nesse requisito são: a) Enolase 1 alfa, alfa-fetoproteína, D-dopacromo carboxilase, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, fosfoglicerato quinase, piruvato quinase M, todas com função ligada ao Metabolismo e/ou Energia, e na sua maioria aumentadas no grupo BC como visto anteriormente; b) Gama e beta actina e vimentina, que possuem função principal de Biogênese, se mostraram aumentadas em BC, exceto vimentina que esteve diminuída; c) HSP70 cognata, nucleofosmina 1, peptil-prolil cis-trans isomerase A, proteína precursora de dissulfeto isomerase A3 – PDIA3, precursor da calreticulina e NEDD8 precursor, proteínas principalmente relacionadas ao destino proteico e que estão, na sua maioria super expressas em BC; d) Fator de alongação 1 delta e Fator de iniciação da tradução eucariótica 3, subunidade F, diminuídos em BC e que possuem função principal de Síntese proteica; e e) Inibidor da dissociação de guanosina difosfato (GDP) 2, que se apresenta aumentado em BC com função de regulação do metabolismo proteico.

A maioria dessas proteínas se encontraram aumentadas no grupo BC quando comparado ao MC, observação esta consistente com os relatos da literatura sobre o aumento destes alvos moleculares em células transformadas (Bianchi et al., 2005; Obchoei et al., 2009; Villagomez et al, 2009; Cho et al., 2014). A proteína peptil-prolil cis-trans isomerase A, também conhecida como ciclofilina A, é uma proteína de 18 kDa encontrada, principalmente, no citoplasma e tem a função de estabilizar e acelerar a isomerização de peptídeos que precedem o aminoácido prolina. Essa proteína está relacionada a importantes eventos biológicos incluindo a montagem, o enovelamento e o tráfego de proteínas, a imunomodulação e a sinalização celular. Em vários trabalhos que utilizaram a abordagem proteômica, a super expressão de ciclofilina A foi vista em carcinoma endometrial e de células escamosas esofágicas, câncer de mama e melanoma (Obchoei et al., 2009). Uma possível relação entre o aumento da expressão da ciclofilina A, a progressão tumoral e a redução da sobrevivência, já foi descrita. Por exemplo, Al-Ghoul e colaboradores (2008) observaram que a ciclofilina A está expressa em altos níveis em melanoma metastático em comparação com o melanoma primário.

A calreticulina é uma proteína largamente distribuída na célula e altamente conservada entre as espécies. Essa possui a função de chaperona, regulando os níveis de Ca^{2+} intracelular e a expressão, especialmente, de genes relacionados com a adesão célula-célula e célula-substrato (Bedard et al, 2005). Além disso, a calreticulina também compõe a estrutura de adesões focais, importante formação na adesão e migração das células, eventos estes diretamente relacionados à invasão e metástase de células tumorais (Villagomez et al, 2009). A prevenção de *anoikis* (apoptose promovida pela perda de adesão ao substrato) também está relacionada à calreticulina (Zamanian et al, 2013). A expressão dessa proteína, também, está relacionada à melanogênese, visto que em estudos onde houve o bloqueio da expressão de calreticulina, a enzima tirosinase, bem com a atividade desta, se encontraram diminuídas, apesar dos níveis de mRNA se manterem comparáveis aos níveis antes do silenciamento. Essa observação sugere a participação da calreticulina na glicosilação e enovelamento da tirosinase (Kawase et al, 2008).

O inibidor da dissociação de guanosina difosfato (GDP) 2 também foi relatado super expresso em carcinoma de mama humano, em um trabalho de comparação de mapas proteicos com o respectivo tecido normal. Ainda nesse trabalho, observou-se que o silenciamento dessa proteína induziu disfunções mitocondriais que facilitam a ativação de caspase 3 e 9 em células de tumor de mama (Muñiz Lino et al., 2014). Já em células tumorais gástricas, a super expressão do inibidor da dissociação de GDP 2 induziu mudanças fenotípicas consistentes com o evento de Transição Epitélio Mesenquimal (EMT), incluindo morfologia epitelial anormal tipo fibroblasto e redução de adesão intercelular. Além disso, observou-se a diminuição da expressão dos marcadores epiteliais E-caderina e β -catenina e aumento dos marcadores mesenquimais vimentina e fibronectina, bem como o estímulo à expressão de Snail, um repressor da E-caderina e indutor da EMT (Cho et al., 2014).

Quanto à observação de que em BC ocorre um aumento de expressão de PDIA3, que catalisa a isomerização *in vitro* de pontes dissulfeto intramoleculares, promovendo o enovelamento de proteínas dentro do retículo endoplasmático, o mesmo já foi descrito em linhagem tumoral de mama MCF-7 (Bianchi et al., 2005) e em tumores de mama humano (Song et al., 2012). Em estudos de Cunha e colaboradores (2012), foi relatada a super expressão de PDIA3 em células B16-F10 estimuladas a produzir melanina.

No entanto, quando analisada a vimentina, a NEDD8 e o fator de alongação 1 delta, que são proteínas superexpressas em condições células e tecidos tumorais (Ogawa et al., 2004; Li et al, 2010; Ryu et al., 2011; Lai et al, 2013), observou-se que os valores obtidos em BC se encontram reduzidos quando comparado com MC. Uma investigação mais aprofundada acerca das isoformas e/ou possíveis modificações que estão reduzidas na linhagem tumoral se faz necessária, com o intuito de verificar tal observação e os efeitos biológicos relacionados à esta alteração. A vimentina é uma das muitas famílias de membros de filamentos intermediários, característico de célula mesenquimal. Essa se associa a outros filamentos para a formação dos chamados VAMs (*vimentin associated matrix adhesions*), importante complexo envolvido na migração celular. Além disso, a vimentina participa da regulação da função de

integrinas e se encontra superexpressa em metástase de melanoma (Li et al, 2010; Lai et al, 2013).

NEDD8 (*neural precursor cell-expressed developmentally down-regulated 8*), é uma proteína conservada em eucariotos e largamente expressa na maioria dos tecidos. A NEDD8 é estruturalmente similar à ubiquitina, e assim como esta, conjuga-se aos seus substratos, evento chamado de nedilação (marcação da proteína a ser degradada no proteassomo), via uma sequência de processos envolvendo ativação, conjugação e ligação. Funcionalmente, a nedilação é essencial para a viabilidade celular, o desenvolvimento e a resposta ao estresse, e já foi vista desregulada em vários estados patológicos, dentre eles as neoplasias (Ryu et al., 2011). Estudos preliminares mostram que a inibição da nedilação, utilizando o composto denominado MLN4924, induz a parada do ciclo celular e apoptose em células tumorais, e foi capaz de inibir o crescimento tumoral *in vivo* (Soucy et al., 2010).

O fator de alongação 1 delta, neste trabalho com expressão diminuída em BC em comparação com MC, faz parte de um complexo de proteínas que medeia as etapas de alongamento da síntese proteica, por transferir tRNA para a porção 80S. A expressão anormal do fator de alongação 1 tem grandes efeitos no crescimento celular, incluindo transformação e tumorigênese. A sua super expressão foi relacionada a carcinomas gástricos e esofágicos mais agressivos (Ogawa et al., 2004).

Vale lembrar que as proteínas parcialmente moduladas (MC=BT) por CMS-2, estão relacionadas com todos os eventos celulares até aqui discutidos, tais como proliferação, migração e adesão celular e apoptose, senescência, e por isso, se colocam como possíveis alvos moleculares de CMS-2. Assim como as proteínas citadas, as Caspases 6 e 8, os homólogos de Ras, as caderinas 1 e 2, CDK 1 e 2, a PKC, a vinculina, a adenilato ciclases, a Trp53, a fibronectina 1, as integrinas (α 1-6, α V, β 1, β 3-5) e o inibidor de CDK 2A também podem ser moduladas pelo tratamento com CMS-2, visto se encontram presentes na rede de predição de interação de proteínas, ilustrada na Figura 17 e estão relacionadas com os eventos celulares descritos acima (Hanahan & Weinberg, 2011).

Assim, mesmo tendo selecionado algumas poucas proteínas (aproximadamente 20) moduladas por CMS-2 para esta discussão, dentro de um total identificado (84 proteínas) que se encontrou diferentemente expresso e que, ainda, pode estar subestimado pela limitação da técnica utilizada, foi possível sugerir alvos moleculares para a fração proteolítica com diversas funções relacionadas aos eventos de transformação celular, progressão tumoral e desenvolvimento de metástases. Em adição, indiretamente, via predição de redes de interações entre proteínas, foi proposta a alteração de vias clássicas de sinalização celular, tais como as da apoptose (p53, caspases), diferenciação, proliferação e migração (MAPK, PKC, CDK, EGFR, RAS, integrinas), o que corrobora os efeitos celulares observados frente à fração proteolítica CMS-2.

7. CONCLUSÃO

Os resultados indicam que a fração proteolítica CMS-2 é capaz de alterar, de forma seletiva em linhagem tumoral B16-F10, a expressão de importantes proteínas envolvidas em diferentes processos celulares, como a proliferação, a sobrevivência, a invasão, a motilidade, a diferenciação, a senescência e a apoptose. Essa modulação justifica, pelo menos parcialmente, os efeitos biológicos observados após a exposição com CMS-2, tais como a redução da viabilidade e da migração celular, relacionados com a expansão do tumor e invasividade, além da ativação de melanogênese (marcador de diferenciação celular), eventos que corroboram a atividade antimetastática observada em modelos experimentais.

8. PERSPECTIVAS

Como continuidade deste trabalho, pretendemos determinar o efeito de CMS-2:

1. na expressão de proteínas já comprovadamente relacionadas com as vias de proliferação, migração e sobrevivência celular, no intuito de corroborar os resultados obtidos com a análise proteômica;
2. na transcrição de proteínas que foram identificadas como diferentemente expressas na linhagem tumoral após o tratamento;
3. na relação de actina fibrilar e glomerular, como avaliação de alteração da morfologia celular;
4. na expressão/atividade de enzimas envolvidas na via da glicólise;
5. na produção/eliminação de espécies reativas de oxigênio;
6. na progressão do ciclo celular;
7. na localização subcelular da proteína proibitina 1.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahn, JY, Liu, X, Cheng, D, Peng, J, Chan, PK, Wade, PA, YK. Nucleophosmin/B23, a nuclear PI(3,4,5)P(3) receptor, mediates the antiapoptotic actions of NGF by inhibiting CAD. *Mol. Cell.* 18: 435-445, 2005.

Alfonso, P, Cañamero, M, Fernández-Carbonié, F, Núñez, A, Casal, JI. Proteome Analysis of Membrane Fractions in Colorectal Carcinomas by Using 2D-DIGE Saturation Labeling. *Journal of Proteome Research.* 7: 4247-4255, 2008.

Al-Ghoul, M, Brück, TB, Lauer-Fields, JL, Asirvatham, VS, Zapata, C, Kerr, RG, Fields, GB. Comparative proteomic analysis of matched primary and metastatic melanoma cell lines. *J Proteome Res.* 7(9): 4107-4118, 2008.

Almeida, VL, Leitão, A, Reina, LCB; Montanari, CA, Donnici, CL, Lopes, MTP. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo- celular não específicos que interagem com DNA: Uma Introdução. *Quím. Nova.* 28: 118-129, 2005.

Alonso, SR, Ortiz, P, Pollán, M, Pérez-Gómez, B, Sánchez, L, Acuña, MJ, Pajares, R, Martínez-Tello, FJ, Hortelano, CM, Piris, MA, Rodríguez-Peralto, JL.. Progression in cutaneous malignant melanoma is associated with distinct expression profile: a tissue microarray-based study. *Am. J. Pathol.* 164: 193-203, 2004.

American Type Culture Collection - www.atcc.org/, *visualizado em 16/07/2014.*

Anoopkumar-Dukie, S, Carey, JB, Conere, T, O'sullivan, E, van Pelt, FN, Allshire, A. Resazurin assay of radiation response in cultured cells. *Br J Radiol.* 78(934): 945-947, 2005.

Araújo, JR, Zago, MMF, Silva, SR. Perceptions of life and disease by women undergoing antineoplastic chemotherapy. *Rev. Min. Enferm.* 10(3):247-252, 2006.

Báez, R, Lopes, MT, Salas, CE, Hernández, M. In vivo antitumoral activity of stem pineapple (*Ananas comosus*) bromelain. *Planta Med.* 73(13): 1377-1383, 2007.

Baeza, G, Correa, D, Salas, C E. Proteolytic enzymes in *Carica candamarcensis*. *J.Sci. Food Agric.* 51: 1-9, 1990.

Bailey, CM, Morrison, JA, Kulesa, PM. Melanoma revives an embryonic migration program to promote plasticity and invasion. *Pigment Cell Melanoma Res.* 25(5): 573-583, 2012.

Banchereau, J. The long arm of the immune system. *Sci. Am.* 18(3): 56-63, 2008.

Bedard K, Szabo E, Michalak M, Opas M. Cellular functions of endoplasmic reticulum chaperones calreticulin, calnexin, and ERp57. *Int Rev Cytol.* 245: 91-121, 2005.

Bennett, DC, Philip J. Cooper, PJ, Hart, IR. A line of non-tumorigenic mouse melanocytes, syngeneic with the B16 melanoma and requiring a tumour promoter for growth. *Inr. I. Cancer.* 39: 414-418, 1987.

Bernard, K, Litman, E, Fitzpatrick, JL, Shellman, YG, Argast, G, Polvinen, K, Everett, AD, Fukasawa, K, Norris, DA, Ahn, NG, Resing, KA. Functional proteomic analysis of melanoma progression. *Cancer Res.* 63(20): 6716-6725, 2003.

Berthier-Vergnes, O, Kharbili, ME, de la Fouchardière, A, Pointecouteau, T, Verrando, P, Wierinckx, A, Lachuer, J, Le Naour, F, Lamartine J. Gene expression profiles of human melanoma cells with different invasive potential reveal TSPAN8 as a novel mediator of invasion. *Br J Cancer.* 104(1):155-165, 2011.

Bertwistle, D, Sugimoto, M, Sherr, C J. Physical and functional interactions of the ARF tumor suppressor protein with nucleophosmin/B23. *Mol. Cell. Biol.* 24: 985–996, 2004.

Beuth, J, Ost, B, Pakdaman, A, Rethfeldt, E, Bock, PR, Hanisch, J, Schneider, B. Impact of complementary oral enzyme application on the postoperative treatment results of breast cancer patients--results of an epidemiological multicentre retrolective cohort study. *Cancer Chemother Pharmacol.* 47 Suppl: S45-54, 2001.

Bhui, K, Prasad, S, George, J, Shukla, Y. Bromelain inhibits COX-2 expression by blocking the activation of MAPK regulated NF-kappa B against skin tumor-initiation triggering mitochondrial death pathway. *Cancer Lett.* 282(2): 167-176, 2009.

Bianchi, L, Canton, C, Bini, L, Orlandi, R, Menard, S, Armini, A, Cattaneo, M, Pallini, V, Bernardi, LR, and Biunno, I, Protein profile changes in the human breast cancer cell line MCF-7 in response to SEL1L gene induction. *Proteomics*. 5: 2433-2442, 2005.

Bilheiro RP, Braga AD, Filho ML, Carvalho-Tavares J, Agero U, Carvalho Md, Sanchez EF, Salas CE, Lopes MT. The thrombolytic action of a proteolytic fraction (P1G10) from *Carica candamarcensis*. *Thromb Res*. 131(4): 175-182, 2013.

Boissy, RE. Melanosome transfer to and translocation in the keratinocyte. *Exp Dermatol. Suppl* 2: 5-12, 2003.

Borer, RA, Lehner, CF, Eppenberger, HM, Nigg EA. Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm. *Cell*. 56: 379-90, 1989.

Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitative estimation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem*. 72: 248-254, 1976.

Braga, AD. Efeito da fração proteolítica do látex de *Vasconcellea cundinamarcensis*, P1G10, sobre o processo inflamatório tumoral. 133f. 2013. Dissertação (Programa de Pós- Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais

Brahimi, C, Pouysségur, J. The role of the hypoxia inducible factor in tumor metabolism growth and invasion. *J. Bull. Cancer*. 93(8): 73-80, 2006.

Bravo, LM, Hermosilla, J, Salas, C. A biochemical comparison between latex from *C. candamarcensis* and *C. papaya*. *Braz. J. Med. Biol. Res*. 27: 2831-2862, 1994.

Breindel, JL, Haskins, JW, Cowell, EP, Zhao, M, Nguyen, DX, Stern, DF. EGF receptor activates MET through MAPK to enhance non-small cell lung carcinoma invasion and brain metastasis. *Cancer Res*. 73(16): 5053-65, 2013.

Brinckerhoff, CE, Matrisian, LM. Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 3(3): 207-214, 2002.

Brogden, RN & Chrisp, P. Flutamide. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in advanced prostatic cancer. *Drugs Aging*. 1(2):104-115, 1991.

Calderwood, SK, Khaleque, MA, Sawyer, DB, Ciocca, DR. Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis. *Trends Biochem Sci*. 31: 164-172, 2006.

Carreira, S, Goodall, J, Denat, L, Rodriguez, M, Nuciforo, P, Hoek, KS, Testori, A, Larue, L, Goding, CR. Mitf regulation of Dia1 controls melanoma proliferation and invasiveness. *Genes Dev*. 20(24): 3426-3439, 2006.

Carta, F, Demuro, PP, Zanini, C, Santona, A, Castiglia, D, D'Atri, S, Ascierio, PA, Napolitano, M, Cossu, A, Tadolini, B, Turrini, F, Manca, A, Sini, MC, Palmieri, G, Rozzo, AC. Analysis of candidate genes through a proteomics-based approach in primary cell lines from malignant melanomas and their metastases. *Melanoma Res*. 15(4): 235-244, 2005.

Chan, RJ, Webster, J, Chung, B, Marquart, L, Ahmed, M, Garantzotis, S. Prevention and treatment of acute radiation-induced skin reactions: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *BMC Cancer*. 14:53-27, 2014.

Chang, HY, Lawless, C, Addinall, SG, Oexle, S, Taschuk, M, Wipat, A, Wilkinson, DJ, Lydall, D. Genome-wide analysis to identify pathways affecting telomere-initiated senescence in budding yeast. *G3 (Bethesda)*. 1(3):197-208, 2011.

Chen, X, Mo, P, Li, X, Zheng, P, Zhao, L, Xue, Z, Ren, G, Han, G, Wang, X, Fan, D. CacyBP/SIP protein promotes proliferation and G1/S transition of human pancreatic cancer cells. *Mol Carcinog*. 50: 804-810, 2011.

Chen, X, Mo, P, Li, X, Zheng, P, Zhao, L, Xue, Z, Ren, G, Han, G, Wang, X, Fan, D. CacyBP/SIP protein promotes proliferation and G1/S transition of human pancreatic cancer cells. *Mol Carcinog*. 50: 804-810, 2011.

Cho, HJ, Park, SM, Kim, IK, Nam, IK, Baek, KE, Im, MJ, Yoo, JM, Park, SH, Ryu, KJ, Han, HT, Kim, HJ, Hong, SC, Kim, KD, Pak, Y, Kim, JW, Lee, CW, Yoo, J. RhoGDI2 promotes epithelial-mesenchymal transition via induction of Snail in gastric cancer cells. *Oncotarget*. 5(6):1554-1564, 2014.

Chobotova, K, Vernallis, AB, Majid, FAA. Bromelain's activity and potential as an anti-cancer agent: Current evidence and perspectives. *Cancer Letters*. 290: 148-156, 2010.

Chothia C, Jones EY. The molecular structure of cell adhesion molecules. *Annu Rev Biochem*. 66: 823-62, 1997.

Chowdhury, I, Thompson, WE, Thomas, K. Prohibitins role in cellular survival through Ras-Raf-MEK-ERK pathway. *J Cell Physiol*. 229(8): 998-1004, 2014.

Collins, I, Garrett, MD. Targeting the cell division cycle in cancer: CDK and cell cycle checkpoint kinase inhibitors. *Curr. Opin. Pharmacol*. 5: 366-373, 2005.

Colombo, E., Marine, J. C., Danovi, D., Falini, B. & Pelicci, P. G. Nucleophosmin regulates the stability and transcriptional activity of p53. *Nature Cell. Biol*. 4: 529–533, 2002.

Cortes, P, Méndez, M, Riser, BL, Guérin, CJ, Rodríguez-Barbero, A, Hassett, C, Yee, J. F-actin fiber distribution in glomerular cells: structural and functional implications. *Kidney Int*. 58(6): 2452-61, 2000.

Cunha, ES, Kawahara, R, Kadowaki, MK, Amstalden, HG, Noieto, GR, Cadena, SM, Winnischofer, SM, Martinez, GR. Melanogenesis stimulation in B16-F10 melanoma cells induces cell cycle alterations, increased ROS levels and a differential expression of proteins as revealed by proteomic analysis. *Exp Cell Res*. 318(15): 1913-1925, 2012.

Dale, PS, Tamhankar, CP, George, D, Daftary, GV. Co-medication with hydrolytic enzymes in radiation therapy of uterine cervix: evidence of the reduction of acute side effects. *Cancer Chemother Pharmacol. Suppl*: S29-34, 2001.

Damsky, WE, Curley, DP, Santhanakrishnan, M, Rosenbaum, LE, Platt, JT, Gould, Rothberg, BE, Taketo, MM, Dankort, D, Rimm, DL, McMahon, M, Bosenberg, M. β -catenin signaling controls metastasis in Braf-activated Pten-deficient melanomas. *Cancer Cell*. 20(6): 741-54, 2011.

Deryugina, EI, Quigley, JP. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Met. Rev*. 25: 9-34, 2006.

Desser, L, Holomanova, D, Zavadova, E, Pavelka, K, Mohr, T, Herbacek, I. Oral therapy with proteolytic enzymes decreases excessive TGFbeta levels in human blood. *Cancer Chemother Pharmacol.* 47: S10-S15, 2001.

Dittz, D, Figueiredo, C, Lemos, FO, Viana, CTR, Andrade, SP, Souza-Fagundes, EM, Fujiwara, RT, Salas, CE, Lopes, MTP The antitumoral activity of proteases from *C. candamarcensis* on murine melanoma B16F1 involves antiangiogenic action, loss of cell adhesion and apoptosis. Artigo submetido.

Dittz, D. Efeito antimetastático e mecanismos de ação de proteases do látex de *Vasconcellea cundinamarcensis*. 109f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

Figueiredo, C. Avaliação das propriedades antitumoral e antimetastática de fração proteolítica do látex de *Carica candamarcensis* em modelo de melanoma murino. 87f. 2009. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

Fonseca Pires, S, Fialho, LC Jr, Silva, SO, Melo, MN, de Souza, CC, Tafuri, WL, Bruna Romero, O, de Andrade, HM. Identification of virulence factors in leishmania infantum strains by a proteomic approach. *J Proteome Res.* 13(4):1860-1872, 2014.

Foster, I. Cancer: a cell cycle defect. *Radiography.* 14: 144-149, 2008

Franceschini, A, Szklarczyk, D, Frankild, S, Kuhn, M, Simonovic, M, Roth, A, Lin, J, Minguez, P, Bork, P, von Mering, C, Jensen, LJ. STRING v9.1: protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration. *Nucleic Acids Res.* 2013 doi: 10.1093/nar/gks1094

Freitas, K M. Avaliação dos efeitos da fração proteolítica P1G10 de *Vasconcellea cundinamarcensis* sobre a cicatrização de lesões cutâneas excisionais em camundongo. 63f. 2011. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

Frippiat, C, Chen, QM, Zdanov, S, Magalhaes, JP, Remacle, J, Toussaint, O. Subcytotoxic H₂O₂ stress triggers a release of transforming growth factor-beta 1, which induces biomarkers of cellular senescence of human diploid fibroblasts. *J Biol Chem.* 276(4): 2531-7, 2001.

Fusaro, G, Dasgupta, P, Rastogi, S, Joshi, B, Chellappan, S. Prohibitin induces the transcriptional activity of p53 and is exported from the nucleus upon apoptotic signaling. *J Biol Chem.* 278(48): 47853-61, 2003.

Garbe, C. - Diagnosis and treatment of cutaneous melanoma - 2005. In: 6th World Congress on Melanoma - Book of abstracts. Vancouver, 2005. p.46.

Gerard, G. Anticancer treatment and bromelain. *Agressologie.* 4: 261-274,1974.

Ghosh, D, Li, Z, Tan, XF, Lim, TK, Mao, Y, Lin, Q. iTRAQ Based Quantitative Proteomics Approach Validated the Role of Calcyclin Binding Protein (CacyBP) in Promoting Colorectal. *Mol Cell Proteomics.* 12(7): 1865-80, 2013

Gomes MT, Turchetti AP, Lopes MT, Salas CE. Stimulation of fibroblast proliferation by the plant cysteine protease CMS2MS2 is independent of its proteolytic activity and requires ERK activation. *Biol Chem.* 390(12): 1285-1291, 2009.

Gomes, FSL, Spínola, CV, Ribeiro, H A, Lopes MT, Cassali GD, Salas CE. Wound-healing activity of a proteolytic fraction from *Carica candamarcensis* on experimentally induced burn. *Burns.* 36: 277-283, 2010.

Gomes, FSL. Efeito da fração proteolítica de *Carica candamarcensis* na cicatrização cutânea: avaliação pré-clínica e clínica fase I. 270f. 2009. Tese (Programa de Pós-Graduação em Enfermagem da Escola de Enfermagem), Escola de Enfermagem, Universidade Federal de Minas Gerais.

Gomes, MTR, Mello, VJ, Rodrigues, KC, Bemquerer, MP, Lopes, MTP, Faça, VM, Salas, CE. Isolation of two plant proteinases in latex from *Carica candamarcensis* acting as mitogenic for mammalian cells. *Planta Med.*, 71: 244-248, 2005.

Goodson AG, Grossman D. Strategies for early melanoma detection: Approaches to the patient with nevi. *J Am Acad Dermatol.*60(5): 719-735,2009.

Görg, A, Weiss, W, Dunn, MJ. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*. 4(12): 3665-85, 2004.

Gregory-Bass, RC, Olatinwo, M, Xu, W, Matthews, R, Stiles, JK, Thomas, K, Liu, D, Tsang, B, Thompson, WE. Prohibitin silencing reverses stabilization of mitochondrial integrity and chemoresistance in ovarian cancer cells by increasing their sensitivity to apoptosis. *Int J Cancer*.122(9): 1923-30, 2008.

Grisendi, S, Mecucci, C, Falini, B, Pandolfi, PP. Nucleophosmin and cancer. *Nat Rev Cancer*. 6(7): 493-505, 2006.

Guimarães, CA, Linden, R. Programmed cell deaths. *Eur J Bioc*. 271(9): 1638-1650, 2004.

Guimarães-Ferreira, CA, Rodrigues, EG, Mortara, RA, Cabra, I H, Serrano, FA, Ribeiro-dos-Santos, R, Travassos, LR. Antitumor effects in vitro and in vivo and mechanisms of protection against melanoma B16F10-Nex2 cells by fastuosain, a cysteine proteinase from *Bromelia fastuosa*. *Neoplasia*. 9(9): 723-733, 2007.

Gujral, MS, Patnaik, PM, Kaul, R, Parikh, HK, Conradt, C, Tamhankar, CP, Daftary, GV. Efficacy of hydrolytic enzymes in preventing radiation therapy-induced side effects in patients with head and neck cancers. *Cancer Chemother Pharmacol*. 47 Suppl: S23-28, 2001.

Guo, C, Liu, S, Wang, J, Sun, MZ, Greenaway, FT. ACTB in cancer. *Clin Chim Acta*. 417:39-44, 2013.

Guo, H, Yang, K, Deng, F, Xing, Y, Li, Y, Lian, X, Yang, T. Wnt3a inhibits proliferation but promotes melanogenesis of melan-a cells. *Int J Mol Med*. 30(3):636-642, 2012.

Haass, NK, Smalley, KS, Herlyn, M. The role of altered cell-cell communication in melanoma progression. *J Mol Histol*. 35(3): 309-18, 2004.

Haass, NK, Smalley, KS, Li, L, Herlyn, M. Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma. *Pigment Cell Res*. 18(3): 150-9, 2005.

Han, MJ, Herlyn, M, Fisher, AB, Speicher, DW. Microscale solution IEF combined with 2-D DIGE substantially enhances analysis depth of complex proteomes such as mammalian cell and tissue extracts *Electrophoresis*. 29: 695–705, 2008.

- Hanahan, D, Weinberg, RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 144(5):646-74, 2011.
- Hartl FU. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381: 571–579, 1996.
- Hata, K, Hori, K, Takahashi, S. Role of p38 MAPK in lupeol-induced B16 2F2 mouse melanoma cell differentiation. *J Biochem*. 134(3): 441-5, 2003.
- Hofmann, UB, Houben, R, Bröcker, EB, Becker, JC. Role of matrix metalloproteinases in melanoma cell invasion. *Biochimie*. 87(3-4): 307-14, 2005.
- Hsu, CY, Yung, BY. Down-regulation of nucleophosmin/B23 during retinoic acid-induced differentiation of human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Oncogene* 16: 915–923, 1998.
- INCA. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de prevenção e vigilância de câncer. Estimativas 2010. Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/oquee>. Acesso: 19 de abril de 2010.
- Inder KL, Hill MM, Hancock JF. Nucleophosmin and nucleolin regulate K-Ras signaling. *Commun Integr Biol* 3: 188–190, 2010.
- Inder, KL, Lau, C, Loo, D, Chaudhary, N, Goodall, A, Martin, S, Jones, A, van der Hoeven, D, Parton, RG, Hill, MM, Hancock, JF. Nucleophosmin and nucleolin regulate K-Ras plasma membrane interactions and MAPK signal transduction. *J Biol Chem* 284: 28410–28419, 2009.
- Ishiguro, T, Nakajima, M, Naito, M, Muto, T, Tsuruo, T. Identification of genes differentially expressed in B16 murine melanoma sublines with different metastatic potentials. *Cancer Res*. 56: 875–879, 1996.
- Jaattela M. Escaping cell death: survival proteins in cancer. *Exp Cell Res*. 248: 30–43, 1999.
- Ji, Z, Flaherty, KT, Tsao, H. Molecular therapeutic approaches to melanoma. *Mol Aspects Med*. 31(2): 194-204, 2010.

Jiang, PS, Yung, BY. Down-regulation of nucleophosmin/B23 mRNA delays the entry of cells into mitosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 257: 865–870, 1999.

Jurisić, V, Konjević, G, Banićević, B, Duricić, B, Spuzić, I. Different alterations in lactate dehydrogenase activity and profile of peripheral blood mononuclear cells in Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphomas. *Eur J Haematol.* 64(4): 259-66, 2000.

Kalra, N, Bhui, K, Roy, P, Srivastava, S, George, J, Prasad, S, Shukla, Y. Regulation of p53, nuclear factor kappaB and cyclooxygenase-2 expression by bromelain through targeting mitogen-activated protein kinase pathway in mouse skin. *Toxicol Appl Pharmacol.* 226(1): 30-37, 2008.

Kasibhatla, S, Gourdeau, H, Meerovitch, K, Drewe, J, Reddy, S, Qiu, L, Zhang, H, Bergeron, F, Bouffard, D, Yang, Q, Herich, J, Lamothe, S, Cai, SX, Tseng, B. Discovery and mechanism of action of a novel series of apoptosis inducers with potential vascular targeting activity. *Mol Cancer Ther.* 3(11): 1365-74, 2004.

Katz, SJ, Lantz, PM, Janz, NK, Fagerlin, A, Schwartz, K, Liu, L, Deapen, D, Salem, B, Lakhani, I, Morrow, M. Patient involvement in surgery treatment decisions for breast cancer. *J Clin Oncol.* 23(24): 5526-5533, 2005.

Kawase, A, Kushimoto, T, Kawa, Y, Ohsumi, K, Nishikawa, H, Kawakami, T, Mizoguchi, M, Soma, Y. Proteomic analysis of immature murine melanocytes at different stages of maturation: a crucial role for calreticulin. *J Dermatol Sci.* 49(1): 43-52, 2008.

Kilanczyk, E, Filipek, S, Jastrzebska, B, Filipek, A. CacyBP/ SIP binds ERK1/2 and affects transcriptional activity of Elk-1. *Biochem Biophys Res Commun* 380(1): 54–59, 2009.

Kim, JE, Stones, C, Joseph, WR, Leung, E, Finlay, GJ, Shelling, AN, Phillips, WA, Shepherd PR, Baguley BC. Comparison of growth factor signalling pathway utilisation in cultured normal melanocytes and melanoma cell lines. *BMC Cancer.* 12: 141-151, 2012.

Kim, SH, Kim, Y, Kim, M, Kim, DS, Lee, SC, Chi, SW, Lee, DH, Park, SG, Park, BC, Bae, KH, Kang, S. Comparative Proteomic Analysis of Mouse Melanoma Cell Line B16, a Metastatic Descendant B16F10, and B16 Overexpressing the

Metastasis-Associated Tyrosine Phosphatase PRL-3. *Oncology Research*. 17: 601–612, 2009.

Kirkham, N, Price, ML, Gibson, B, Leigh, IM, Coburn, P, Darley, CR. Type VII collagen antibody LH 7.2 identifies basement membrane characteristics of thin malignant melanomas. *J. Pathol*. 157(3): 243–247, 1989.

Kitano, S, Kitajima, M, Konishi, F, Kondo, H, Satomi, S, Shimizu, N. A multicenter study on laparoscopic surgery for colorectal cancer in Japan. *Surg Endosc*. 20(9): 1348-52, 2006.

Kondo, T, Kinouchi, H, Kawase, M, Yoshimoto, T. Differential response in the release of hydrogen peroxide between astroglial cells and endothelial cells following hypoxia/reoxygenation. *Neurosci Lett*. 215(2): 103-106, 1996.

Koukoulis, GK, Patriarca, C, Gould, VE. Adhesion molecules and tumor metastasis. *Hum Pathol*. 29:889-92, 1998.

Krüger, C, Greten, TF, Korangy, F. Immune based therapies in cancer. *Histol Histopathol*. 22(6): 687-96, 2007.

Kumar, R, Hall, A. Actin and microtubule cytoskeletons in the development and maintenance of cancer phenotypes. *Cancer Metastasis Rev*. 2009. doi: 10.1007/s10555-008-9164-5.

Kuphal, S, Bosserhoff, AK. E-cadherin cell-cell communication in melanogenesis and during development of malignant melanoma. *Arch Biochem Biophys*. 524(1): 43-7, 2012.

Laborde, E. Glutathione transferases as mediators of signaling pathways involved in cell proliferation and cell death. *Cell Death and Differentiation*, 17: 1373–1380, 2010.

Laemmli, U.K. Protein in electrophoresis in slab gels. *Nature*. 227: 680-683, 1970.

Lai, S, Piras, F, Spiga, S, Perra, MT, Minerba, L, Piga, M, Mura, E, Murtas D, Demurtas, P, Corrias, M, Maxia, C, Ferreli, C, Sirigu, P. Nestin and vimentin colocalization affects the subcellular location of glucocorticoid receptor in cutaneous melanoma. *Histopathology*. 62(3): 487-98, 2013.

- Lauer, D, Müller, R, Cott, C, Otto, A, Naumann, M, Birkenmeier, G. Modulation of growth factor binding properties of alpha2-macroglobulin by enzyme therapy. *Cancer Chemother Pharmacol.* 47 Suppl: S4-9, 2001.
- Lee, LS, Cho, CW, Hong, HD, Lee, YC, Choi, UK, Kim, YC. Hypolipidemic and antioxidant properties of phenolic compound-rich extracts from white ginseng (*Panax ginseng*) in cholesterol-fed rabbits. *Molecules.* 18(10): 12548-60, 2013.
- Leipner, J, Saller, R. Systemic enzyme therapy in oncology: effect and mode of action. *Drugs.* 59(4): 769-780, 2000.
- Lemos FO, Ferreira LA, Cardoso VN, Cassali GD, Salas CE, Lopes MT. Skin-healing activity and toxicological evaluation of a proteinase fraction from *Carica candamarcensis*. *European Journal of Dermatology.* 21(5): 722-730, 2011.
- Lemos, FO. Parâmetros farmacocinéticos da fração cromatográfica proteolítica P1G10 do látex de *Carica candamarcensis*. 112f. 2009. Dissertação (Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.
- Leon, J. *Botánica de Los Cultivos Tropicales.* San Jose: IICA, 445, 1987.
- Leong, SP, Mihm, MC Jr, Murphy, GF, Hoon, DS, Kashani-Sabet, M, Agarwala, SS, Zager, JS, Hauschild, A, Sondak, VK, Guild, V, Kirkwood, JM. Progression of cutaneous melanoma: implications for treatment. *Clin Exp Metastasis.* 29(7): 775-96, 2012.
- Li, M, Zhang, B, Sun, B, Wang, X, Ban, X, Sun, T, Liu, Z, Zhao, X. A novel function for vimentin: the potential biomarker for predicting melanoma hematogenous metastasis. *J Exp Clin Cancer Res.* 2010. doi: 10.1186/1756-9966-29-109.
- Liang, CC, Park, AY, Guan, JL. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc.* 2(2):329-33, 2007.
- Lin, ST, Chou, HC, Chang, SJ, Chen, YW, Lyu, PC, Wang, WC, Chang, MDT, Chan HL. Proteomic analysis of proteins responsible for the development of doxorubicin resistance in human uterine cancer cells. *Journal of Proteomics.* 75: 5822 - 5847, 2012.

Liu, CX, Zhou, HC, Yin, QQ, Wu, YL, Chen, GQ. Targeting peroxiredoxins against leukemia. *Exp Cell Res.* 319(2): 170-6, 2013.

Loguercio, L, Bravo, LM, Salas, C. Partial characterization of a novel substance from *Carica candamarcensis* endowed with mitogenic activity. Vth International Congress on Cell Biology. Madrid, Spain, 1990.

Lopes, MTP, Dittz, D, Figueiredo, C, Viana, CTR, Salas, CE. Antitumoral and antimetastatic activities of a proteolytic fraction from *Carica candamarcensis* latex. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology.* 107: 162-692, 2010.

López-Otín, C, Palavalli, LH, Samuels, Y. Protective roles of matrix metalloproteinases: from mouse models to human cancer. *Cell Cycle.* 8(22): 3657-3662, 2009.

Loubeau, G, Boudra, R, Maquaire, S, Lours-Calet, C, Beaudoin, C, Verrelle, P, Morel, L. NPM1 silencing reduces tumour growth and MAPK signalling in prostate cancer cells. *PLoS One.* 2014 doi:10.1371/journal.pone.0096293

Lu, J, Tan, M, Cai, Q. The Warburg effect in tumor progression: Mitochondrial oxidative metabolism as an anti-metastasis mechanism. *Cancer Lett.* 2014 doi: 10.1016/j.canlet.2014.04.001.

Lundberg, AS, Weinberg, RA. Control of cell cycle and apoptosis. *Eur. J. Cancer.* 35(4): 531-539, 1999.

Martindale, DW, Wilson, MD, Wang, D, Burke, RD, Chen, X, Duronio, V, Koop, BF. Comparative genomic sequence analysis of the Williams syndrome region (LIMK1- RFC2) of human chromosome 7q11.23. *Mamm Genome.* 11: 890–8, 2000.

Mazzone, M, Comoglio, PM. The met pathway: master switch and drug target in cancer progression. *The FASEB Journal.* 20: 1611-1621, 2006.

McGary, EC, Lev, DC, Bar,-Eli M. Cellular adhesion pathways and metastatic potential of human melanoma. *Cancer Biol. Ther.* 1(5): 459-465, 2002.

Mello, VJ, Gomes MT, Lemos FO, Delfino JL, Andrade SP, Lopes MT, Salas CE. The gastric ulcer protective and healing role of cysteine proteinases from *Carica candamarcensis*. *Phytomedicine.* 15(4):237-244, 2008.

Mello, VJ, Gomes, MTR, Rodrigues, KCL, Sanchez, EF, Lopes, MTP, Salas, CE. Plant Proteinases: their potential as therapeutic drugs. In: Govil, JN, Singh, VK, Arunachalam, C. Drug Development from molecules. Texas: Studium Press, 2006. p 211-224.

Minarowska, A, Gacko, M, Karwowska, A, Minarowski, T. Human cathepsin D. *Folia Hist. Cytob.* 46(1): 23-28, 2008.

Mishra, S, Ande, SR, Nyomba, BL. The role of prohibitin in cell signaling. *FEBS J.* 277(19): 3937-46, 2010.

Morris SD. Heat shock proteins and the skin. *Clin Exp Dermatol.* 27:220–224, 2002.

Muñiz Lino, MA, Palacios-Rodríguez, Y, Rodríguez-Cuevas, S, Bautista-Piña, V, Marchat, LA, Ruíz-García, E, Astudillo-de la, Vega H, González-Santiago, AE, Flores-Pérez, A, Díaz-Chávez, J, Carlos-Reyes, A, Alvarez-Sánchez, E, López-Camarillo, C. Comparative proteomic profiling of triple-negative breast cancer reveals that up-regulation of RhoGDI-2 is associated to the inhibition of caspase 3 and caspase 9. *J Proteomics.* S1874-3919, 2014.

Nagase, H, Woessner, JF. Matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* 274: 1491-1494, 1999.

Nagle, RB, Hao, J, Knox, JD, Dalkin, BL, Clark, V, Cress, AE. Expression of hemidesmosomal and extracellular matrix proteins by normal and malignant human prostate tissue. *Am J Pathol.* 146(6): 1498-1507, 1995.

Nakamura, D, Yoshikawa, N, Yamaguchi, Y, Kagota, S, Shinozuka, K, Kunitomo, M. Characterization of mouse melanoma cell lines by their mortal malignancy using an experimental metastatic model. *Life Sci.* 70:791-798, 2002.

Neuhoff, V, Arold, N, Taube, D, Ehrhardt, W. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis.* 9(6):255-262, 1988.

Obchoei, S, Wongkhan, S, Wongkham, C, Li, M, Yao, Q, Chen, C. Cyclophilin A: potential functions and therapeutic target for human cancer. *Med Sci Monit.* 15(11): RA221-32, 2009.

Ogawa, K, Utsunomiya, T, Mimori, K, Tanaka, Y, Tanaka, F, Inoue, H, Murayama, S, Mori, M. Clinical significance of elongation factor-1 delta mRNA expression in oesophageal carcinoma. *Br J Cancer*. 91(2):282-6, 2004.

Okuwaki, M, Tsujimoto, M, Nagata, K. The RNA binding activity of a ribosome biogenesis factor, nucleophosmin/B23, is modulated by phosphorylation with a cell cycle-dependent kinase and by association with its subtype. *Mol. Biol. Cell*. 13: 2016–2030, 2002.

Ossovskaya VS, Bunnett NW. Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease. *Physiol Rev*. 84(2): 579-621, 2004.

Overall, CM, López-Otín, C. Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. *Nat Rev Cancer*. 2(9): 657-72, 2002.

Pacheco, I, Buzea, C, Tron, V. Towards new therapeutic approaches for malignant melanoma. *Expert Rev Mol Med*. 2011 doi: 10.1017/S146239941100202X

Peng, XC, Gong, FM, Zhao, YW, Zhou, LX, Xie, YW, Liao, HL, Lin, HJ, Li, ZY, Tang, MH, Tong, AP. Comparative proteomic approach identifies PKM2 and cofilin-1 as potential diagnostic, prognostic and therapeutic targets for pulmonary adenocarcinoma. *PLoS One*. 2011. doi: 10.1371/journal.pone.0027309.

Peter, I, Mezzacasa, A, Ledonne, P, Dummer, R, Hemmi, S. Comparative analysis of immunocritical melanoma markers in the mouse melanoma cell lines B16, K1735 and S91- M3. *Melanoma Res*. 11: 21-30, 2001.

Popiela, T, Kulig, J, Hanisch, J, Bock, PR. Influence of a complementary treatment with oral enzymes on patients with colorectal cancers--an epidemiological retrolective cohort study. *Cancer Chemother Pharmacol*. 47 Suppl: S55-63, 2001.

Pyke, C, Rømer, J, Kallunki, P, Lund, LR, Ralfkiaer, E, Danø, K, Tryggvason, K. The gamma 2 chain of Kalinin/laminin 5 is preferentially expressed in invading malignant cells in human cancers. *Am. J. Pathol*. 145: 782-791, 1994.

Richter-Cook, NJ, Dever, TE, Hensold, JO, Merrick, WC. Purification and characterization of a new eukaryotic protein translation factor. Eukaryotic initiation factor 4H. *J Biol Chem*. 273: 7579–87, 1998.

Richter-Cook, NJ, Rogers, GW, Jr, Hensold, JO, Merrick, WC. Further biochemical and kinetic characterization of human eukaryotic initiation factor 4H. *J Biol Chem* 274: 35415–24, 1999.

Rocco, M, Malorni, L, Cozzolino, R, Palmieri, G, Rozzo, C, Manca, A, Parente, A, Chambery, A. Proteomic profiling of human melanoma metastatic cell line secretomes. *J Proteome Res.* 10(10): 4703-14, 2011.

Ruepp, A, Zollner, A, Maier, D, Albermann, K, Hani, J, Mokrejs, M, Tetko, I, Güldener, U, Mannhaupt, G, Münsterkötter, M, Mewes, HW. The FunCat, a functional annotation scheme for systematic classification of proteins from whole genomes. *Nucleic Acids Res.* 32(18): 5539-45, 2004.

Ryu, JH, Li, SH, Park, HS, Park, JW, Lee, B, Chun, YS. Hypoxia-inducible factor α subunit stabilization by NEDD8 conjugation is reactive oxygen species-dependent. *J Biol Chem.* 286(9): 6963-70, 2011.

Sabbah, M, Emami, S, Redeuilh, G, Julien, S, Prévost, G, Zimber, A, Ouelaa, R, Bracke, M, De Wever, O, Gespach, C. Molecular signature and therapeutic perspective of the epithelial-to-mesenchymal transitions in epithelial cancers. *Drug Resist Updat.* 11(4-5): 123-51, 2008.

Sakalová, A, Bock, PR, Dedík, L, Hanisch, J, Schiess, W, Gazová, S, Chabronová, I, Holomanova, D, Mistrík, M, Hrubisko, M. Retrospective cohort study of an additive therapy with an oral enzyme preparation in patients with multiple myeloma. *Cancer Chemother Pharmacol.* 47 Suppl: S38-44, 2001.

Salvesen, G. & Nagase, H. Inhibition of proteolytic enzymes. In: *Proteolytic enzymes: a practical approach*. Eds. IRL Press, Oxford, pp 83-104, 1990.

Santos, VG. Efeitos da fração proteolítica - P1G10- derivada do látex de *Vasconcellea cundinamarcensis* sobre o reparo ósseo: proliferação e diferenciação de osteoblastos. 93f. 2014. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

Schneider, G, Filipek, A. S100A6 binding protein and Siah- 1 interacting protein (CacyBP/SIP): spotlight on properties and cellular function. *Amino Acids.* 41: 773–780, 2011.

Schneider, G, Nieznanski, K, Jozwiak, J, Slomnicki, LP, Redowicz, MJ, Filipek, A. Tubulin binding protein, CacyBP/SIP, induces actin polymerization and may link actin and tubulin cytoskeletons. *Biochim Biophys Acta* 1803(11): 1308–1317, 2010.

Schowalter, MK, Dulmage, BO, Ho, J, Vu, JR, Falo, LD Jr, Geskin, LJ. Comparative proteomic analysis reveals unique tumor protein composition among the melanoma subtypes pure desmoplastic and superficial spreading. *Melanoma Research*. 24(4): 397-400, 2014.

Schroth, W, Antoniadou, L, Fritz, P, Schwab, M, Muerdter, T, Zanger, UM, Simon, W, Eichelbaum, M, Brauch, H. Breast cancer treatment outcome with adjuvant tamoxifen relative to patient CYP2D6 and CYP2C19 genotypes. *J Clin Oncol*. 25(33): 5187-5193, 2007.

Seiberg, M. Keratinocyte-melanocyte interactions during melanosome transfer. *Pigment Cell Res*. 14(4): 236-42, 2001.

Sessa, C, Guibal, A, Del Conte, G, Rüegg, C. Biomarkers of angiogenesis for the development of antiangiogenic therapies in oncology: tools or decorations? *Nat Clin Pract Oncol*. 5(7):378-391, 2008.

Shi, Y, Hu, W, Yin, F, Sun, L, Liu, C, Lan, M, Fan, D. Regulation of drug sensitivity of gastric cancer cells by human calcyclin- binding protein (CacyBP). *Gastric Cancer*. 7: 160–16, 2004.

Silva, ACA, Lemos, FO, Gomes, MTR, Salas, CE, Lopes, MTP. Role of gastric acid inhibition, prostaglandins and endogenous free thiol groups on the gastroprotective effect of a proteolytic fraction from *Vasconcellea cundinamarcensis* látex. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, aceito para publicação.

Silva, CA, Mello, VJ, Lopes, MTP, Val, CG, Gomes, MTR, Ferreira, RS, Rodrigues, KCL, Salas, CE. A mitogenic protein fraction in latex from *Carica candamarcensis*. *Plant Med.*, 69: 926-932, 2003.

Sloane, BF, Moin, K, Krepela, E, Rozhin, J. Cathepsin B and its endogenous inhibitors: the role in tumor malignancy. *Cancer Met. Rev*. 9(4): 333-352, 1990.

Song, MN, Moon, PG, Lee, JE, Na, M, Kang, W, Chae, YS, Park, JY, Park, H, Baek, MC. Proteomic analysis of breast cancer tissues to identify biomarker candidates by gel-assisted digestion and label-free quantification methods using LC-MS/MS. *Arch Pharm Res.* 35(10): 1839-47, 2012.

Soucy, TA, Dick, LR, Smith, PG, Milhollen, MA, Brownell, JE. The NEDD8 Conjugation Pathway and Its Relevance in Cancer Biology and Therapy. *Genes Cancer.* 1(7): 708-16, 2010.

Souza, GA, Godoy, LMF, Teixeira, VR, Otake, AH, Sabino, A, Rosa, JC, Dinarte, AR, Pinheiro, DG, Silva, WA, Eberlin, MN, Chammas, R, Greene, LJ. Proteomic and SAGE profiling of murine melanoma progression indicates the reduction of proteins responsible for ROS degradation. *Proteomics.* (6): 1460–147, 2006.

Srivastava P. Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol.* 2: 185–194, 2002.

Swalwell, H, Latimer, J, Haywood, RM, Birch-Machin, MA. Investigating the role of melanin in UVA/UVB- and hydrogen peroxide-induced cellular and mitochondrial ROS production and mitochondrial DNA damage in human melanoma cells. *Free Radic Biol Med.* 52(3):626-34, 2012.

Swick, JM, Maize, JC. Molecular biology of melanoma. *J Am Acad Dermatol.* 67(5): 1049-54, 2012.

Szajda, SD, Jankowska, A, Zwierz, K. Carbohydrate markers in colon carcinoma. *Dis. Mark..* 25:233–242, 2008.

Tahtamouni, LH, Shaw, AE, Hasan, MH, Yasin, SR, Bamburg, JR. Non-overlapping activities of ADF and cofilin-1 during the migration of metastatic breast tumor cells. *BMC Cell Biol.* 2013 doi: 10.1186/1471-2121-14-45.

Takemura, M, Sato, K, Nishio, M, Akiyama, T, Umekawa, H, et al. Nucleolar protein B23.1 binds to retinoblastoma protein and synergistically stimulates DNA polymerase alpha activity. *J Biochem* 125: 904–909, 1999.

Takemura, M, Sato, K, Nishio, M, Akiyama, T, Umekawa, H, Yoshida, S. Nucleolar protein B23.1 binds to retinoblastoma protein and synergistically stimulates DNA polymerase α activity. *J. Biochem. (Tokyo)* 125: 904–909 (1999).

Tamura, Y, Peng, P, Liu, K, Daou, M, Srivastava, PK. Immunotherapy of tumors with autologous tumor-derived heat shock protein preparations. *Science*. 278: 117–120, 1997.

Tan, S, Tan, HT and Chung, MCM. Membrane proteins and membrane proteomics. *Proteomics*. 8: 3924–3932, 2008.

Tannu, NS, Hemby, SE. Two- dimensional fluorescence difference gel electrophoresis for comparative proteomics profiling. *Nat Protoc*. 1(4):1732-1742, 2006.

Teixeira RD, Ribeiro HA, Gomes MT, Lopes MT, Salas CE. The proteolytic activities in latex from *Carica candamarcensis*. *Plant Physiol Biochem*. 46(11): 956-961, 2008.

Tew, KD, Townsend, DM. Glutathione-s-transferases as determinants of cell survival and death. *Antioxid Redox Signal*. 17(12): 1728-37, 2012.

Theiss, AL, Sitaraman, SV. The role and therapeutic potential of prohibitin in disease. *Biochim Biophys Acta*. 1813(6): 1137-43, 2011.

Thorne, JL, Campbell, MJ. Nuclear receptors and the Warburg effect in cancer. *Int J Cancer*. 2014. doi: 10.1002/ijc.29012.

Tomonaga, T, Matsushita, K, Yamaguchi, S, Oh-Ishi, M, Kodera, Y, Maeda, T, Shimada, H, Ochiai, T, Nomura, F. Identification of altered protein expression and post- translational modifications in primary colorectal cancer by using agarose two- dimensional gel electrophoresis. *Clin Cancer Res*. 10: 2007–14, 2004.

Van Dyke, T, Jacks, T. Cancer modelling in the modern era: progress and challenges. *Cell*. 108: 135-44, 2002.

Van Eden, W, Koets, A, Van Kooten, P, Prejjen, B, Van Der Zee, R. Immunopotentiating heat shock proteins: negotiators between innate danger and control of autoimmunity. *Vaccine* 21: 897–901, 2003.

Van Troys, M, Huyck, L, Leyman, S, Dhaese, S, Vandekerckhove, J, Ampe, C. Ins and outs of ADF/cofilin activity and regulation. *Eur J Cell Biol*. 87(8-9): 649-67, 2008.

Vander Heiden, MG, Cantley, LC, Thompson, CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*. 324(5930): 1029-33, 2009.

Verrills, NM, Pouha, ST, Liu, ML, Liaw, TY, Larsen, MR, Ivery, MT, Marshall, GM, Gunning, PW, Kavallaris, M. Alterations in gamma-actin and tubulin-targeted drug resistance in childhood leukemia. *J Natl Cancer Inst*. 98(19): 1363-74, 2006.

Viana, CTR. Avaliação da atividade antitumoral e imunomodulatória de fração proteolítica do látex de *Carica candamarcensis* Hook 1835 em modelo de carcinoma de Ehrlich. 69f. 2010. Dissertação (Programa de Pós- Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

Villagomez, M, Szabo, E, Podcheko, A, Feng, T, Papp, S, Opas, M. Calreticulin and focal-contact-dependent adhesion. *Biochem Cell Biol*. 87(4): 545-56, 2009.

Villalba, MIC, Silva, A, Tagliati, C., Salas, CE, Lopes, MT. Acute systemic toxicological and mutagenic evaluation of a proteolytic fraction from the latex of *Carica candamarcensis*. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 107: 162-692, 2010.

Visse, R, Nagase, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res*. 92(8): 827-39, 2003.

Wagner, JD, Gordon, MS, Chuang, TY, Coleman, JJ. 3rd Current therapy of cutaneous melanoma. *Plast. Reconstr. Surg*. 105: 1774-1799, 2000.

Wainstein & Belfort. Management of cutaneous melanoma. *Rev. Col. Bras. Cir*. 31(3): 204-214, 2004.

Wald, M, Olejár, T, Poucková, P, Zadinová, M. Proteinases reduce metastatic dissemination and increase survival time in C57Bl6 mice with the Lewis lung carcinoma. *Life Sci*. 63(17):PL237-43, 1998.

Wald, M, Olejár, T, Sebková, V, Zadinová, M, Boubelík, M, Poucková, P. Mixture of trypsin, chymotrypsin and papain reduces formation of metastases and extends survival time of C57Bl6 mice with syngeneic melanoma B16. *Cancer Chemother Pharmacol*. 47 Suppl:S16-22, 2001.

Wang, L, Wang, M, Wang, S, Qi, T, Guo, L, Li, J, Qi, W, Ampah, KK, Ba, X, Zeng, X. Actin polymerization negatively regulates p53 function by impairing its nuclear import in response to DNA damage. *PLoS One*. 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0060179

Wang, S, Nath, N, Adlam, M, Chellappan, S. Prohibitin, a potential tumor suppressor, interacts with RB and regulates E2F function. *Oncogene*. 18(23): 3501-10, 1999.

Weber MJ, Gioeli D. Ras signaling in prostate cancer progression. *J Cell Biochem* 91: 13–25, 2004.

Wetzels, RH, Kuijpers, HJ, Lane, EB, Leigh, IM, Troyanovsky, SM, Holland, R, van Haelst, UJ, Ramaekers, FC. Basal cell-specific and hyperproliferation-related keratins in human breast cancer. *Am. J. Pathol*. 138: 751-763, 1991.

Wilisch-Neumann, A, Pachow, D, Wallesch, M, Petermann, A, Böhmer, FD, Kirches, E, Mawrin, C. Re-evaluation of cytostatic therapies for meningiomas in vitro. *J Cancer Res Clin Oncol*. 140(8):1343-1352, 2014.

Wong, JC, Hasan, MR, Rahman, M, Yu, AC, Chan, SK, Schaeffer, DF, Kennecke, HF, Lim, HJ, Owen, D, Tai, IT. Nucleophosmin 1, upregulated in adenomas and cancers of the colon, inhibits p53-mediated cellular senescence. *Int J Cancer*. 133(7): 1567-77, 2013.

Wu, D, Matsushita, K, Matsubara, H, Nomura, F, Tomonaga, T. An alternative splicing isoform of eukaryotic initiation factor 4H promotes tumorigenesis in vivo and is a potential therapeutic target for human cancer. *Int J Cancer*. 128(5): 1018-30, 2011.

Wu, MH, Chang, JH, Yung, BY. Resistance to UV-induced cell-killing in nucleophosmin/B23 over-expressed NIH 3T3 fibroblasts: enhancement of DNA repair and up-regulation of PCNA in association with nucleophosmin/B23 over-expression. *Carcinogenesis*. 23(1): 93-100, 2002.

Wu, W, Zhao, S. Metabolic changes in cancer: beyond the Warburg effect. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 45(1): 18-26, 2013.

Wu, WW, Wang, G, Baek, SJ, Shen RF. Comparative Study of Three Proteomic Quantitative Methods, DIGE, cICAT, and iTRAQ, Using 2D Gel- or LC-MALDI TOF/TOF. *Journal of Proteome Research*. 5: 651 – 658, 2006.

Yajima, I, Kumasaka, MY, Thang, ND, Goto, Y, Takeda, K, Yamanoshita, O, Iida, M, Ohgami, N, Tamura, H, Kawamoto, Y, Kato, M. RAS/RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT Signaling in Malignant Melanoma Progression and Therapy. *Dermatol Res Pract*. 2012 doi:10.1155/2012/354191

Yang, J, Xie, Y, Wang, H, Yao, Y, Hou, J, Ma, Y, Zhang, Q, Xing, Y, Wu, J, Li, T, Zheng, J, Liu, J, Cao, R. Administration of heat shock protein 65 inhibits murine melanoma growth in vivo. *Mol Med Rep*. 7(1): 171-6, 2013.

Yun, JP, Chew, EC, Liew, CT, Chan, JY, Jin, ML, Ding, MX, Fai, YH, Li, HK, Liang, XM, Wu, QL. Nucleophosmin/B23 is a proliferate shuttle protein associated with nuclear matrix. *J. Cell Biochem*. 90: 1140–1148, 2003.

Zamanian, M, Veerakumarasivam, A, Abdullah, S, Rosli, R. Calreticulin and cancer. *Pathol Oncol Res*. 19(2): 149-54, 2013.

Zeller, KI, Haggerty, TJ, Barrett, JF, Guo, Q, Wonsey, DR, Dang, CV. Characterization of nucleophosmin (B23) as a Myc target by scanning chromatin immunoprecipitation. *J. Biol. Chem*. 276: 48285– 48291, 2001.

Zhang, B, Wang, Y, Su, Y. Peroxiredoxins, a novel target in cancer radiotherapy. *Cancer Lett*. 286(2): 154-60, 2009.

Zhao, W, Liu, H, Xu, S, Entschladen, F, Niggemann, B, Zanker, KS, Han, R. Migration and metalloproteinases determine the invasive potential of mouse melanoma cells, but not melanin and telomerase. *Cancer Lett*. 162: 49-55, 2001.

Zhao, Y, You, H, Liu, F, An, H, Shi, Y, Yu, Q, Fan, D. Differentially expressed gene profiles between multidrug resistant gastric adenocarcinoma cells and their parental cells. *Cancer Lett* 185: 211–218, 2002.

Zhu, H, Gooderham, N. Neoplastic transformation of human lung fibroblast MRC-5 SV2 cells induced by benzo[α]pyrene and confluence culture. *Cancer Res*. 62: 4605-4609, 2002.

ANEXO 1

Proteínas diferencialmente expressas entre as condições experimentais

Spot	Proteína	GI	Mr teórico pl teórico	Score	Cobertura (%)	Peptídeos	Abundância
1	Fosfoglicerato quinase	gij202423	/44508 /7.53	658	22	K.LGDVYVNDAFGTAHR.A K.ALESPERPFLAILGGAK.V K.ITLPVDFVTADKFDENAK.T K.QIWWNGPVGVFWEAFAR.G K.QIWWNGPVGVFWEAFAR.G K.DCVGPEVENACANPAAGTVILLENLR.F	BC<BT: 1.26 MC<BC: 2.33 MC<BT: 2.92
2	Enolase 1, (alfa)	gij59808815	/47128 /6.16	667	23	R.IGAEVYHNLK.N R.GNPTVEVDLYTAK.G R.YITPDQLADLYK.S K.LAQSNWGWVMVSHR.S R.AAVPSGASTGIYEALER.D K.LAMQEFMILPVGASSFR.E K.AGYTDQVVIGMDVAASEFYR.S	BC>BT: 2.61 MC=BC MC>BT: 3.54
3	Proteína de choque térmico 65	gij51455	/60903 /5.91	871	16	R.TVIIQSWGSPK.V R.AAVEEGIVLGGGCALLR.C K.ISSVQSIVPALEIANHR.K R.KPLVIIAEDVDGEALSTLVLR.L K.LVQDVANNTNEEAGDGTATVLR.S	BC>BT: 1.14 MC=BC MC=BT
	Beta-actina (aa 27-375), putativo	gij49868	/39161 /5.78	629	22	R.AVFPSIVGR.S R.GYSFTTAAER.E K.QEYDESGPSIVHR.K K.IWHHTFYNELR.V K.SYELPDGQVITIGNER.F K.DLYANTVLSGGTTMYPGIADR.M K.DLYANTVLSGGTTMYPGIADR.M	
4	Proteína de choque térmico 70 cognata	gij309319	70793 5.37	646	14	K.FELTGIPPAPR.G K.VEIIANDQGNR.T R.FEELNADLFR.G R.RFDDAVVQSDMK.H R.TTPSYVAFTDTER.L K.STAGDTHLGGEDFDNR.M K.TVTNAVVTVPAYFNDSQR.Q	BC>BT: 1.34 MC=BC MC=BT

Continua/

/Continua

5	Fosfoglicerato mutase 1	gij114326546	28814 6.67	824	54	R.VLIAAHGNSLR.G R.HGESAWNLENR.F R.DAGYEFDIQFTSVQK.R R.FSGWYDADLSPAGHEEAK.R K.NLKPIKPMQFLGDEETVR.K K.NLKPIKPMQFLGDEETVR.K R.SYDVPPPPMEPDHPFYSNISK.D R.SYDVPPPPMEPDHPFYSNISK.D	BC<BT: 1.22 MC<BC: 1.27 MC<BT: 1.55
6	Gama-actina	gij809561	40992 5.56	691	25	K.AGFAGDDAPR.A R.GYSFTTTAER.E R.AVFPSIVGRPR.H K_QEYDESGPSIVHR.K K.IWHHTFYNELR.V K.SYELPDGQVITIGNER.F K.DLYANTVLSGGTTMYPGIADR.M K.DLYANTVLSGGTTMYPGIADR.M	BC>BT: 1.13 MC=BC MC=BT
	Beta-actina (aa 27-375), putativo	gij49868	39161 5.78	629	22	R.AVFPSIVGR.S R.GYSFTTTAER.E K_QEYDESGPSIVHR.K K.IWHHTFYNELR.V K.SYELPDGQVITIGNER.F K.DLYANTVLSGGTTMYPGIADR.M K.DLYANTVLSGGTTMYPGIADR.M	
7	Triosefosfato isomerase	gij54855	26679 6.90	516	25	K.IAVAAQNCYK.V K.SNVNDGVAQSTR.I R.HVFGESDELIGQK.V K.TATPQQAQEVHEK.L K.DLGATWVVLGHSER.R R.RHVFGESDELIGQK.V	BC<BT: 1.42 MC=BC MC<BT: 1.56
	1-Cis peroxirredoxina	gij4139186	24825 5.98	94	8	R.NFDEILR.V K.LSILYPATTGR.N	

Continua/

/Continua

8	Fosfoglicerato mutase 1	gij114326546	28814 6.67	824	54	R.HYGGGLTGLNK.A R.VLIAAHGNSLR.G R.HGESAWNLENR.F R.ALPFWNEEIVPQIK.E R.DAGYEFDIQFTSVQK.R R.FSGWYDADLSPAGHEEAK.R K.NLKPIKPMQFLGDEETVR.K K.NLKPIKPMQFLGDEETVR.K R.YADLTEDQLPSCESLKDTIAR.A	BC<BT: 1.25 MC=BC MC<BT: 1.37
9	Cofilina-1	gij6680924	18548 8.22	519	40	K.MLPDKDCR.Y K.AVLFCLESDKK.N K.LGGSAVISLEGKPL.- K.HELQANCYEEVK.D K.HELQANCYEEVKDR.C K.EILVGDVGGQTVDDPYTTFFVK.M	BC>BT: 1.35 MC=BC MC>BT: 1.50
10	Piruvato quinase M	gij551295	57824 7.58	687	24	K.GDYPLEAVR.M R.LDIDSAPITAR.N R.NTGIICTIGPASR.S K.IYVDDGLISLQVK.E K.DAVLNAWAEDVDLR.V R.FDEILEASDGIMVAR.G R.LNFSGTHEYHAETIK.N R.EAEAAIYHLQLFEELR.R R.EATESFASDPILYRPVAVALDTK.G	BC<BT: 1.12 MC=BC MC=BT
11	Proteína de choque térmico 70 cognata	gij309319	70793 5.37	646	14	K.FELTGIPPAPR.G K.VEIIANDQGNR.T R.FEELNADLFR.G R.RFDDAVVQSDMK.H R.TTPSYVAFTDTER.L K.STAGDTHLGGEDFDNR.M K.TVTNAVVTVPAYFNDSQR.Q	BC>BT: 1.12 MC>BC: 1.16 MC>BT: 1.30
	Inibidor da dissociação Rho gdpalfa (GDI)	gij13435747	23377 5.12	566	26	K.YIQHTYR.K K.TDYMVGSYGPR.A K.IDKTDYMVGSYGPR.A R.VAVSADPNVNPVIVTR.L K.SIQEIQLDKDDESLR.K K.SIQEIQLDKDDESLR.Y	

Continua/

/Continua

12	Nucleofosmina isoforma 1	gil6679108	32540 4.62	417	19	K.DLKPSTPR.S K.VDNDENEHQLSLR.T R.MTDQEAIQDLWQWR.K R.MTDQEAIQDLWQWR.K K.MSVQPTVSLGGFEITPPVLR.L K.MSVQPTVSLGGFEITPPVLR.L	BC>BT: 1.30 MC<BC: 1.40 MC=BT
13	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	gil6679937	35787 8.44	442	19	R.VPTPNVSVVDLTCR.L K.LVINGKPITIFQER.D K.LISWYDNEYGYSNR.V K.VIHDNFGIVEGLMTTVHAITATQK.T	BC<BT: 1.26 MC=BC MC<BT: 1.23
	Glutaciona S-transferase P 1	gil10092608	23594 7.68	216	12	-.PPYTIVYFPVR.G K.FEDGDLTLYQSNAILR.H	
14	Proteína de choque térmico 65	gil51455	60903 5.91	871	16	R.TVIIQSWGSPK.V R.AAVEEGIVLGGGCALLR.C K.ISSVQSIVPALEIANHR.K R.KPLVIAEDVDGEALSTLVLR.L K.LVQDVANNTNEEAGDGTTTATVLAR.S	BC>BT: 1.14 MC<BC: 1.18 MC=BT
	Chaperonina subunidade 8 (teta), isoforma CRA_b	gil148665922	54021 5.19	96	4	R.FAEAFEAIPIR.- -.LFVTNDAATILR.F	
15	Sui1 homólogo	gil4868333	12668 6.04	208	26	K.TLTTVQGIADDYDK.K K.GDDLLPAGTEDYIHIR.I	BC>BT: 1.23 MC=BC MC>BT: 1.38
	Inibidor de peptidase Serina (ou cisteína), subtipo H, membro 1, isoforma CRA_a	gil148684430	44954 9.01	94	2	R.DNQSGSLLFIGR.L	
16	Estatimina	gil9789995	17264 5.76	208	22	K.DKHVEEVR.K K.DKHVEEVRK.N K.ESVPDFPLSPPK.K R.ASGQAFELILSPR.S	BC>BT: 1.20 MC>BC: 1.56 MC>BT: 1.87
18	Proteína ligadora a calciclina	gil3142331	28301 7.78	175	17	K.TDTVIILCR.K K.ISNYGWDQSDK.F K.IYITLTGVHQVPTENVQVHFTER.S	BC>BT: 1.16 MC<BC: 1.21 MC=BT
	Fator de iniciação da tradução eucariótica 4H	gil15808988	27324 6.67	110	5	K.EALTYDGALLGDR.S	

Continua/

/Continua

19	Fosfoglicerato quinase	gij202423	44508 7.53	658	22	K.LGDVYVNDAFGTAHR.A K.ALESPERPFLAILGGAK.V K.ITLPVDFVTADKFDENAK.T K.QIVWNGPVGVFEWEAFAR.G K.QIVWNGPVGVFEWEAFAR.G K.DCVGPEVENACANPAAGTVILLENLR.F	BC<BT: 1.28 MC<BC: 2.21 MC<BT: 2.83
20	Proibitina	gij6679299	29802 5.57	265	16	R.FDAGELITQR.E K.DLQNVNITLR.I R.IYTSIGEDYDER.V R.KLEAAEDIAYQLSR.S	BC<BT: 1.13 MC=BC MC=BT
	Proteína contendo domínio glioxalase 4	gij255003777	33296 5.28	110	11	K.SDEWFATR.N R.FQTVHFFR.D K.LELQGIQGAVDHAAAFGR.I	
22	Proteína de controle da tradução tumoral	gij6678437	19450 4.76	146	13	K.GKLEEQKPER.V R.DLISHDELFSDIYK.I	BC>BT: 1.26 MC>BC: 1.39 MC>BT: 1.75
	Prostaglandina E sintase 3	gij9790017	18709 4.36	140	18	R.SILCCLR.K R.KGESGQSWPR.L K.LTFSCLLGGSDNFK.H	
	Fator de iniciação da tradução eucariótica 3 subunidade K isoforma 1	gij21312044	25070 4.81	87	5	R.YNPENLATLER.Y	
23	Proteína contendo tríade de histidina ligante de nucleotídeo 1	gij33468857	13768 6.36	533	71	K.IIFEDDR.C K.AQVAQPGGDTIFGK.I R.CLAFHDISPQAPTHFLVIPK.K R.MVVNEGADGGQSVYHIHLHVLGGR.Q R.MVVNEGADGGQSVYHIHLHVLGGR.Q K.KHISQISVADDDDESLLGHLMIVGK.K K.KHISQISVADDDDESLLGHLMIVGK.K	BC=BT MC<BC: 1.68 MC<BT: 1.50
24	Proteína precursora de dissulfeto-isomerase A3	gij112293264	56643 5.88	690	20	K.QAGPASVPLR.T K.DASVVGFFR.D K.FVMQEEFSR.D R.LAPEYAAAATR.L R.FAHTNIESLVK.E R.ELNDFISYLQR.E K.EYDDNGEGITIFRPLHLANK.F K.TFSHELSDFGLESTTGEVPVVAIR.T	BC=BT MC<BC: 1.36 MC<BT: 1.31

Continua/

/Continua

25	Proteína ligante a ácido graxo, isoforma epidermal 1	gij6754450	15127 6.14	320	32	K.ELGVGLALR.K K.FDETTADGR.K R.LMESHGFEEYMK.E R.LMESHGFEEYMK.E K.MIVECVMNNATCTR.V K.MIVECVMNNATCTR.V	BC=BT MC<BC: 1.35 MC<BT: 1.36
26	Proteína de choque térmico 10 kda, mitocondrial	gij6680309	10956 7.93	330	43	K.FLPLFDR.V R.KFLPLFDR.V K.VLLPEYGGTK.V K.VLQATVVAVGSGGK.G K.VVLDDKDYFLFR.D	BC=BT MC<BC: 1.57 MC<BT: 1.53
27	Enolase 1, (alfa)	gij59808815	47128 6.16	667	23	R.IGAEVYHNLK.N R.GNPTVEVDLYTAK.G R.YITPDQLADLYK.S K.LAQSNWGVMSHR.S R.AAVPSGASTGIYEALR.D K.LAMQEFMILPVGASSFR.E K.AGYTDQVVIGMDVAASEFYR.S	BC=BT MC<BC: 1.33 MC=BT
28	Citocromo b5	gij13385268	15232 4.96	426	41	K.STWVILHHK.V K.TYIIGELHPDDR.S K.FLEEHPGGEEVLR.E R.EQAGGDATENFEDVGHSTDAR.E	BC=BT MC<BC: 5.28 MC<BT: 5.03
29	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	gij6679937	35787 8.44	442	19	R.VPTPNVSVVDLTCR.L K.LVINGKPITIFQER.D K.LISWYDNEYGYSNR.V K.VIHDNFGIVEGLMTTVHAITATQK.T	BC=BT MC<BC: 1.21 MC<BT: 1.29
	L-lactato desidrogenase cadeia A isoforma 1	gij6754524	36475 7.62	151	9	K.LVIITAGAR.Q K.VTLTPEEEAR.L R.VIGSGCNLDSAR.F	

Continua/

/Continua

30	Proteína precursora de dissulfeto-isomerase A3	gij112293264	56643 5.88	690	20	K.QAGPASVPLR.T K.DASVVGFFR.D K.FVMQEEFSR.D R.LAPEYAAAATR.L R.FAHTNIESLVK.E R.ELNDFISYLQR.E K.EYDDNGEGITIFRPLHLANK.F K.TFSHELSDFGLESTTGEVPVVAIR.T	BC=BT MC<BC: 1.29 MC=BT
	Alfa-fetoproteína, parcial	gij191765	47195 5.47	212	9	K.APQVSTPTLVEAAR.N K.LGEYGFQNAIVR.Y K.DVFLGTFLYEYSR.R	
31	Fator de alongamento 1-delta	gij13124192	31274 4.91	272	17	R.ITSLEVENQNL.R.G R.FYEQMNGPVTSGSR.Q K.SLAGSSGPGASSGPGGDHSELIVR.I	BC=BT MC>BC: 1.19 MC=BT
32	Fosfoglicerato quinase	gij202423	44508 7.53	658	22	K.LGDVYVNDAFGTAHR.A K.ALESPERPFLAILGGAK.V K.ITLPVDFVTADKFDENAK.T K.QIVWNGPVGVFWEAFAR.G K.QIVWNGPVGVFWEAFAR.G K.DCVGPEVENACANPAAGTVILLENLR.F	BC=BT MC<BC: 1.80 MC<BT: 1.94
	Cadeia longa acil-coa desidrogenase	gij726095	48052 8.34	154	8	R.IFSSEHDIFR.E K.AQDTAELFFEDVR.L K.GFYLLMQELPQER.L	
	Proteína ligante a heparina 44	gij220434	42058 7.49	104	6	K.LIHNLNVILAR.Y K.IQEYNVLLDLSR.A	
33	Proteína ligante a beta-galactosídeos	gij193442	14796 5.32	341	33	K.LPDGHEFK.F K.EDGTWGTEHR.E K.DSNNLCLHFNPR.F R.FNAHGDANTIVCNTK.E	BC=BT MC<BC: 1.99 MC<BT: 1.97

Continua/

/Continua

35	Proteína de choque térmico 10 kda, mitocondrial	gil6680309	10956 7.93	330	43	K.FLPLFDR.V R.KFLPLFDR.V K.VLLPEYGGTK.V K.VLQATVVAVGSGGK.G K.VVLDDKDYFLFR.D	BC=BT MC<BC: 1.56 MC<BT: 1.69
	Fator de inibição da migração de macrófagos	gil6754696	12496 6.79	166	17	K.LLQGLLSDR.L M.PMFIVNTNVPR.A M.PMFIVNTNVPR.A	
36	D-dopacromo carboxilase	gil6753618	13069 6.09	68	11	M.PFVELETNLPASR.I	BC=BT MC<BC: 2.05 MC=BT
38	Fosfoproteína induzida por estresse 1	gil13277819	62528 6.40	201	5	K.AAALEFLNR.F K.LMDVGLIAIR.- R.KAAALEFLNR.F K.LDPQNHVLYSNR.S	BC=BT MC>BC: 1.30 MC>BT: 1.46
	Matricina	gil347839	60450 6.23	73	4	R.AVAQALEVIPR.T K.TAVETAVLLLR.I	
40	Inibidor da dissociação de guanosina difosfato (GDP) 2	gil148700276	52911 8.66	98	4	K.MLLFTEVTR.Y K.DLGTDSQIFISR.A	BC=BT MC<BC: 1.19 MC=BT
41	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	gil6679937	35787 8.44	442	19	R.VPTPNVSVVDLTCR.L K.LVINGKPITIFQER.D K.LISWYDNEYGYSNR.V K.VIHDNFGIVEGLMTTVHAITATQK.T	BC=BT MC<BC: 1.27 MC=BT
43	Citocromo b5	gil13385268	15232 4.96	426	41	K.STWVILHHK.V K.TYIIGELHPDDR.S K.FLEEHPGGEEVLR.E R.EQAGGDATENFEDVGHSTDAR.E	BC=BT MC>BC: 1.40 MC>BT: 1.72
	Fator de iniciação da tradução eucariótica 5a	gil148680531	18356 5.08	62	7	K.VHLVGIDIFTGK.K	

Continua/

/Continua

44	Fosfoglicerato quinase	gil202423	44508 7.53	658	22	K.LGDVYVNDAFGTAHR.A K.ALESPERPFLAILGGAK.V K.ITLPVDFVTADKFDENAK.T K.QIWWNGPVGVFWEAFAR.G K.QIWWNGPVGVFWEAFAR.G K.DCVGPEVENACANPAAGTVILLENLR.F	BC=BT MC<BC: 1.73 MC<BT: 2.09
45	Fator de inibição da migração de macrófagos	gil6754696	12496 6.79	166	17	K.LL_CGLLSDR.L M.PMFIVNTNVPR.A M.PMFIVNTNVPR.A	BC=BT MC<BC: 1.50 MC<BT: 1.68
46	Proteína de choque térmico 70 cognata	gil309319	70793 5.37	646	14	K.FELTGIPPAPR.G K.VEIIANDQGNR.T R.FEELNADLFR.G R.RFDDAVVQSDMK.H R.TTPSYVAFTDTER.L K.STAGDTHLGGEDFDNR.M K.TVTNAVVTVPAYFNDSQR.Q	BC=BT MC>BC: 2.05 MC=BT
	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	gil6679937	35787 8.44	442	19	R.VPTPNVSVVDLTQR.L K.LVINGKPITIFQER.D K.LISWYDNEYGYSNR.V K.VIHDNFGIVEGLMTTVHAITATQK.T	
48	Proteína precursora de dissulfeto-isomerase A3	gil112293264	56643 5.88	690	20	K.QAGPASVPLR.T K.DASVVGFFR.D K.FVMQEEFSR.D R.LAPEYEEAAATR.L R.FAHTNIESLVK.E R.ELNDFISYLQR.E K.EYDDNGEGITIFRPLHLANK.F K.TFSHELSDFGLESTTGEVPVVAIR.T	BC=BT MC<BC: 1.35 MC<BT: 1.32
53	Nucleofosmina isoforma 1	gil6679108	32540 4.62	417	19	K.DLKPSTPR.S K.VDNDENEHQLSLR.T R.MTDQEIQLDLWQWR.K R.MTDQEIQLDLWQWR.K K.MSVQPTVSLGGFEITPPVVLR.L K.MSVQPTVSLGGFEITPPVVLR.L	BC=BT MC<BC: 1.47 MC=BT

Continua/

/Continua

56	Fosfoglicerato quinase	gil202423	44508 7.53	658	22	K.LGDVYVNDAFGTAHR.A K.ALESPERPFLAILGGAK.V K.ITLPVDFVTADKFDENAK.T K.QIVWNGPVGVFEWEAFAR.G K.QIVWNGPVGVFEWEAFAR.G K.DCVGPEVENACANPAAGTVILLENLR.F	BC=BT MC<BC: 1.80 MC<BT: 2.22
58	Peptidil-prolil cis-trans isomerase A	gil6679439	17960 7.74	394	37	R.VSFELFADK.V K.FEDENFILK.H K.EGMNIVEAMER.F R.IIPGFMCQGGDFTR.H R.IIPGFMCQGGDFTR.H M.VNPTVFFDITADDEPLGR.V	BC=BT MC<BC: 1.26 MC=BT
59	Fosfoproteína induzida por estresse 1	gil13277819	62528 6.40	201	5	K.AAALEFLNR.F K.LMDVGLIAIR.- R.KAAALEFLNR.F K.LDPQNHVLYSNR.S	BC=BT MC>BC: 1.40 MC>BT: 1.47
61	Proteína relacionada a dissulfeto isomerase 5	gil1710248	46170 4.95	107	7	K.GSFSEQGINEFLR.E -.LYSSDDVIELTPSNFNR.E	BC=BT MC>BC: 1.47 MC>BT: 1.59
62	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	gil6679937	35787 8.44	442	19	R.VPTPNVSVVDLTQR.L K.LVINGKPITIFQER.D K.LISWYDNEYGYSNR.V K.VIHDNFGIVEGLMTTVHAITATQK.T	BC=BT MC<BC: 1.22 MC<BT: 1.30
	Peroxirredoxina-1	gil6754976	22162 8.26	218	20	K.IGYPAPNFK.A R.TIAQDYGVLK.A R.LVQAFQFTDK.H R.QITINDLPVGR.S R.QITINDLPVGR.S	
	Precursor de peroxirredoxina-4	gil7948999	31033 6.67	82	4	R.QITLNDLPVGR.S R.QITLNDLPVGR.S	
63	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	gil6679937	35787 8.44	442	19	R.VPTPNVSVVDLTQR.L K.LVINGKPITIFQER.D K.LISWYDNEYGYSNR.V K.VIHDNFGIVEGLMTTVHAITATQK.T	BC=BT MC<BC: 1.26 MC<BT: 1.25

Continua/

/Continua

64	Glutaciona S-transferase P 1	gij10092608	23594 7.68	216	12	-.PPYTIVYFPVR.G K.FEDGDLTYQSNAILR.H	BC=BT MC>BC: 1.30 MC>BT: 1.35
	Peróxido redutase dependente de tioredoxina, precursor mitocondrial	gij6680690	28109 7.15	173	9	K.HLSVNDLPVGR.S R.DYGVLLLESAGIALR.G	
	Proteína nuclear contendo sinal proteolítico PEST	gij71480098	18951 6.86	83	6	K.FGFAIGSQTAR.K	
67	Fosfoproteína induzida por estresse 1	gij13277819	62528 6.40	201	5	K.AAALEFLNR.F K.LMDVGLAIR.- R.KAAALEFLNR.F K.LDPQNHVLYSNR.S	BC=BT MC>BC: 1.41 MC>BT: 1.45
68	Cadeia E, Citocromo C Oxidase no estado de oxidação completa	gij1942990	12428 5.01	178	21	R.LNDFASAVR.I -.SHGSHTDEEFDAR.W	BC=BT MC<BC: 1.59 MC=BT
70	Aldolase C	gij229506	38993 9.06	195	14	K.ELSDIAHR.I R.QLLLTADDR.V K.ADDGRFPQVIK.S K.GVVPLAGTDGETTTQGLDGLSER.C	BC=BT MC<BC: 1.42 MC<BT: 1.67
71	Fosfoglicerato quinase	gij202423	44508 7.53	658	22	K.LGDVYVNDAFGTAHR.A K.ALESPERPFLAILGGAK.V K.ITLPVDFVTADKFDENAK.T K.QIWWNGPVGVFWEAFAR.G K.QIWWNGPVGVFWEAFAR.G K.DCVGPEVENACANPAAGTVILLENLR.F	BC=BT MC<BC: 1.41 MC=BT
76	Proteína de choque térmico 70 cognata	gij309319	70793 5.37	646	14	K.FELTGIPPAPR.G K.VEIIANDQGNR.T R.FEELNADLFR.G R.RFDDAVVQSDMK.H R.TTPSYVAFTDTER.L K.STAGDTHLGGEDFDNR.M K.TVTNAVVTVPAYFNDSQR.Q	BC=BT MC>BC: 1.69 MC>BT: 1.98
	Proteína de estresse 70, mitocondrial	gij407341	73483 5.91	313	8	K.VQQTVDLFR.A K.SDIGEVILVGGMTR.M K.LLGQFTLIGIPPAPR.G K.NAVITVPAYFNDSQR.Q	

Continua/

/Continua

77	Prostaglandina E sintase 3	gij9790017	18709 4.36	140	18	R.SILCCLR.K R.KGESGQSWPR.L K.LTFSC _L LGSDNFK.H	BC=BT MC>BC: 1.33 MC>BT: 1.63
79	Piruvato quinase M	gij551295	57824 7.58	687	24	K.GDYPLEAVR.M R.LDIDSAPITAR.N R.NTGIICTIGPASR.S K.IYVDDGLISLQVK.E K.DAVLNAWAEDVDLR.V R.FDEILEASDGIMVAR.G R.LNFSGTHEYHAETIK.N R.EAEAAIYHLQLFEELR.R R.EATESFASDPILYRPVAVALDTK.G	BC=BT MC>BC: 1.19 MC=BT
80	Nucleofosmina isoforma 1	gij6679108	32540 4.62	417	19	K.DLKPSTPR.S K.VDNDENEHQLSLR.T R.MTDQEIQDLWQWR.K R.MTDQEIQDLWQWR.K K.MSVQPTVSLGGFEITPPVVLRL.L K.MSVQPTVSLGGFEITPPVVLRL.L	BC=BT MC<BC: 1.35 MC=BT
	Precursor de calreticulina	gij6680836	47965 4.33	249	9	K.EQFLDGDWNTNR.W K.HEQNIDCGGGYVK.L K.IKDPDAAKPEDWDER.A	
81	Mcg13235	gij148684097	15406 9.82	188	25	K.EGLPPDQQR.L K.ESTLHLVLR.L K.TITLEVEPSDTIENVK.A	BC=BT MC>BC: 1.64 MC=BT
	Poliubiquitina, parcial	gij1675359	4605 4.72	118	39	K.TITLEVEPSDTIENVK.A K.TITLEVEPDDTIENVK.A	
	NEDD8 precursor	gij6679034	8967 6.59	106	34	K.ILGGSVLHLVLALR.G K.EIEIDIEPTDKVER.I	
83	Alfa-fetoproteína, parcial	gij191765	47195 5.47	212	9	K.APQVSTPTLVEAAR.N K.LGEYGFQNALVR.Y K.DVFLGTFLYEYSR.R	BC=BT MC>BC: 1.38 MC>BT: 1.26

Continua/

/Continua

84	Gama-actina	gi 809561	40992 5.56	691	25	K.AGFAGDDAPR.A R.GYSFTTTAER.E R.AVFPSIVGRPR.H K_QEYDESGPSIVHR.K K.IWHHTFYNELR.V K.SYELPDGQVITIGNER.F K.DLYANTVLSSGGTTMYPGIADR.M K.DLYANTVLSSGGTTMYPGIADR.M	BC=BT MC<BC: 1.05 MC=BT
	Beta-actina (aa 27-375), putativo	gi 49868	39161 5.78	629	22	R.AVFPSIVGR.S R.GYSFTTTAER.E K_QEYDESGPSIVHR.K K.IWHHTFYNELR.V K.SYELPDGQVITIGNER.F K.DLYANTVLSSGGTTMYPGIADR.M K.DLYANTVLSSGGTTMYPGIADR.M	
	Fator de iniciação da tradução eucariótica 3, subunidade F	gi 47682703	37857 5.33	175	16	K.YAYYDTER.I R.VIGLSSDLQQVGGASAR.I R.LHPVILASIVDSYER.R R.EAPNPIHLTVDTGLQHGR.M	
85	Vimentina	gi 55408	53689 5.06	455	17	R.DNLAEDIMR.L K.FADLSEAANR.N K.VELQELNDR.F R.LGDLYEEEMR.D K.MALDIEIATYR.K R.ISLPLPTFSSLNLR.E R.EMEENFALEAANYQDTIGR.L	BC=BT MC>BC: 1.30 MC=BT
87	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	gi 6679937	35787 8.44	442	19	R.VPTPNVSVVDLTGR.L K.LVINGKPITIFQER.D K.LISWYDNEYGYSNR.V K.VIHDNFGIVEGLMTTVHAITATQK.T	BC=BT MC=BC MC<BT: 1.20
88	Anexina A5	gi 6753060	35730 4.83	267	18	K.FITIFGTR.S R.SEIDLFNIR.K R.GTVTDFPGFDGR.A K.GLGTDEDSILNLLTSR.S K.YMTISGFQIEETIDR.E	BC=BT MC=BC MC>BT: 1.33

Continua/

/Continua

91	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	gij6679937	35787 8.44	442	19	R.VPTPNVSVVDLTCR.L K.LVINGKPITIFQER.D K.LISWYDNEYGYNSR.V K.VIHDNFGIVEGLMTTVHAITATQK.T	BC=BT MC=BC MC<BT: 1.45
	Aldolase C	gij229506	38993 9.06	195	14	K.ELSDIAHR.I R.QLLLTADDR.V K.ADDGRPPFPQVIK.S K.GVVPLAGTDGETTTQGLDGLSER.C	
92	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	gij6679937	35787 8.44	442	19	R.VPTPNVSVVDLTCR.L K.LVINGKPITIFQER.D K.LISWYDNEYGYNSR.V K.VIHDNFGIVEGLMTTVHAITATQK.T	BC=BT MC=BC MC<BT: 1.41
	Álcool desidrogenase [NADP(+)]	gij10946870	36564 6.90	75	6	K.ALGLSNFNRSR.Q K.HHPEDVEPALR.K	
93	Proteína ligante a beta-galactosídeos	gij193442	14796 5.32	341	33	K.LPDGHEFK.F K.EDGTWGTEHR.E K.DSNNLCLHFNPR.F R.FNAHGDANTIVCNTK.E	BC=BT MC=BC MC<BT: 1.40
94	Proteína 1 do complexo T, subunidade zeta	gij6753324	57968 6.63	95	2	K.QADLYISEGLHPR.I K.QADLYISEGLHPR.I	BC=BT MC=BC MC>BT: 1.23
95	Fosfoglicerato quinase	gij202423	44508 7.53	658	22	K.LGDVYVNDAFGTAHR.A K.ALESPERPFLAILGGAK.V K.ITLPVDFVTADKFDENAK.T K.QIWWNGPVGVFWEAFAR.G K.QIWWNGPVGVFWEAFAR.G K.DCVGPEVENACANPAAGTVILLENLR.F	BC=BT MC=BC MC<BT: 1.59
96	1,2-dihidroxi-3-ceto-5-metilpenteno dioxigenase	gij19527270	21510 5.31	92	6	R.YILEGSGYFDVR.D	BC=BT MC=BC MC>BT: 1.21
	Proteína ribossomal 39S L12, precursor mitocondrial	gij22164792	21695 9.34	78	5	K.NYVQGINLVQAK.K	

Continua/

/Continua

98	Proteína de choque térmico 70 cognata	gi 309319	70793 5.37	646	14	K.FELTGIPPAPR.G K.VEIIANDQGNR.T R.FEELNADLFR.G R.RFDDAVVQSDMK.H R.TTPSYVAFTDTER.L K.STAGDTHLGGEDFDNR.M K.TVTNAVVTVPAYFNDSQR.Q	BC=BT MC=BC MC>BT: 1.70
	Proteína de estresse 70, mitocondrial	gi 407341	73483 5.91	313	8	K.VQQTVDLFR.A K.SDIGEVILVGGMTR.M K.LLGQFTLIGIPPAPR.G K.NAVITVPAYFNDSQR.Q	
100	Proteína 25 associada a proteína de organização vacuolar isoforma 2	gi 25092662	20735 5.97	192	17	K.SSFLIMWR.R K.LIQWVSR.S R.FPPFFTLQPNVDTR.Q	BC=BT MC=BC MC<BT: 1.28
101	Piruvato quinase M	gi 551295	57824 7.58	687	24	K.GDYPLEAVR.M R.LDIDSAPITAR.N R.NTGIICTIGPASR.S K.IYVDDGLISLQVK.E K.DAVLNAWAEDVDLR.V R.FDEILEASDGIMVAR.G R.LNFSGHTHEYHAETIK.N R.EAEAAIYHLQLFEELR.R R.EATESFASDPILYRPVAVALDTK.G	BC=BT MC=BC MC<BT: 1.35
	Cadeia beta-5 da tubulina	gi 7106439	49639 4.78	90	6	R.FPGQLNADLR.K K.GHYTEGAELVDSVLDVVR.K	
102	Peptidil-prolil cis-trans isomerase A	gi 6679439	17960 7.74	394	37	R.VSFELFADK.V K.FEDENFILK.H K.EGMNIVEAMER.F R.IIPGFMCQGGDFTR.H R.IIPGFMCQGGDFTR.H M.VNPTVFFDITADDEPLGR.V	BC=BT MC=BC MC<BT: 1.13

Continua/

/Continua

103	Peróxido redutase dependente de tioredoxina, precursor mitocondrial	gil6680690	28109 7.15	173	9	K.HLSVNDLPVGR.S R.DYGVLLESAGIALR.G	BC=BT MC=BC MC>BT: 1.54
	Proteína de tráfico de partícula, complexo subunidade 4	gil11140825	24370 5.83	135	17	K.FVVLADPR.Q K.AGGLIQWDSYSPR.A K.EVLEYLGNPANYPVSIR.F	
	Proteína do complexo de membrana ER, subunidade 8	gil6754870	23333 5.72	106	7	R.SYETLVDFDNHLDDIR.N	
104	Proteína ligante a beta-galactosídeos	gil193442	14796 5.32	341	33	K.LPDGHEFK.F K.EDGTWGTEHR.E K.DSNLCLHFNPR.F R.FNAHGDANTIVCNTK.E	BC=BT MC=BC MC<BT: 1.62
105	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	gil6679937	35787 8.44	442	19	R.VPTPNVSVVDLTQR.L K.LVINGKPITIFQER.D K.LISWYDNEYGYSNR.V K.VIHDNFGIVEGLMTTVHAITATQK.T	BC=BT MC=BC MC<BT: 1.46
106	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	gil6679937	35787 8.44	442	19	R.VPTPNVSVVDLTQR.L K.LVINGKPITIFQER.D K.LISWYDNEYGYSNR.V K.VIHDNFGIVEGLMTTVHAITATQK.T	BC=BT MC=BC MC<BT: 1.37
107	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	gil6679937	35787 8.44	442	19	R.VPTPNVSVVDLTQR.L K.LVINGKPITIFQER.D K.LISWYDNEYGYSNR.V K.VIHDNFGIVEGLMTTVHAITATQK.T	BC=BT MC=BC MC<BT: 1.18
108	Destrina	gil9790219	18509 8.14	95	7	K.HEYQANGPEDLNR.T	BC=BT MC=BC MC>BT: 1.30
110	14-3-3 proteína epsilon	gil13928824	29103 4.55	360	20	K.DSTLIMQLLR.D K.DSTLIMQLLR.D R.YLAEFATGNDR.K R.YLAEFATGNDRK.E K.VAGMDVELTVEER.N K.AASDIAMTELPPTHPIR.L K.AASDIAMTELPPTHPIR.L	BC=BT MC=BC MC<BT: 1.16

Continua/

/Continua

113	Fosfoglicerato mutase 1	gil114326546	28814 6.67	824	54	R.VLIAAHGNSLR.G R.HGESAWNLENR.F R.ALPFWNEEIVPQIK.E R.DAGYEFDI ^C FTSVQK.R R.FSGWYDADLSPAGHEEAK.R K.NLKPIKPMQFLGDEETVR.K K.NLKPIKPMQFLGDEETVR.K R.SYDVPPPPMEPDHPFYSNISK.D	BC=BT MC=BC MC<BT: 1.32
	Proteína ligadora a calciclina	gil3142331	28301 7.78	175	18	K.TDTVILCR.K K.ISNYGWDQSDK.F K.IYITLTGVHQVPTENVQVHFTER.S	
114	Enolase 1, (alfa)	gil59808815	47128 6.16	667	23	R.IGAEVYHNLK.N R.GNPTVEVDLYTAK.G R.YITPDQLADLYK.S K.LAQSN ^G WGMVSHR.S R.AAVPSGASTGIYEAL ^R .D K.LAMQEFMILPVGASSFR.E K.AGYTDQVVIGMDVAASEFYR.S	BC=BT MC=BC MC<BT: 1.29
116	Alfa-fetoproteína, parcial	gil191765	47195 5.47	212	9	K.APQVSTPTLVEAAR.N K.LGEYGFQNAILVR.Y K.DVFLGTFLYEYSR.R	BC=BT MC=BC MC<BT: 1.40
	Proteína de cobertura da F-actina subunidade beta isoforma A	gil83649737	31326 5.47	84	5	K.LEVEANNAFDQYR.D R.KLEVEANNAFDQYR.D	
117	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	gil6679937	35787 8.44	442	19	R.VPTPNVSVVDLT ^C R.L K.LVINGKPITIFQER.D K.LISWYDNEYGYSNR.V K.VIHDNFGIVEGLMTTVHAITATQK.T	BC=BT MC=BC MC<BT: 1.46
	Fator de inibição da migração de macrófagos	gil6754696	12496 6.79	166	17	K.LLCGLLSDR.L M.PMFIVNTNVPR.A M.PMFIVNTNVPR.A	

ANEXO 2

Parceiros Funcionais Preditos das proteínas identificadas que se mostraram diferentemente expressas entre os grupos B16-F10 controle *versus* tratados e Melan-a controle, mas que se mostraram igualmente expressos nos grupos Melan-a controle e B16-F10 tratado.

Ncl	nucleolin Gene; Nucleolin is the major nucleolar protein of growing eukaryotic cells. It is fou [...] (707 aa)
Cenpa	centromere protein A Gene; Histone H3-like variant which exclusively replaces conventional H3 i [...] (134 aa)
Rbbp7	retinoblastoma binding protein 7 Gene; Core histone-binding subunit that may target chromatin r [...] (425 aa)
Eif4g1	eukaryotic translation initiation factor 4, gamma 1 Gene; Component of the protein complex eIF4 [...] (1600 aa)
Eif5	eukaryotic translation initiation factor 5 Gene; Catalyzes the hydrolysis of GTP bound to the 4 [...] (429 aa)
Tlr4	toll-like receptor 4 Gene; Cooperates with LY96 and CD14 to mediate the innate immune response [...] (835 aa)
Hspe1	heat shock protein 1 (chaperonin 10) Gene; Eukaryotic CPN10 homolog which is essential for mito [...] (102 aa)
Ruvbl1	RuvB-like protein 1 Gene; Possesses single-stranded DNA-stimulated ATPase and ATP- dependent DN [...] (456 aa)
Eif4e	eukaryotic translation initiation factor 4E Gene; Recognizes and binds the 7-methylguanosine-co [...] (217 aa)
Eif3g	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit G Gene; Component of the eukaryotic transla [...] (320 aa)
Hspa1a	heat shock protein 1A Gene; In cooperation with other chaperones, Hsp70s stabilize preexistent [...] (642 aa)
Cenpq	centromere protein Q Gene; Component of the CENPA-CAD (nucleosome distal) complex, a complex re [...] (269 aa)
Eif3d	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit D Gene; Component of the eukaryotic transla [...] (548 aa)
Eif2s1	eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 1 alpha Gene; Functions in the early steps [...] (315 aa)
Eif3e	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit E Gene; Required for nonsense-mediated mRNA [...] (445 aa)
Eif3b	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit B Gene; Component of the eukaryotic transla [...] (969 aa)
Cenph	centromere protein H Gene; Component of the CENPA-NAC (nucleosome-associated) complex, a comple [...] (241 aa)
Rps5	ribosomal protein S5 Gene (204 aa)
Eif3i	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit I Gene; Component of the eukaryotic transla [...] (325 aa)
Eif4b	eukaryotic translation initiation factor 4B Gene; Required for the binding of mRNA to ribosomes [...] (611 aa)
Eif3f	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit F Gene; Component of the eukaryotic transla [...] (361 aa)
Rps21	ribosomal protein S21 Gene (83 aa)
Rps9	ribosomal protein S9 Gene (194 aa)
S100a6	S100 calcium binding protein A6 (calcyclin) Gene; May function as calcium sensor and contribute [...] (89 aa)
Cenpp	centromere protein P Gene; Component of the CENPA-CAD (nucleosome distal) complex, a complex re [...] (286 aa)
Eif3h	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit H Gene; Component of the eukaryotic transla [...] (352 aa)
Mis18a	RIKEN cDNA 2610039C10 gene Gene; Required for recruitment of CENPA to centromeres and normal ch [...] (217 aa)
Rbbp4	retinoblastoma binding protein 4 Gene; Core histone-binding subunit that may target chromatin a [...] (425 aa)
Rpl8	ribosomal protein L8 Gene (257 aa)
Eif3k	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit K Gene; Component of the eukaryotic transla [...] (218 aa)
Cenpk	centromere protein K Gene; Component of the CENPA-CAD (nucleosome distal) complex, a complex re [...] (306 aa)
Itgb3bp	integrin beta 3 binding protein (beta3-endonexin) Gene; Transcription coregulator that can have [...] (176 aa)
Mif1ip	myeloid leukemia factor 1 interacting protein Gene; Component of the CENPA-NAC (nucleosome-asso [...] (410 aa)
Cenpn	centromere protein N Gene; Component of the CENPA-NAC (nucleosome-associated) complex, a comple [...] (337 aa)
Rps3	ribosomal protein S3 Gene (243 aa)
Rps15	ribosomal protein S15 Gene (145 aa)
Oip5	Opa interacting protein 5 Gene; Required for recruitment of CENPA to centromeres and normal chr [...] (241 aa)
Cenpo	centromere protein O Gene; Component of the CENPA-CAD (nucleosome distal) complex, a complex re [...] (298 aa)
Casc5	cancer susceptibility candidate 5 Gene; Part of the MIS12 complex, which may be fundamental fo [...] (2119 aa)
Cenpi	centromere protein I Gene; Component of the CENPA-CAD (nucleosome distal) complex, a complex re [...] (746 aa)
C79407	Kinetochore-associated protein KNL-2 homolog (Mis18-binding protein 1); Required for recruitmen [...] (998 aa)
Smarca5	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member [...] (1051 aa)
Rps17	ribosomal protein S17 Gene (135 aa)
Fau	Finkel-Biskis-Reilly murine sarcoma virus (FBR-MuSV) ubiquitously expressed (fox derived) Gene (133 aa)
Gm3086	atlastin GTPase 1 Gene (67 aa)
Gm9781	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit J (eIF3j)(Eukaryotic translation initiation [...] (263 aa)
Eif3j	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit J Gene (261 aa)
Senp3	SUMO/sentrin specific peptidase 3 Gene; Deconjugates SUMO2 and SUMO3 from CDC48. Redox sensor t [...] (568 aa)
Cdk2	cyclin-dependent kinase 2 Gene; Involved in the control of the cell cycle. Interacts with cycli [...] (346 aa)
Eif3c	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit C Gene; Component of the eukaryotic transla [...] (911 aa)
Casp3	caspase 3 Gene; Involved in the activation cascade of caspases responsible for apoptosis execut [...] (277 aa)
Pabpc1	poly(A) binding protein, cytoplasmic 1 Gene; Binds the poly(A) tail of mRNA. May be involved in [...] (636 aa)
Eif5b	eukaryotic translation initiation factor 5B Gene; Function in general translation initiation by [...] (1216 aa)
Siah1a	seven in absentia 1A Gene; E3 ubiquitin-protein ligase that mediates ubiquitination and subsequ [...] (282 aa)
Rplp1	ribosomal protein, large, P1 Gene; Plays an important role in the elongation step of protein sy [...] (114 aa)
Hspa9	heat shock protein 9 Gene; Implicated in the control of cell proliferation and cellular aging. [...] (679 aa)
Rpl18	ribosomal protein L18 Gene (188 aa)
Rpl19	ribosomal protein L19 Gene (196 aa)
Akt1	thymoma viral proto-oncogene 1 Gene; General protein kinase capable of phosphorylating several [...] (480 aa)
Ctcf	CCCTC-binding factor Gene; Chromatin binding factor that binds to DNA sequence specific sites. [...] (736 aa)
Rpl23	ribosomal protein L23 Gene (140 aa)
Rpl4	ribosomal protein L4 Gene (419 aa)
Rplp2	ribosomal protein, large P2 Gene; Plays an important role in the elongation step of protein syn [...] (115 aa)
Rplp0	ribosomal protein, large, P0 Gene; Ribosomal protein P0 is the functional equivalent of E.coli [...] (317 aa)
Rpl22	ribosomal protein L22 Gene (128 aa)
Rpl5	ribosomal protein L5 Gene; Required for rRNA maturation and formation of the 60S ribosomal subu [...] (297 aa)
Rpl38	ribosomal protein L38 Gene (70 aa)
Rpl14	ribosomal protein L14 Gene (217 aa)

Continua/

/Continua

Rpl37a	ribosomal protein L37a Gene (92 aa)
Rpl18a	ribosomal protein L18A Gene (176 aa)
Rpl10a	ribosomal protein L10A Gene (217 aa)
Rpl37	ribosomal protein L37 Gene; Binds to the 23S rRNA (By similarity) (97 aa)
Rpl3l	ribosomal protein L3-like Gene (240 aa)
Rsf1	remodeling and spacing factor 1 Gene (1441 aa)
Eif3a	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit A Gene; Component of the eukaryotic transla [...] (1344 aa)
Plk1	polo-like kinase 1 (Drosophila) Gene; Serine/threonine-protein kinase that performs several imp [...] (603 aa)
Plk2	polo-like kinase 2 (Drosophila) Gene; May play a role in the division of at least some cell typ [...] (682 aa)
Pelp1	proline, glutamic acid and leucine rich protein 1 Gene; Coactivator of estrogen receptor-mediat [...] (1123 aa)
Naca	nascent polypeptide-associated complex alpha polypeptide Gene; Prevents inappropriate targeting [...] (2187 aa)
Mapk14	mitogen-activated protein kinase 14 Gene; Responds to activation by environmental stress, pro- [...] (360 aa)
Trp53	transformation related protein 53 Gene; Acts as a tumor suppressor in many tumor types; induces [...] (390 aa)
Lmnb1	lamin B1 Gene; Lamins are components of the nuclear lamina, a fibrous layer on the nucleoplasm [...] (588 aa)
Skp1a	S-phase kinase-associated protein 1A Gene; Essential component of the SCF (SKP1-CUL1-F-box prot [...] (163 aa)
Hspa5	heat shock protein 5 Gene; Probably plays a role in facilitating the assembly of multimeric pro [...] (655 aa)
Hsp90aa1	heat shock protein 90, alpha (cytosolic), class A member 1 Gene; Molecular chaperone. Has ATPas [...] (733 aa)
Cdkn2a	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A Gene; Capable of inducing cell cycle arrest in G1 and G2 p [...] (169 aa)
Socs3	suppressor of cytokine signaling 3 Gene; SOCS family proteins form part of a classical negative [...] (225 aa)
Alk	anaplastic lymphoma kinase Gene; Orphan receptor with a tyrosine-protein kinase activity. Appea [...] (1621 aa)
Tlr2	toll-like receptor 2 Gene; Cooperates with LY96 to mediate the innate immune response to bacter [...] (784 aa)
Nop58	NOP58 ribonucleoprotein homolog (yeast) Gene; Required for 60S ribosomal subunit biogenesis (By [...] (536 aa)
Foxm1	RIKEN cDNA 4933413G19 gene Gene; Transcriptional activatory factor. May play a role in the cont [...] (757 aa)
Nanog	Nanog homeobox Gene; Transcription regulator involved in inner cell mass and embryonic stem (ES [...] (305 aa)
Ct55	chaperonin containing Tcp1, subunit 5 (epsilon) Gene; Molecular chaperone; assist the folding o [...] (541 aa)
Atf5	activating transcription factor 5 Gene; Transcriptional activator which binds the cAMP response [...] (283 aa)
Psmc6	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase, 6 Gene; The 26S protease is involved in th [...] (389 aa)
Hexim1	hexamethylene bis-acetamide inducible 1 Gene; Transcriptional regulator which functions as a ge [...] (356 aa)
Aptx	apratxin Gene; DNA-binding protein involved in single-strand DNA break repair, double-strand D [...] (351 aa)
Adrbk1	adrenergic receptor kinase, beta 1 Gene; Specifically phosphorylates the agonist-occupied form [...] (689 aa)
Ybx1	Y box protein 1 Gene; Component of the CRD-mediated complex that promotes MYC mRNA stability. B [...] (322 aa)
Pcna	proliferating cell nuclear antigen Gene; This protein is an auxiliary protein of DNA polymerase [...] (261 aa)
Sumo2	SMT3 suppressor of mif two 3 homolog 2 (yeast) Gene; Ubiquitin-like protein which can be coval [...] (95 aa)
Cct2	chaperonin containing Tcp1, subunit 2 (beta) Gene; Molecular chaperone; assist the folding of p [...] (535 aa)
Pno1	partner of NOB1 homolog (S. cerevisiae) Gene (248 aa)
Hspa4	heat shock protein 4 Gene (842 aa)
Tcp1	t-complex protein 1 Gene; Molecular chaperone; assists the folding of proteins upon ATP hydroly [...] (556 aa)
Rpl36a	ribosomal protein L36A Gene (106 aa)
Psmc6	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 6 Gene; Acts as a regulatory subunit o [...] (389 aa)
C1qbp	complement component 1, q subcomponent binding protein Gene; Not known. Binds to the globular [...] (279 aa)
Myd88	myeloid differentiation primary response gene 88 Gene; Adapter protein involved in the Toll-lik [...] (296 aa)
Hnnpa1	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 Gene; Involved in the packaging of pre-mRNA into hnR [...] (373 aa)
Rps3a	ribosomal protein S3A Gene; May play a role during erythropoiesis through regulation of transcr [...] (264 aa)
Ly96	lymphocyte antigen 96 Gene; Cooperates with TLR4 in the innate immune response to bacterial lip [...] (160 aa)
Ppid	peptidylprolyl isomerase D (cyclophilin D) Gene; PPIases accelerate the folding of proteins. It [...] (370 aa)
Mdm2	transformed mouse 3T3 cell double minute 2 Gene; Inhibits TP53/p53- and TP73/p73-mediated cell [...] (489 aa)
Hspe1-rs1	heat shock protein 1 (chaperonin 10), related sequence 1 Gene (102 aa)
Cct6a	chaperonin containing Tcp1, subunit 6a (zeta) Gene; Molecular chaperone; assists the folding of [...] (532 aa)
Rps27	ribosomal protein S27 Gene (84 aa)
Tlr1	toll-like receptor 1 Gene; Participates in the innate immune response to microbial agents. Coop [...] (795 aa)
Fbxw7	F-box and WD-40 domain protein 7 Gene; Substrate recognition component of a SCF (SKP1-CUL1-F- b [...] (710 aa)
Ranbp1	RAN binding protein 1 Gene; Inhibits GTP exchange on Ran. Forms a Ran-GTP-RANBP1 trimeric compl [...] (203 aa)
Hjurp	RIKEN cDNA 6430706D22 gene Gene; Centromeric protein that plays a central role in the incorpora [...] (667 aa)
Eef1b2	eukaryotic translation elongation factor 1 beta 2 Gene; EF-1-beta and EF-1-delta stimulate the [...] (225 aa)
Axin1	axin 1 Gene; Controls dorsoventral patterning via two opposing effects; down-regulates beta-cat [...] (863 aa)
Dhx15	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 15 Gene; Pre-mRNA processing factor involved in disassem [...] (795 aa)
Nap1l1	nucleosome assembly protein 1-like 1 Gene; May be involved in modulating chromatin formation an [...] (391 aa)
Mcl1	myeloid cell leukemia sequence 1 Gene; Involved in the regulation of apoptosis versus cell surv [...] (331 aa)
Cct8	chaperonin containing Tcp1, subunit 8 (theta) Gene; Molecular chaperone; assist the folding of [...] (548 aa)
Gsk3b	glycogen synthase kinase 3 beta Gene; Participates in the Wnt signaling pathway. Implicated in [...] (433 aa)
Myc	myelocytomatosis oncogene Gene; Participates in the regulation of gene transcription. Binds DNA [...] (454 aa)
Kpna2	karyopherin (importin) alpha 2 Gene; Functions in nuclear protein import as an adapter protein [...] (529 aa)
KIAA0644	RIKEN cDNA 1200009O22 gene Gene (809 aa)
Apc	adenomatosis polyposis coli Gene; Tumor suppressor. Promotes rapid degradation of CTNNB1 and pa [...] (2842 aa)
Rps7	ribosomal protein S7 Gene; Required for rRNA maturation (By similarity) (194 aa)
Hsp72	heat shock protein 72 Gene; In cooperation with other chaperones, Hsp70s stabilize preexistent [...] (642 aa)
Rbmxrt	RNA binding motif protein, X chromosome retrogene Gene; RNA-binding protein which may be involv [...] (388 aa)
Uchl5	ubiquitin carboxyl-terminal esterase L5 Gene; Deubiquitinating enzyme associated with the prote [...] (329 aa)
Fkbp3	FK506 binding protein 3 Gene; FK506- and rapamycin-binding proteins (FKBPs) constitute a family [...] (224 aa)
Rps6	ribosomal protein S6 Gene; May play an important role in controlling cell growth and proliferat [...] (249 aa)
ENSMUSG00000025066	RIKEN cDNA 6330577E15 gene Gene (319 aa)
Set	SET translocation Gene; Multitasking protein, involved in apoptosis, transcription, nucleosome [...] (289 aa)
Gnb2l1	guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 2 like 1 Gene; Seems to bind p [...] (317 aa)
Rpl26	ribosomal protein L26 Gene (145 aa)
Psmc12	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 12 Gene; Acts as a regulatory subunit [...] (456 aa)
Cse1l	chromosome segregation 1-like (S. cerevisiae) Gene; Export receptor for importin-alpha. Mediate [...] (971 aa)
Vbp1	von Hippel-Lindau binding protein 1 Gene; Binds specifically to cytosolic chaperonin (c-CPN) an [...] (196 aa)
Tlr6	toll-like receptor 6 Gene; Participates in the innate immune response to Gram- positive bacteri [...] (806 aa)

ANEXO 3

Parceiros Funcionais Preditos das proteínas identificadas que se mostraram diferentemente expressas entre os grupos B16-F10 tratado *versus* controle e Melan-a controle, mas que se mostraram igualmente expressos nos grupos B16-F10 e Melan-a controle.

Pgk1	phosphoglycerate kinase 1 Gene (417 aa)
Gstt1	glutathione S-transferase, theta 1 Gene; Conjugation of reduced glutathione to a wide number of [...] (240 aa)
Limk1	LIM-domain containing, protein kinase Gene; Protein kinase which regulates actin filament dynam [...] (647 aa)
Pgk2	phosphoglycerate kinase 2 Gene (417 aa)
Gapdhs	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, spermatogenic Gene; May play an important role in reg [...] (440 aa)
Pfn1	profilin 1 Gene; Binds to actin and affects the structure of the cytoskeleton. At high concentr [...] (140 aa)
ENSMUSG00000073212	predicted gene 5138 Pseudogene (333 aa)
Aldoa	aldolase A, fructose-bisphosphate Gene (418 aa)
Cyp1a1	cytochrome P450, family 1, subfamily a, polypeptide 1 Gene; Cytochromes P450 are a group of hem [...] (524 aa)
Cyp1a2	cytochrome P450, family 1, subfamily a, polypeptide 2 Gene; Cytochromes P450 are a group of hem [...] (513 aa)
Eno-1	Alpha-enolase (EC 4.2.1.11)(2-phospho-D-glycerate hydro-lyase)(Non-neural enolase)(NNE)(Enolase [...] (434 aa)
Limk2	LIM motif-containing protein kinase 2 Gene; Displays serine/threonine-specific phosphorylation [...] (677 aa)
Ephx1	epoxide hydrolase 1, microsomal Gene; Biotransformation enzyme that catalyzes the hydrolysis of [...] (455 aa)
Cyp2e1	cytochrome P450, family 2, subfamily e, polypeptide 1 Gene; Metabolizes several precarcinogens, [...] (493 aa)
Ssh1	slingshot homolog 1 (Drosophila) Gene; Protein phosphatase which regulates actin filament dynam [...] (1042 aa)
Gpx1	glutathione peroxidase 1 Gene; Protects the hemoglobin in erythrocytes from oxidative breakdown (201 aa)
Gpi1	glucose phosphate isomerase 1 Gene; Besides it's role as a glycolytic enzyme, mammalian GPI can [...] (558 aa)
Cap1	CAP, adenylate cyclase-associated protein 1 (yeast) Gene; Directly regulates filament dynamics [...] (474 aa)
Gsto1	glutathione S-transferase omega 1 Gene; Exhibits glutathione-dependent thiol transferase and de [...] (240 aa)
Aldob	aldolase B, fructose-bisphosphate Gene (364 aa)
Gstt2	glutathione S-transferase, theta 2 Gene; Conjugation of reduced glutathione to a wide number of [...] (244 aa)
Cyp1b1	cytochrome P450, family 1, subfamily b, polypeptide 1 Gene; Cytochromes P450 are a group of hem [...] (543 aa)
Aldoc	aldolase C, fructose-bisphosphate Gene (363 aa)
Gpx4	glutathione peroxidase 4 Gene; Protects cells against membrane lipid peroxidation and cell deat [...] (253 aa)
Eno3	enolase 3, beta muscle Gene; Appears to have a function in striated muscle development and rege [...] (434 aa)
Cyp2b10	cytochrome P450, family 2, subfamily b, polypeptide 10 Gene; Cytochromes P450 are a group of he [...] (500 aa)
Gstk1	glutathione S-transferase kappa 1 Gene (226 aa)
Gstz1	glutathione transferase zeta 1 (maleylacetacetate isomerase) Gene; Probable bifunctional enzym [...] (216 aa)
Gpx5	glutathione peroxidase 5 Gene; Protects cells and enzymes from oxidative damage, by catalyzing [...] (237 aa)
Gpx7	glutathione peroxidase 7 Gene (186 aa)
Eno2	enolase 2, gamma neuronal Gene; Has neurotrophic and neuroprotective properties on a broad spec [...] (434 aa)
Gsto2	glutathione S-transferase omega 2 Gene (248 aa)
Gpx2	glutathione peroxidase 2 Gene (190 aa)
Aldoart1	aldolase 1, A isoform, retrogene 1 Gene (364 aa)
Gss	glutathione synthetase Gene (474 aa)
Cyp3a11	cytochrome P450, family 3, subfamily a, polypeptide 11 Gene; Catalyzes erythromycin N-demethyla [...] (504 aa)
Gstm1	glutathione S-transferase, mu 1 Gene; Conjugation of reduced glutathione to a wide number of ex [...] (244 aa)
Gsr	glutathione reductase Gene; Maintains high levels of reduced glutathione in the cytosol (500 aa)
Src	Rous sarcoma oncogene Gene (541 aa)
Bpgm	2,3-bisphosphoglycerate mutase Gene; Plays a major role in regulating hemoglobin oxygen affinit [...] (259 aa)
Mgst2	microsomal glutathione S-transferase 2 Gene (147 aa)
Gsta2	glutathione S-transferase, alpha 2 (Yc2) Gene; Conjugation of reduced glutathione to a wide num [...] (222 aa)
Gsta3	glutathione S-transferase, alpha 3 Gene; Conjugation of reduced glutathione to a wide number of [...] (221 aa)
Gpx3	glutathione peroxidase 3 Gene; Protects cells and enzymes from oxidative damage, by catalyzing [...] (226 aa)
Cyp2c65	cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 65 Gene (490 aa)
Ssh2	slingshot homolog 2 (Drosophila) Gene; Protein phosphatase which regulates actin filament dynam [...] (1450 aa)
Mgst1	microsomal glutathione S-transferase 1 Gene; Conjugation of reduced glutathione to a wide numbe [...] (229 aa)
Aldh3a1	aldehyde dehydrogenase family 3, subfamily A1 Gene; ALDHs play a major role in the detoxificati [...] (453 aa)
Gstm3	glutathione S-transferase, mu 3 Gene; Conjugation of reduced glutathione to a wide number of ex [...] (218 aa)
Il2	interleukin 2 Gene; Produced by T-cells in response to antigenic or mitogenic stimulation, this [...] (169 aa)
Cyp2b19	cytochrome P450, family 2, subfamily b, polypeptide 19 Gene; Cytochromes P450 are a group of he [...] (492 aa)
Cyp3a16	cytochrome P450, family 3, subfamily a, polypeptide 16 Gene; Cytochromes P450 are a group of he [...] (504 aa)
Gsta1	glutathione S-transferase, alpha 1 (Ya) Gene; Conjugation of reduced glutathione to a wide numb [...] (223 aa)
Gstm4	glutathione S-transferase, mu 4 Gene (218 aa)
Mgst3	microsomal glutathione S-transferase 3 Gene; Also functions as a glutathione peroxidase (By sim [...] (153 aa)
Cyp2c40	cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 40 Gene; Metabolizes arachidonic acid to pr [...] (491 aa)
Gstm2	glutathione S-transferase, mu 2 Gene; Conjugation of reduced glutathione to a wide number of ex [...] (218 aa)
Gsta4	glutathione S-transferase, alpha 4 Gene; Conjugation of reduced glutathione to a wide number of [...] (222 aa)
Myc	myelocytomatosis oncogene Gene; Participates in the regulation of gene transcription. Binds DNA [...] (454 aa)
Cyp2c54	cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 54 Gene; Metabolizes arachidonic acid mainl [...] (490 aa)
Gstm5	glutathione S-transferase, mu 5 Gene; Conjugation of reduced glutathione to a wide number of ex [...] (224 aa)
Cyp2c37	cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 37 Gene; Metabolizes arachidonic acid to pr [...] (490 aa)
Gstm6	glutathione S-transferase, mu 6 Gene; Conjugation of reduced glutathione to a wide number of ex [...] (232 aa)
Cyp2c39	cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 39 Gene; Metabolizes arachidonic acid to pr [...] (490 aa)
Cyp2c29	cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 29 Gene; Metabolizes arachidonic acid to pr [...] (490 aa)
Cyp2c68	cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 68 Gene (491 aa)
Cyp2c66	cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 66 Gene (490 aa)
Cyp2b9	cytochrome P450, family 2, subfamily b, polypeptide 9 Gene; Cytochromes P450 are a group of hem [...] (491 aa)

Continua/

/Continua

● Cyp2c70	cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 70 Gene; Cytochromes P450 are a group of he [...]	(489 aa)
● Cyp2c38	cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 38 Gene; Metabolizes arachidonic acid to pr [...]	(490 aa)
● Aldh1a3	aldehyde dehydrogenase family 1, subfamily A3 Gene; Recognizes as substrates free retinal and c [...]	(512 aa)
● Aldh3b1	aldehyde dehydrogenase 3 family, member B1 Gene; Oxidizes medium and long chain saturated and u [...]	(468 aa)
● Cyp2f2	cytochrome P450, family 2, subfamily f, polypeptide 2 Gene; Involved in the regio- and stereose [...]	(491 aa)
● Cyp3a13	cytochrome P450, family 3, subfamily a, polypeptide 13 Gene; Can activate aflatoxin B1 to a gen [...]	(503 aa)
● Adh1	alcohol dehydrogenase 1 (class I) Gene (375 aa)	
● Gstp2	glutathione S-transferase, pi 2 Gene; Conjugation of reduced glutathione to a wide number of ex [...]	(210 aa)
● Gstm7	glutathione S-transferase, mu 7 Gene; Conjugation of reduced glutathione to a wide number of ex [...]	(230 aa)
● Ggt1	gamma-glutamyltransferase 1 Gene; Initiates extracellular glutathione (GSH) breakdown, provides [...]	(568 aa)
● Ggh	gamma-glutamyl hydrolase Gene; Hydrolyzes the polyglutamate sidechains of pteroylpolyglutamates [...]	(317 aa)
● Cyp2c44	cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 44 Gene (494 aa)	
● Cyp3a25	cytochrome P450, family 3, subfamily a, polypeptide 25 Gene; Cytochromes P450 are a group of he [...]	(503 aa)
● Foh1	folate hydrolase Gene; Has both folate hydrolase and N-acetylated-alpha-linked- acidic dipeptid [...]	(752 aa)
● Adh5	alcohol dehydrogenase 5 (class III), chi polypeptide Gene; Class-III ADH is remarkably ineffect [...]	(374 aa)
● Cyp2s1	cytochrome P450, family 2, subfamily s, polypeptide 1 Gene; Has a potential importance for extr [...]	(501 aa)
● Aldh3b2	aldehyde dehydrogenase 3 family, member B2 Gene (479 aa)	
● Cyp3a41a	cytochrome P450, family 3, subfamily a, polypeptide 41A Gene (504 aa)	
● Adh7	alcohol dehydrogenase 7 (class IV), mu or sigma polypeptide Gene; Could function in retinol oxi [...]	(374 aa)
● Cyp2b23	cytochrome P450, family 2, subfamily b, polypeptide 23 Gene (491 aa)	
● Ggt6	gamma-glutamyltransferase 6 Gene; Cleaves glutathione conjugates (By similarity) (497 aa)	
● Ggt5	gamma-glutamyltransferase 5 Gene; Cleaves the gamma-glutamyl peptide bond of glutathione conjug [...]	(573 aa)
● Cyp3a44	cytochrome P450, family 3, subfamily a, polypeptide 44 Gene (504 aa)	
● Txndc12	thioredoxin domain containing 12 (endoplasmic reticulum) Gene; Possesses significant protein th [...]	(170 aa)
● Ggt7	gamma-glutamyltransferase 7 Gene; Cleaves glutathione conjugates (By similarity) (662 aa)	
● Cyp2c55	cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 55 Gene; Metabolizes arachidonic acid mainl [...]	(490 aa)
● Gpx8	glutathione peroxidase 8 (putative) Gene (209 aa)	
● Adh4	alcohol dehydrogenase 4 (class II), pi polypeptide Gene; Involved in the reduction of benzoquin [...]	(377 aa)
● Cyp2b13	cytochrome P450, family 2, subfamily b, polypeptide 13 Gene (491 aa)	
● Gpx6	glutathione peroxidase 6 Gene (221 aa)	
● Egfr	epidermal growth factor receptor Gene; The EGF receptor mediates the biological signal of EGF, [...]	(1210 aa)
● Actb	actin, beta Gene; Actins are highly conserved proteins that are involved in various types of ce [...]	(375 aa)
● Tkt	transketolase Gene (623 aa)	
● Taldo1	transaldolase 1 Gene; Transaldolase is important for the balance of metabolites in the pentose- [...]	(337 aa)
● Plg	plasminogen Gene; Plasmin dissolves the fibrin of blood clots and acts as a proteolytic factor [...]	(812 aa)
● Trp53	transformation related protein 53 Gene; Acts as a tumor suppressor in many tumor types; induces [...]	(390 aa)
● App	amyloid beta (A4) precursor protein Gene; Functions as a cell surface receptor and performs phy [...]	(770 aa)
● Ar	androgen receptor Gene; Steroid hormone receptors are ligand-activated transcription factors th [...]	(899 aa)
● Ssh3	slingshot homolog 3 (Drosophila) Gene; Protein phosphatase which may play a role in the regulat [...]	(653 aa)
● Tsfm	Ts translation elongation factor, mitochondrial Gene; Associates with the EF-Tu.GDP complex and [...]	(324 aa)
● Map3k5	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5 Gene; Component of a protein kinase signal tra [...]	(1380 aa)
● Tlr4	toll-like receptor 4 Gene; Cooperates with LY96 and CD14 to mediate the innate immune response [...]	(835 aa)
● Dera	2-deoxyribose-5-phosphate aldolase homolog (C. elegans) Gene (318 aa)	
● Naca	nascent polypeptide-associated complex alpha polypeptide Gene; Prevents inappropriate targeting [...]	(2187 aa)
● Eef1a2	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 2 Gene; This protein promotes the GTP-dependen [...]	(463 aa)
● Tktl1	transketolase-like 1 Gene (595 aa)	
● Tktl2	transketolase-like 2 Gene; Plays an essential role in total transketolase activity and cell pro [...]	(627 aa)
● Ldha	lactate dehydrogenase A Gene (361 aa)	
● Akt1	thymoma viral proto-oncogene 1 Gene; General protein kinase capable of phosphorylating several [...]	(480 aa)
● Gpc3	glypican 3 Gene; Cell surface proteoglycan that bears heparan sulfate. May be involved in the s [...]	(579 aa)
● Rhoa	ras homolog gene family, member A Gene; Regulates a signal transduction pathway linking plasma [...]	(193 aa)
● Gm5138	predicted gene 5138 Pseudogene (333 aa)	
● Pole	polymerase (DNA directed), epsilon Gene; Participates in DNA repair and in chromosomal DNA repl [...]	(2283 aa)
● Pola1	polymerase (DNA directed), alpha 1 Gene; Plays an essential role in the initiation of DNA repli [...]	(1465 aa)
● Pold1	polymerase (DNA directed), delta 1, catalytic subunit Gene; Possesses two enzymatic activities- [...]	(1105 aa)
● Rev3l	REV3-like, catalytic subunit of DNA polymerase zeta RAD54 like (S. cerevisiae) Gene (3122 aa)	
● Alb	albumin Gene; Serum albumin, the main protein of plasma, has a good binding capacity for water, [...]	(608 aa)
● Tnf	tumor necrosis factor Gene; Cytokine that binds to TNFRSF1A/TNFR1 and TNFRSF1B/TNFR. It is mai [...]	(235 aa)
● Il6	interleukin 6 Gene; Cytokine with a wide variety of biological functions. It is a potent induce [...]	(211 aa)
● Cd4	CD4 antigen Gene; Accessory protein for MHC class-II antigen/T-cell receptor interaction. May r [...]	(457 aa)
● Fancc	Fanconi anemia, complementation group C Gene; DNA repair protein that may operate in a postrepl [...]	(591 aa)
● Wdr1	WD repeat domain 1 Gene; Induces disassembly of actin filaments in conjunction with ADF/cofilin [...]	(658 aa)
● Txn1	thioredoxin 1 Gene; Participates in various redox reactions through the reversible oxidation of [...]	(105 aa)
● Casp3	caspase 3 Gene; Involved in the activation cascade of caspases responsible for apoptosis execut [...]	(277 aa)
● Akp3	alkaline phosphatase 3, intestine, not Mn requiring Gene (559 aa)	
● Alpi	alkaline phosphatase, intestinal Gene (554 aa)	
● Alpl	alkaline phosphatase, liver/bone/kidney Gene (524 aa)	
● Alpl2	alkaline phosphatase, placental-like 2 Gene (529 aa)	
● Pkm2	pyruvate kinase, muscle Gene; Glycolytic enzyme that catalyzes the transfer of a phosphoryl gro [...]	(531 aa)
● Cyp4a12a	cytochrome P450, family 4, subfamily a, polypeptide 12a Gene; Cytochromes P450 are a group of h [...]	(508 aa)
● Pklr	pyruvate kinase liver and red blood cell Gene; Plays a key role in glycolysis (By similarity) (574 aa)	
● Fn1	fibronectin 1 Gene; Fibronectins bind cell surfaces and various compounds including collagen, f [...]	(2477 aa)
● Rnase1	ribonuclease, RNase A family, 1 (pancreatic) Gene; Endonuclease that catalyzes the cleavage of [...]	(149 aa)
● Mapk14	mitogen-activated protein kinase 14 Gene; Responds to activation by environmental stress, pro- [...]	(360 aa)
● Vegfa	vascular endothelial growth factor A Gene; Growth factor active in angiogenesis, vasculogenesis [...]	(368 aa)
● Actg1	actin, gamma, cytoplasmic 1 Gene; Actins are highly conserved proteins that are involved in var [...]	(391 aa)
● Hras1	Harvey rat sarcoma virus oncogene 1 Gene; Ras proteins bind GDP/GTP and possess intrinsic GTPas [...]	(274 aa)

ANEXO 4

Parceiros Funcionais Preditos das proteínas identificadas que se mostraram diferentemente expressas entre os grupos B16-F10 controle *versus* tratados, mas que se mostraram igualmente expressos nos grupos Melan-a controle *versus* B16-F10 controle ou Melan-a controle *versus* B16-F10 tratado.

Pfn1	profilin 1 Gene; Binds to actin and affects the structure of the cytoskeleton. At high concentr [...]	(140 aa)
Tlr4	toll-like receptor 4 Gene; Cooperates with LY96 and CD14 to mediate the innate immune response [...]	(835 aa)
Ldha	lactate dehydrogenase A Gene	(361 aa)
Hspe1	heat shock protein 1 (chaperonin 10) Gene; Eukaryotic CPN10 homolog which is essential for mito [...]	(102 aa)
Pfn2	profilin 2 Gene; Binds to actin and affects the structure of the cytoskeleton. At high concentr [...]	(140 aa)
Hspa1a	heat shock protein 1A Gene; In cooperation with other chaperones, Hsp70s stabilize preexistent [...]	(642 aa)
Eno2	enolase 2, gamma neuronal Gene; Has neurotrophic and neuroprotective properties on a broad spec [...]	(434 aa)
Ldhb	lactate dehydrogenase B Gene	(334 aa)
Eno-1	Alpha-enolase (EC 4.2.1.11)(2-phospho-D-glycerate hydro-lyase)(Non-neural enolase)(NNE)(Enolase [...]	(434 aa)
Eno3	enolase 3, beta muscle Gene; Appears to have a function in striated muscle development and rege [...]	(434 aa)
Ak1	adenylate kinase 1 Gene; Catalyzes the reversible transfer of the terminal phosphate group betw [...]	(210 aa)
Gpi1	glucose phosphate isomerase 1 Gene; Besides it's role as a glycolytic enzyme, mammalian GPI can [...]	(558 aa)
Lcp1	lymphocyte cytosolic protein 1 Gene; Actin-binding protein. Plays a role in the activation of T [...]	(627 aa)
Ldhc	lactate dehydrogenase C Gene; Possible role in sperm motility (By similarity)	(332 aa)
Pcx	pyruvate carboxylase Gene; Pyruvate carboxylase catalyzes a 2-step reaction, involving the ATP- [...]	(1178 aa)
Pck2	phosphoenolpyruvate carboxykinase 2 (mitochondrial) Gene; Catalyzes the conversion of oxaloacet [...]	(667 aa)
Pold1	polymerase (DNA directed), delta 1, catalytic subunit Gene; Possesses two enzymatic activities- [...]	(1105 aa)
Aif1	allograft inflammatory factor 1 Gene; Actin-binding protein that enhances membrane ruffling and [...]	(147 aa)
Casp3	caspase 3 Gene; Involved in the activation cascade of caspases responsible for apoptosis execut [...]	(277 aa)
Prkce	protein kinase C, epsilon Gene; This is calcium-independent, phospholipid-dependent, serine- an [...]	(737 aa)
Me2	malic enzyme 2, NAD(+)-dependent, mitochondrial Gene	(589 aa)
Hk1	hexokinase 1 Gene	(945 aa)
Polr1c	polymerase (RNA) I polypeptide C Gene; DNA-dependent RNA polymerase catalyzes the transcription [...]	(346 aa)
Myo1f	myosin IF Gene; Myosins are actin-based motor molecules with ATPase activity. Unconventional my [...]	(1098 aa)
Pfn3	profilin 3 Gene; Binds to actin and affects the structure of the cytoskeleton (By similarity). [...]	(137 aa)
Pck1	phosphoenolpyruvate carboxykinase 1, cytosolic Gene; Catalyzes the conversion of oxaloacetate [...]	(622 aa)
Me3	malic enzyme 3, NADP(+)-dependent, mitochondrial Gene	(604 aa)
Polr2e	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide E Gene; DNA-dependent RNA polymerase catalyzes t [...]	(210 aa)
Myo18b	myosin XVIIIb Gene	(745 aa)
Polr2f	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide F Gene; DNA-dependent RNA polymerase catalyzes t [...]	(127 aa)
Pfn4	profilin family, member 4 Gene; Binds to actin and affects the structure of the cytoskeleton (B [...]	(129 aa)
Polr2c	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide C Gene; DNA-dependent RNA polymerase catalyzes t [...]	(302 aa)
Pola1	polymerase (DNA directed), alpha 1 Gene; Plays an essential role in the initiation of DNA repli [...]	(1465 aa)
Hspa9	heat shock protein 9 Gene; Implicated in the control of cell proliferation and cellular aging. [...]	(679 aa)
ENSMUSG00000056199	Malic enzyme	(203 aa)
Polr2g	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide G Gene; DNA-dependent RNA polymerase catalyzes t [...]	(172 aa)
Pole	polymerase (DNA directed), epsilon Gene; Participates in DNA repair and in chromosomal DNA repl [...]	(2283 aa)
Rrm1	ribonucleotide reductase M1 Gene; Provides the precursors necessary for DNA synthesis. Catalyze [...]	(792 aa)
Gas7	growth arrest specific 7 Gene; May play a role in promoting maturation and morphological differ [...]	(420 aa)
Itpa	inosine triphosphatase (nucleoside triphosphate pyrophosphatase) Gene; Hydrolyzes ITP and dITP [...]	(198 aa)
Nme3	non-metastatic cells 3, protein expressed in Gene; Major role in the synthesis of nucleoside tr [...]	(169 aa)
Nme1	non-metastatic cells 1, protein (NM23A) expressed in Gene; Major role in the synthesis of nucle [...]	(152 aa)
Aldoa	aldolase A, fructose-bisphosphate Gene	(418 aa)
Nme4	non-metastatic cells 4, protein expressed in Gene; Major role in the synthesis of nucleoside tr [...]	(186 aa)
Vps18	vacuolar protein sorting 18 (yeast) Gene; May play a role in vesicle-mediated protein trafficki [...]	(973 aa)
Pdhb	pyruvate dehydrogenase (lipoamide) beta Gene; The pyruvate dehydrogenase complex catalyzes the [...]	(359 aa)
Hk2	hexokinase 2 Gene	(917 aa)
Polr1d	polymerase (RNA) I polypeptide D Gene; DNA-dependent RNA polymerase catalyzes the transcription [...]	(133 aa)
Polr2d	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide D Gene; DNA-dependent RNA polymerase catalyzes t [...]	(142 aa)
Nme2	non-metastatic cells 2, protein (NM23B) expressed in Gene; Major role in the synthesis of nucle [...]	(152 aa)
Pold2	polymerase (DNA directed), delta 2, regulatory subunit Gene; The function of the small subunit [...]	(469 aa)
Ak2	adenylate kinase 2 Gene; Catalyzes the reversible transfer of the terminal phosphate group betw [...]	(239 aa)
Ezr	ezrin Gene; Probably involved in connections of major cytoskeletal structures to the plasma mem [...]	(586 aa)
Pdha2	pyruvate dehydrogenase E1 alpha 2 Gene; The pyruvate dehydrogenase complex catalyzes the overall [...]	(391 aa)
Pdha1	pyruvate dehydrogenase E1 alpha 1 Gene; The pyruvate dehydrogenase complex catalyzes the overall [...]	(390 aa)
Polr2j	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide J Gene; DNA-dependent RNA polymerase catalyzes t [...]	(117 aa)
Prim1	DNA primase, p49 subunit Gene; DNA primase is the polymerase that synthesizes small RNA primers [...]	(417 aa)
Adcy2	adenylate cyclase 2 Gene; This is a membrane-bound, calmodulin-insensitive adenylyl cyclase (By [...]	(1095 aa)
Rrm2	ribonucleotide reductase M2 Gene; Provides the precursors necessary for DNA synthesis. Catalyze [...]	(390 aa)
Cant1	calcium activated nucleotidase 1 Gene; Calcium-dependent nucleotidase with a preference for UDP [...]	(440 aa)
Nme7	non-metastatic cells 7, protein expressed in (nucleoside-diphosphate kinase) Gene; Major role i [...]	(395 aa)
Pola2	polymerase (DNA directed), alpha 2 Gene; May play an essential role at the early stage of chrom [...]	(600 aa)
Nme5	non-metastatic cells 5, protein expressed in (nucleoside-diphosphate kinase) Gene; Does not see [...]	(211 aa)
Nme6	non-metastatic cells 6, protein expressed in (nucleoside-diphosphate kinase) Gene; Major role i [...]	(189 aa)
Guk1	guanylate kinase 1 Gene; Essential for recycling GMP and indirectly, cGMP	(198 aa)
Lhdh	lactate dehydrogenase D Gene	(484 aa)
Polr1b	polymerase (RNA) I polypeptide B Gene; DNA-dependent RNA polymerase catalyzes the transcription [...]	(1135 aa)
Polr3b	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide B Gene; DNA-dependent RNA polymerase catalyzes [...]	(1133 aa)
Polr2b	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide B Gene; DNA-dependent RNA polymerase catalyzes t [...]	(1174 aa)

Continua/

/Continua

● Pnpt1	polyribonucleotide nucleotidyltransferase 1 Gene; Involved in mRNA degradation. Hydrolyzes sing [...] (783 aa)
● Adcy8	adenylate cyclase 8 Gene; This is a membrane-bound, calcium-stimulable adenylyl cyclase. May be [...] (1249 aa)
● Adcy4	adenylate cyclase 4 Gene; This is a membrane-bound, calmodulin-insensitive adenylyl cyclase (By [...] (1077 aa)
● Polr1a	polymerase (RNA) I polypeptide A Gene; DNA-dependent RNA polymerase catalyzes the transcription [...] (1717 aa)
● Polr2a	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide A Gene; DNA-dependent RNA polymerase catalyzes t [...] (1970 aa)
● Polr3a	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide A Gene (1390 aa)
● Whrn	whirlin Gene; Necessary for elongation and maintenance of inner and outer hair cell stereocilia [...] (918 aa)
● Vcl	vinculin Gene; Involved in cell adhesion. May be involved in the attachment of the actin-based [...] (1066 aa)
● Tmsb15b1	thymosin beta 15b1 Gene (80 aa)
● Nudt2	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 2 Gene; Asymmetrically hydrolyzes Ap4 [...] (147 aa)
● Polr3c	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide C Gene; DNA-dependent RNA polymerase catalyzes [...] (533 aa)
● Entpd1	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 Gene; In the nervous system, could hydrolyze A [...] (539 aa)
● Adcy3	adenylate cyclase 3 Gene; Mediates odorant detection (possibly) via modulation of intracellular [...] (1145 aa)
● Adcy9	adenylate cyclase 9 Gene; May play a fundamental role in situations where fine interplay between [...] (1353 aa)
● Gucy1a2	guanylate cyclase 1, soluble, alpha 2 Gene (730 aa)
● Entpd8	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 8 Gene; Canalicular ectonucleoside NTPDase respo [...] (497 aa)
● Znr1	zinc ribbon domain containing, 1 Gene; DNA-dependent RNA polymerase catalyzes the transcription [...] (123 aa)
● Gucy2e	guanylate cyclase 2e Gene (1108 aa)
● Pold3	polymerase (DNA-directed), delta 3, accessory subunit Gene; Required for optimal DNA polymerase [...] (462 aa)
● Adcy7	adenylate cyclase 7 Gene; This is a membrane-bound, calcium-inhibitable adenylyl cyclase (1099 aa)
● Gucy2d	guanylate cyclase 2d Gene (118 aa)
● Adcy6	adenylate cyclase 6 Gene; Membrane-bound, calcium-inhibitable adenylyl cyclase (1168 aa)
● Pole4	polymerase (DNA-directed), epsilon 4 (p12 subunit) Gene; May play a role in allowing polymerase [...] (118 aa)
● Entpd6	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 6 Gene (455 aa)
● Gucy1a3	guanylate cyclase 1, soluble, alpha 3 Gene (691 aa)
● Entpd5	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 5 Gene; Likely to promote reglycosylation reacti [...] (452 aa)
● Entpd4	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 4 Gene; Hydrolyzes preferentially nucleoside 5'- [...] (613 aa)
● Polr3k	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide K Gene; DNA-dependent RNA polymerase catalyzes [...] (108 aa)
● Gucy2f	guanylate cyclase 2f Gene; Probably plays a specific functional role in the rods and/or cones o [...] (1108 aa)
● Polr2l	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide L Gene; DNA-dependent RNA polymerase catalyzes t [...] (67 aa)
● Ak7	adenylate kinase 7 Gene; Play a role in maintaining ciliary structure and function (614 aa)
● Ak5	adenylate kinase 5 Gene; Active on AMP and dAMP with ATP as a donor. When GTP is used as phosph [...] (562 aa)
● Entpd3	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 3 Gene (529 aa)
● Polr3g	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide G Gene; DNA-dependent RNA polymerase catalyzes [...] (223 aa)
● Vps11	vacuolar protein sorting 11 (yeast) Gene; May play a role in vesicle-mediated protein trafficki [...] (941 aa)
● AI449709	RIKEN cDNA 2310079N02 gene Gene; Has nucleotide phosphatase activity towards ATP, GTP, CTP, TTP [...] (190 aa)
● Polr3e	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide E Gene; DNA-dependent RNA polymerase catalyzes [...] (710 aa)
● Gucy2c	guanylate cyclase 2c Gene; Receptor for the E.coli heat-stable enterotoxin (E.coli enterotoxin [...] (1072 aa)
● Ak31l	adenylate kinase 3-like 1 Gene; Catalyzes the reversible transfer of the terminal phosphate gro [...] (342 aa)
● Npr2	natriuretic peptide receptor 2 Gene; Receptor for atrial natriuretic peptide. Has guanylate cyc [...] (1047 aa)
● Pole3	polymerase (DNA directed), epsilon 3 (p17 subunit) Gene; Forms a complex with DNA polymerase ep [...] (145 aa)
● Polr1e	polymerase (RNA) I polypeptide E Gene; DNA-dependent RNA polymerase catalyzes the transcription [...] (482 aa)
● Polr3gl	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide G like Gene (224 aa)
● Gucy1b3	guanylate cyclase 1, soluble, beta 3 Gene (620 aa)
● Npr1	natriuretic peptide receptor 1 Gene; Receptor for atrial natriuretic peptide. Has guanylate cyc [...] (1057 aa)
● Polr3f	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide F Gene; DNA-dependent RNA polymerase catalyzes [...] (316 aa)
● Vps16	vacuolar protein sorting 16 (yeast) Gene; May play a role in vesicle-mediated protein trafficki [...] (839 aa)
● Entpd2	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 2 Gene; In the nervous system, could hydrolyze A [...] (495 aa)
● Adcy10	adenylate cyclase 10 Gene; Soluble adenylyl cyclase that has a critical role in mammalian sperm [...] (1614 aa)
● Prim2	DNA primase, p58 subunit Gene; DNA primase is the polymerase that synthesizes small RNA primers [...] (505 aa)
● Pold4	polymerase (DNA-directed), delta 4 Gene; Required for optimal DNA polymerase delta activity. Ma [...] (107 aa)
● Adcy5	adenylate cyclase 5 Gene; This is a membrane-bound, calcium-inhibitable adenylyl cyclase (1348 aa)
● Polr3h	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide H Gene; DNA-dependent RNA polymerase catalyzes [...] (204 aa)
● Rrm2b	ribonucleotide reductase M2 B (TP53 inducible) Gene; Plays a pivotal role in cell survival by r [...] (351 aa)
● Gucy1b2	guanylate cyclase 1, soluble, beta 2 Gene (824 aa)
● Polr2h	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide H Gene; DNA-dependent RNA polymerase catalyzes t [...] (150 aa)
● Pole2	polymerase (DNA directed), epsilon 2 (p59 subunit) Gene; Participates in DNA repair and in chro [...] (527 aa)
● Adcy1	adenylate cyclase 1 Gene; This is a calmodulin-sensitive adenylyl cyclase. May be involved in r [...] (1118 aa)
● Polr2i	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide I Gene; DNA-dependent RNA polymerase catalyzes t [...] (125 aa)
● Sh2b2	SH2B adaptor protein 2 Gene; Adapter protein for several members of the tyrosine kinase recepto [...] (621 aa)
● Polr3d	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide D Gene; DNA-dependent RNA polymerase catalyzes [...] (398 aa)
● Polr3h	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide H Gene; DNA-dependent RNA polymerase catalyzes [...] (204 aa)
● Rrm2b	ribonucleotide reductase M2 B (TP53 inducible) Gene; Plays a pivotal role in cell survival by r [...] (351 aa)
● Gucy1b2	guanylate cyclase 1, soluble, beta 2 Gene (824 aa)
● Polr2h	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide H Gene; DNA-dependent RNA polymerase catalyzes t [...] (150 aa)
● Pole2	polymerase (DNA directed), epsilon 2 (p59 subunit) Gene; Participates in DNA repair and in chro [...] (527 aa)
● Adcy1	adenylate cyclase 1 Gene; This is a calmodulin-sensitive adenylyl cyclase. May be involved in r [...] (1118 aa)
● Polr2i	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide I Gene; DNA-dependent RNA polymerase catalyzes t [...] (125 aa)
● Sh2b2	SH2B adaptor protein 2 Gene; Adapter protein for several members of the tyrosine kinase recepto [...] (621 aa)
● Polr3d	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide D Gene; DNA-dependent RNA polymerase catalyzes [...] (398 aa)
● Cfl1	cofilin 1, non-muscle Gene; Controls reversibly actin polymerization and depolymerization in a [...] (227 aa)
● Cfl2	cofilin 2, muscle Gene; Controls reversibly actin polymerization and depolymerization in a pH-s [...] (166 aa)
● Tmsb4x	thymosin, beta 4, X chromosome Gene; Plays an important role in the organization of the cytoske [...] (50 aa)
● Vasp	vasodilator-stimulated phosphoprotein Gene; Ena/VASP proteins are actin-associated proteins inv [...] (375 aa)
● Myh9	myosin, heavy polypeptide 9, non-muscle Gene; Cellular myosin that appears to play a role in cy [...] (1960 aa)
● Iqgap1	IQ motif containing GTPase activating protein 1 Gene; Binds to activated CDC42 but does not sti [...] (1657 aa)
● Gck	glucokinase Gene; Catalyzes the initial step in utilization of glucose by the beta-cell and liv [...] (465 aa)
● Dmd	dystrophin, muscular dystrophy Gene; May play a role in anchoring the cytoskeleton to the plasm [...] (3678 aa)
● Actn4	actinin alpha 4 Gene; F-actin cross-linking protein which is thought to anchor actin to a varie [...] (912 aa)

Continua/

/Continua

● Msn	moesin Gene; Probably involved in connections of major cytoskeletal structures to the plasma me [...] (577 aa)
● Actn2	actinin alpha 2 Gene; F-actin cross-linking protein which is thought to anchor actin to a varie [...] (894 aa)
● Tkt	transketolase Gene (623 aa)
● Prkd	protein kinase C, delta Gene; This is calcium-independent, phospholipid-dependent, serine- and [...] (700 aa)
● Myh10	myosin, heavy polypeptide 10, non-muscle Gene; Cellular myosin that appears to play a role in c [...] (2013 aa)
● Arpc2	actin related protein 2/3 complex, subunit 2 Gene; Functions as actin-binding component of the [...] (300 aa)
● Tjp1	tight junction protein 1 Gene; The N-terminal may be involved in transducing a signal required [...] (1745 aa)
● Aldoc	aldolase C, fructose-bisphosphate Gene (363 aa)
● Arpc1b	actin related protein 2/3 complex, subunit 1B Gene; Functions as component of the Arp2/3 comple [...] (376 aa)
● Hkdc1	hexokinase domain containing 1 Gene (915 aa)
● Actn1	actinin, alpha 1 Gene; F-actin cross-linking protein which is thought to anchor actin to a vari [...] (892 aa)
● Was	Wiskott-Aldrich syndrome homolog (human) Gene; Effector protein for Rho-type GTPases, providing [...] (520 aa)
● Wasl	Wiskott-Aldrich syndrome-like (human) Gene; Regulates actin polymerization by stimulating the a [...] (501 aa)
● Mapk14	mitogen-activated protein kinase 14 Gene; Responds to activation by environmental stress, pro- [...] (360 aa)
● Itgb1	integrin beta 1 (fibronectin receptor beta) Gene; Integrins alpha-1/beta-1, alpha-2/beta-1, alp [...] (798 aa)
● Myh11	myosin, heavy polypeptide 11, smooth muscle Gene; Muscle contraction (1972 aa)
● Arpc4	actin related protein 2/3 complex, subunit 4 Gene; Functions as actin-binding component of the [...] (168 aa)
● Myh13	myosin, heavy polypeptide 13, skeletal muscle Gene (1938 aa)
● Tktl1	transketolase-like 1 Gene (595 aa)
● Tktl2	transketolase-like 2 Gene; Plays an essential role in total transketolase activity and cell pro [...] (627 aa)
● Wasf3	WAS protein family, member 3 Gene; Downstream effector molecules involved in the transmission o [...] (501 aa)
● Myh1	myosin, heavy polypeptide 1, skeletal muscle, adult Gene; Muscle contraction (1942 aa)
● Actn3	actinin alpha 3 Gene; F-actin cross-linking protein which is thought to anchor actin to a varie [...] (900 aa)
● Rhoa	ras homolog gene family, member A Gene; Regulates a signal transduction pathway linking plasma [...] (193 aa)
● Coro1a	coronin, actin binding protein 1A Gene; May be a crucial component of the cytoskeleton of high [...] (461 aa)
● Wipf1	WAS/WASL interacting protein family, member 1 Gene; May have direct activity on the actin cytos [...] (493 aa)
● Taldo1	transaldolase 1 Gene; Transaldolase is important for the balance of metabolites in the pentose- [...] (337 aa)
● Wasf2	WAS protein family, member 2 Gene; Downstream effector molecules involved in the transmission o [...] (497 aa)
● Myh3	myosin, heavy polypeptide 3, skeletal muscle, embryonic Gene; Muscle contraction (1940 aa)
● Prkca	protein kinase C, alpha Gene; This is a calcium-activated, phospholipid-dependent, serine- and [...] (672 aa)
● Arpc1a	actin related protein 2/3 complex, subunit 1A Gene; Probably functions as component of the Arp2 [...] (370 aa)
● Arpc3	actin related protein 2/3 complex, subunit 3 Gene; Functions as component of the Arp2/3 complex [...] (178 aa)
● Prkcq	protein kinase C, theta Gene; This is a calcium-independent, phospholipid-dependent, serine- an [...] (707 aa)
● Baiap2	brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2 Gene; Adapter protein that links m [...] (535 aa)
● Aldob	aldolase B, fructose-bisphosphate Gene (364 aa)
● Arpc5	actin related protein 2/3 complex, subunit 5 Gene; Functions as component of the Arp2/3 complex [...] (151 aa)
● Hk3	hexokinase 3 Gene (922 aa)
● Myh6	myosin, heavy polypeptide 6, cardiac muscle, alpha Gene; Muscle contraction (1938 aa)
● Gm5637	predicted pseudogene 5637 (372 aa)
● Hspa5	heat shock protein 5 Gene; Probably plays a role in facilitating the assembly of multimeric pro [...] (655 aa)
● Kat5	K(lysine) acetyltransferase 5 Gene; Catalytic subunit of the NuA4 histone acetyltransferase com [...] (546 aa)
● Pxn	paxillin Gene; Cytoskeletal protein involved in actin-membrane attachment at sites of cell adhe [...] (591 aa)
● Socs3	suppressor of cytokine signaling 3 Gene; SOCS family proteins form part of a classical negative [...] (225 aa)
● Myh2	myosin, heavy polypeptide 2, skeletal muscle, adult Gene (1912 aa)
● Arpc5l	actin related protein 2/3 complex, subunit 5-like Gene; May function as component of the Arp2/3 [...] (153 aa)
● Wasf1	WASP family 1 Gene; Downstream effector molecule involved in the transmission of signals from [...] (559 aa)
● Acta1	actin, alpha 1, skeletal muscle Gene; Actins are highly conserved proteins that are involved in [...] (377 aa)
● Myh4	myosin, heavy polypeptide 4, skeletal muscle Gene; Muscle contraction (1939 aa)
● Dmap1	DNA methyltransferase 1-associated protein 1 Gene; Involved in transcription repression and act [...] (468 aa)
● Itga6	integrin alpha 6 Gene; Integrin alpha-6/beta-1 is a receptor for laminin on platelets. Integrin [...] (1091 aa)
● Tjp2	tight junction protein 2 Gene; Plays a role in tight junctions and adherens junctions (1167 aa)
● Tlr2	toll-like receptor 2 Gene; Cooperates with LY96 to mediate the innate immune response to bacter [...] (784 aa)
● Prkcc	protein kinase C, gamma Gene; This is a calcium-activated, phospholipid-dependent, serine- and [...] (697 aa)
● Myh7	myosin, heavy polypeptide 7, cardiac muscle, beta Gene; Muscle contraction (By similarity) (1935 aa)
● Prkcb	protein kinase C, beta Gene; This is a calcium-activated, phospholipid-dependent, serine- and t [...] (673 aa)
● Prkch	protein kinase C, eta Gene; This is calcium-independent, phospholipid-dependent, serine- and th [...] (683 aa)
● Itgb3	integrin beta 3 Gene; Integrin alpha-V/beta-3 is a receptor for cytotactin, fibronectin, lamini [...] (787 aa)
● Itga5	integrin alpha 5 (fibronectin receptor alpha) Gene; Integrin alpha-5/beta-1 is a receptor for f [...] (1053 aa)
● Myh14	myosin, heavy polypeptide 14 Gene; Cellular myosin that appears to play a role in cytokinesis, [...] (2000 aa)
● Itgav	integrin alpha V Gene; The alpha-V integrins are receptors for vitronectin, cytotactin, fibrone [...] (1044 aa)
● Itga2	integrin alpha 2 Gene; Integrin alpha-2/beta-1 is a collagen receptor, being responsible for ad [...] (1178 aa)
● Itga4	integrin alpha 4 Gene; Integrins alpha-4/beta-1 (VLA-4 or LPAM-2) and alpha-4/beta-7 (LPAM-1) [...] (1038 aa)
● Myh7b	myosin, heavy chain 7B, cardiac muscle, beta Gene; Involved in muscle contraction (By similarit [...] (1941 aa)
● Myh8	myosin, heavy polypeptide 8, skeletal muscle, perinatal Gene; Muscle contraction (1937 aa)
● Zyx	zyxin Gene; Adhesion plaque protein. Binds alpha-actinin and the CRP protein. Important for tar [...] (564 aa)
● Ctnna1	catenin (cadherin associated protein), alpha 1 Gene; Associates with the cytoplasmic domain of [...] (906 aa)
● Itgb4	integrin beta 4 Gene; Integrin alpha-6/beta-4 is a receptor for laminin. It plays a critical st [...] (1818 aa)
● Itga1	integrin alpha 1 Gene; Integrin alpha-1/beta-1 is a receptor for laminin and collagen. It recog [...] (1179 aa)
● Gch1	GTP cyclohydrolase 1 Gene; May positively regulate nitric oxide synthesis in endothelial cells. [...] (241 aa)
● Itgb5	integrin beta 5 Gene; Integrin alpha-V/beta-5 is a receptor for fibronectin. It recognizes the [...] (816 aa)
● Ruvbl2	RuvB-like protein 2 Gene; Possesses single-stranded DNA-stimulated ATPase and ATP- dependent DN [...] (463 aa)
● Yeats4	YEATS domain containing 4 Gene; Component of the NuA4 histone acetyltransferase (HAT) complex w [...] (227 aa)
● Myl12b	myosin, light chain 12B, regulatory Gene; Myosin regulatory subunit that plays an important rol [...] (172 aa)
● Itga3	integrin alpha 3 Gene; Integrin alpha-3/beta-1 is a receptor for fibronectin, laminin, collagen [...] (1068 aa)
● Myl7	myosin, light polypeptide 7, regulatory Gene (175 aa)
● Diap1	diaphanous homolog 1 (Drosophila) Gene; Acts in a Rho-dependent manner to recruit PFY1 to the m [...] (1264 aa)
● Parva	parvin, alpha Gene; Probably plays a role in the regulation of cell adhesion and cytoskeleton o [...] (372 aa)
● Mllt4	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila); translocated to, 4 [...] (1827 aa)
● Tjp3	tight junction protein 3 Gene (904 aa)

Continua/

/Continua

● Tsn	translin Gene; DNA-binding protein that specifically recognizes consensus sequences at the brea [...] (228 aa)
● Parvb	parvin, beta Gene; Probably plays a role in the regulation of cell adhesion and cytoskeleton or [...] (365 aa)
● Itga7	integrin alpha 7 Gene; Integrin alpha-7/beta-1 is the primary laminin receptor on skeletal myob [...] (1180 aa)
● Itga9	integrin alpha 9 Gene (1036 aa)
● Itgb7	integrin beta 7 Gene; Integrin alpha-4/beta-7 (Peyer patches-specific homing receptor LPAM-1) i [...] (806 aa)
● Gm5138	predicted gene 5138 Pseudogene (333 aa)
● Flna	filamin, alpha Gene; Promotes orthogonal branching of actin filaments and links actin filaments [...] (2647 aa)
● Itgb6	integrin beta 6 Gene; Integrin alpha-V/beta-6 is a receptor for fibronectin and cytotactin. It [...] (787 aa)
● Pip5k1c	phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, type 1 gamma Gene; Plays a role in membrane ruffling [...] (661 aa)
● Mocs1	molybdenum cofactor synthesis 1 Gene; Isoform Mocs1a and isoform Mocs1b probably form a complex [...] (636 aa)
● Itga8	integrin alpha 8 Gene; Integrin alpha-8/beta-1 functions in the genesis of kidney and probably [...] (1062 aa)
● Ctnna3	catenin (cadherin associated protein), alpha 3 Gene; May be involved in formation of stretch-re [...] (895 aa)
● Itga2b	integrin alpha 2b Gene; Integrin alpha-IIb/beta-3 is a receptor for fibronectin, fibrinogen, pl [...] (1033 aa)
● Myl9	myosin, light polypeptide 9, regulatory Gene; Myosin regulatory subunit that plays an important [...] (172 aa)
● Dera	2-deoxyribose-5-phosphate aldolase homolog (C. elegans) Gene (318 aa)
● Ctnna2	catenin (cadherin associated protein), alpha 2 Gene; May function as a linker between cadherin [...] (953 aa)
● Arhgap10	Rho GTPase activating protein 10 Gene; GTPase activator for the small GTPases RhoA and Cdc42 by [...] (786 aa)
● Itga11	integrin alpha 11 Gene; Integrin alpha-11/beta-1 is a receptor for collagen (By similarity) (1188 aa)
● Mylpf	myosin light chain, phosphorylatable, fast skeletal muscle Gene (169 aa)
● Itga10	integrin, alpha 10 Gene; Involved in peroxisomal proliferation. May regulate peroxisomes divisi [...] (1167 aa)
● Itgb8	integrin beta 8 Gene (767 aa)
● C80200	RIKEN cDNA 2900073G15 gene Gene (172 aa)
● Parvg	parvin, gamma Gene; Probably plays a role in the regulation of cell adhesion and cytoskeleton o [...] (331 aa)
● Myl10	myosin, light chain 10, regulatory Gene (166 aa)
● Myo1c	myosin IC Gene; Myosins are actin-based motor molecules with ATPase activity. Unconventional my [...] (1063 aa)
● Myo1a	myosin IA Gene; Involved in directing the movement of organelles along actin filaments (Potenti [...] (1043 aa)
● Rac3	RAS-related C3 botulinum substrate 3 Gene; Plasma membrane-associated small GTPase which cycles [...] (192 aa)
● Trrap	transformation/transcription domain-associated protein Gene; Adapter protein, which is found in [...] (3858 aa)
● Actc1	actin, alpha, cardiac muscle 1 Gene; Actins are highly conserved proteins that are involved in [...] (377 aa)
● Pggk1	phosphoglycerate kinase 1 Gene (417 aa)
● Ruvb1	RuvB-like protein 1 Gene; Possesses single-stranded DNA-stimulated ATPase and ATP- dependent DN [...] (456 aa)
● Epc1	enhancer of polycomb homolog 1 (Drosophila) Gene; Component of the NuA4 histone acetyltransfera [...] (813 aa)
● Actl6a	actin-like 6A Gene; Involved in transcriptional activation and repression of select genes by ch [...] (429 aa)
● Eef1a1	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1 Gene; This protein promotes the GTP-dependen [...] (462 aa)
● Myo3a	myosin IIIA Gene; Probable actin-based motor with a protein kinase activity. Probably plays a r [...] (1613 aa)
● Sugt1	SGT1, suppressor of G2 allele of SKP1 (S. cerevisiae) Gene; May play a role in ubiquitination a [...] (336 aa)
● Morf4l1	mortality factor 4 like 1 Gene; Component of the NuA4 histone acetyltransferase complex which i [...] (362 aa)
● Hspa4	heat shock protein 4 Gene (842 aa)
● Myo6	myosin VI Gene; Myosins are actin-based motor molecules with ATPase activity. Unconventional my [...] (1284 aa)
● Tcpl	t-complex protein 1 Gene; Molecular chaperone; assists the folding of proteins upon ATP hydroly [...] (556 aa)
● Ppp1ca	protein phosphatase 1, catalytic subunit, alpha isoform Gene; Protein phosphatase 1 (PP1) is es [...] (330 aa)
● Ppp1cc	protein phosphatase 1, catalytic subunit, gamma isoform Gene; Protein phosphatase 1 (PP1) is es [...] (337 aa)
● Hcfc1	host cell factor C1 Gene; Involved in control of the cell cycle. Also antagonizes transactivati [...] (2090 aa)
● C1qbp	complement component 1, q subcomponent binding protein Gene; Not known. Binds to the globular " [...] (279 aa)
● Myd88	myeloid differentiation primary response gene 88 Gene; Adapter protein involved in the Toll-lik [...] (296 aa)
● Prom1	prominin 1 Gene (867 aa)
● Pfkfb	phosphofructokinase, platelet Gene (784 aa)
● Ly96	lymphocyte antigen 96 Gene; Cooperates with TLR4 in the innate immune response to bacterial lip [...] (160 aa)
● Cald1	caldesmon 1 Gene (769 aa)
● Hspe1-rs1	heat shock protein 1 (chaperonin 10), related sequence 1 Gene (102 aa)
● Palld	palladin, cytoskeletal associated protein Gene; Cytoskeletal protein required for organization [...] (1408 aa)
● Cct6a	chaperonin containing Tcp1, subunit 6a (zeta) Gene; Molecular chaperone; assists the folding of [...] (532 aa)
● Afap1	actin filament associated protein 1 Gene; Can cross-link actin filaments into both network and [...] (731 aa)
● Ppp1cb	protein phosphatase 1, catalytic subunit, beta isoform Gene; Protein phosphatase (PP1) is essen [...] (327 aa)
● Inpp5d	inositol polyphosphate-5-phosphatase D Gene; Phosphatidylinositol (PtdIns) phosphatase that spe [...] (1191 aa)
● Ing3	inhibitor of growth family, member 3 Gene; Component of the NuA4 histone acetyltransferase (HAT [...] (421 aa)
● Stk38	serine/threonine kinase 38 Gene (465 aa)
● Kiaa0664	RIKEN cDNA 1300001I01 gene Gene (1353 aa)
● Myo9b	myosin IXb Gene; Myosins are actin-based motor molecules with ATPase activity. Unconventional m [...] (2143 aa)
● Tlr1	toll-like receptor 1 Gene; Participates in the innate immune response to microbial agents. Coop [...] (795 aa)
● Brd8	bromodomain containing 8 Gene; May act as a coactivator during transcriptional activation by ho [...] (954 aa)
● Tpi1	triosephosphate isomerase 1 Gene (249 aa)
● Ep400	E1A binding protein p400 Gene; Component of the NuA4 histone acetyltransferase complex which is [...] (3072 aa)
● Meaf6	MYST/Esa1-associated factor 6 Gene; Component of the NuA4 histone acetyltransferase complex whi [...] (192 aa)
● Cd2ap	CD2-associated protein Gene; Required for cytokinesis (By similarity). Seems to act as an adapt [...] (674 aa)
● Apc2	adenomatosis polyposis coli 2 Gene; Promotes rapid degradation of CTNNB1 and may function as a [...] (2303 aa)
● Dpysl3	dihydropyrimidinase-like 3 Gene; Necessary for signaling by class 3 semaphorins and subsequent [...] (683 aa)
● Tmod3	tropomodulin 3 Gene; Blocks the elongation and depolymerization of the actin filaments at the p [...] (352 aa)
● Grin1	glutamate receptor, ionotropic, NMDA1 (zeta 1) Gene; NMDA receptor subtype of glutamate-gated i [...] (959 aa)
● Mcl1	myeloid cell leukemia sequence 1 Gene; Involved in the regulation of apoptosis versus cell surv [...] (331 aa)
● Cct8	chaperonin containing Tcp1, subunit 8 (theta) Gene; Molecular chaperone; assist the folding of [...] (548 aa)
● Amot	angiominin Gene; Plays a central role in tight junction maintenance via the complex formed with [...] (929 aa)
● Sept2	septin 2 Gene; Filament-forming cytoskeletal GTPase. Required for normal organization of the ac [...] (361 aa)
● KIAA0644	RIKEN cDNA 1200009O22 gene Gene (809 aa)
● Mll5	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 5 Gene; Histone methyltransferase that specifically [...] (1868 aa)
● Tfpt	TCF3 (E2A) fusion partner Gene (259 aa)
● Pawr	PRKC, apoptosis, WT1, regulator Gene; Pro-apoptotic protein capable of selectively inducing apo [...] (333 aa)
● Ogt	O-linked N-acetylglucosamine (GlcNAc) transferase (UDP-N-acetylglucosamine-polypeptide-N-acetyl [...] (1046 aa)
● Rhoq	ras homolog gene family, member Q Gene; Plasma membrane-associated small GTPase which cycles be [...] (205 aa)

Continua/

/Continua

● Pfkf	phosphofruktokinase, liver, B-type Gene (780 aa)
● Hsp72	heat shock protein 1A Gene; In cooperation with other chaperones, Hsp70s stabilize preexistent [...] (642 aa)
● Gapd	predicted gene 5138 Pseudogene (333 aa)
● Gapdh	predicted gene 5138 Pseudogene (337 aa)
● Gm4609	GAPDH Fragment (333 aa)
● Gm2451	Putative uncharacterized protein Fragment (333 aa)
● ENSMUSG00000078191	Putative uncharacterized protein Fragment (333 aa)
● Phb2	prohibitin 2 Gene; Acts as a mediator of transcriptional repression by nuclear hormone receptor [...] (299 aa)
● Tlr6	toll-like receptor 6 Gene; Participates in the innate immune response to Gram- positive bacteri [...] (806 aa)

ANEXO 5

Parceiros Funcionais Preditos das proteínas identificadas que se mostraram diferentemente expressas entre os grupos B16-F10 e Melan-a controles, mas que se mostraram igualmente expressos nos grupos B16-F10 tratado *versus* controle e Melan-a controle.

● Eif3h	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit H Gene; Component of the eukaryotic transla [...] (352 aa)
● Tapbp	TAP binding protein Gene; Involved in the association of MHC class I with transporter associate [...] (466 aa)
● Canx	calnexin Gene; Calcium-binding protein that interacts with newly synthesized glycoproteins in t [...] (591 aa)
● Pgam1	phosphoglycerate mutase 1 Gene; Interconversion of 3- and 2-phosphoglycerate with 2,3- bisphosp [...] (254 aa)
● Eif3i	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit I Gene; Component of the eukaryotic transla [...] (325 aa)
● Tpi1	triosephosphate isomerase 1 Gene (249 aa)
● Eif3d	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit D Gene; Component of the eukaryotic transla [...] (548 aa)
● Eif3b	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit B Gene; Component of the eukaryotic transla [...] (969 aa)
● Eif3f	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit F Gene; Component of the eukaryotic transla [...] (361 aa)
● Eif3c	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit C Gene; Component of the eukaryotic transla [...] (911 aa)
● Pfn1	profilin 1 Gene; Binds to actin and affects the structure of the cytoskeleton. At high concentr [...] (140 aa)
● Eif3k	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit K Gene; Component of the eukaryotic transla [...] (218 aa)
● Ncl	nucleolin Gene; Nucleolin is the major nucleolar protein of growing eukaryotic cells. It is fou [...] (707 aa)
● Eif3g	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit G Gene; Component of the eukaryotic transla [...] (320 aa)
● Eif3l	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit L Gene; Component of the eukaryotic transla [...] (564 aa)
● Cenpa	centromere protein A Gene; Histone H3-like variant which exclusively replaces conventional H3 i [...] (134 aa)
● Rbbp7	retinoblastoma binding protein 7 Gene; Core histone-binding subunit that may target chromatin r [...] (425 aa)
● ENSMUSG00000073212	predicted gene 5138 Pseudogene (333 aa)
● Rps3	ribosomal protein S3 Gene (243 aa)
● Gapdhs	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, spermatogenic Gene; May play an important role in reg [...] (440 aa)
● Eif3a	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit A Gene; Component of the eukaryotic transla [...] (1344 aa)
● Casp8	caspase 8 Gene; Most upstream protease of the activation cascade of caspases responsible for th [...] (480 aa)
● Casp6	caspase 6 Gene; Involved in the activation cascade of caspases responsible for apoptosis execut [...] (276 aa)
● Plect1	plectin 1 Gene; Interlinks intermediate filaments with microtubules and microfilaments and anch [...] (4691 aa)
● Eef1g	eukaryotic translation elongation factor 1 gamma Gene; Probably plays a role in anchoring the c [...] (437 aa)
● Ldha	lactate dehydrogenase A Gene (361 aa)
● Pfn2	profilin 2 Gene; Binds to actin and affects the structure of the cytoskeleton. At high concentr [...] (140 aa)
● Ruvb1	RuvB-like protein 1 Gene; Possesses single-stranded DNA-stimulated ATPase and ATP- dependent DN [...] (456 aa)
● Eif3m	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit M Gene; Component of the eukaryotic transla [...] (374 aa)
● Pfkfb2	phosphoglycerate kinase 2 Gene (417 aa)
● C1qa	complement component 1, q subcomponent, alpha polypeptide Gene; C1q associates with the proenzy [...] (245 aa)
● Rhobtb1	Rho-related BTB domain containing 1 Gene (695 aa)
● Eef1b2	eukaryotic translation elongation factor 1 beta 2 Gene; EF-1-beta and EF-1-delta stimulate the [...] (225 aa)
● Pgam2	phosphoglycerate mutase 2 Gene; Interconversion of 3- and 2-phosphoglycerate with 2,3- bisphosp [...] (253 aa)
● Rhod	ras homolog gene family, member D Gene; Involved in endosome dynamics. May coordinate membrane [...] (210 aa)
● Eif4g1	eukaryotic translation initiation factor 4, gamma 1 Gene; Component of the protein complex eIF4 [...] (1600 aa)
● Akt1	thymoma viral proto-oncogene 1 Gene; General protein kinase capable of phosphorylating several [...] (480 aa)
● Rps15	ribosomal protein S15 Gene (145 aa)
● Bpgm	2,3-bisphosphoglycerate mutase Gene; Plays a major role in regulating hemoglobin oxygen affinit [...] (259 aa)
● Cenpq	centromere protein Q Gene; Component of the CENPA-CAD (nucleosome distal) complex, a complex re [...] (269 aa)
● Neb	nebulin Gene (6909 aa)
● Eif5	eukaryotic translation initiation factor 5 Gene; Catalyzes the hydrolysis of GTP bound to the 4 [...] (429 aa)
● Eno2	enolase 2, gamma neuronal Gene; Has neurotrophic and neuroprotective properties on a broad spec [...] (434 aa)
● Eif4h	eukaryotic translation initiation factor 4H Gene; Stimulates the RNA helicase activity of EIF4A [...] (248 aa)
● Ldhb	lactate dehydrogenase B Gene (334 aa)
● Eno-1	Alpha-enolase (EC 4.2.1.11)(2-phospho-D-glycerate hydro-lyase)(Non-neural enolase)(NNE)(Enolase [...] (434 aa)
● Eno3	enolase 3, beta muscle Gene; Appears to have a function in striated muscle development and rege [...] (434 aa)
● Cenph	centromere protein H Gene; Component of the CENPA-NAC (nucleosome-associated) complex, a comple [...] (241 aa)
● Rps5	ribosomal protein S5 Gene (204 aa)
● Dmd	dystrophin, muscular dystrophy Gene; May play a role in anchoring the cytoskeleton to the plasm [...] (3678 aa)
● Eif2s1	eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 1 alpha Gene; Functions in the early steps [...] (315 aa)
● Eif4b	eukaryotic translation initiation factor 4B Gene; Required for the binding of mRNA to ribosomes [...] (611 aa)
● Rpl19	ribosomal protein L19 Gene (196 aa)
● Gm9781	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit J (eIF3j)(Eukaryotic translation initiation [...] (263 aa)
● Eif3j	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit J Gene (261 aa)
● Cul1	cullin 1 Gene; Core component of multiple cullin-RING-based SCF (SKP1- CUL1-F-box protein) E3 u [...] (776 aa)
● Ak1	adenylate kinase 1 Gene; Catalyzes the reversible transfer of the terminal phosphate group betw [...] (210 aa)
● Rps9	ribosomal protein S9 Gene (194 aa)
● Pabpc1	poly(A) binding protein, cytoplasmic 1 Gene; Binds the poly(A) tail of mRNA. May be involved in [...] (636 aa)
● Cenpp	centromere protein P Gene; Component of the CENPA-CAD (nucleosome distal) complex, a complex re [...] (286 aa)
● Eif4e	eukaryotic translation initiation factor 4E Gene; Recognizes and binds the 7-methylguanosine-co [...] (217 aa)
● Uba3	ubiquitin-like modifier activating enzyme 3 Gene; Catalytic subunit of the dimeric UBA3-NAE1 E1 [...] (462 aa)
● Gpi1	glucose phosphate isomerase 1 Gene; Besides it's role as a glycolytic enzyme, mammalian GPI can [...] (558 aa)
● Mis18a	RIKEN cDNA 2610039C10 gene Gene; Required for recruitment of CENPA to centromeres and normal ch [...] (217 aa)
● Rbbp4	retinoblastoma binding protein 4 Gene; Core histone-binding subunit that may target chromatin a [...] (425 aa)
● Cdh2	cadherin 2 Gene; Cadherins are calcium dependent cell adhesion proteins. They preferentially in [...] (1191 aa)
● Rpl14	ribosomal protein L14 Gene (217 aa)
● Tmod1	tropomodulin 1 Gene; Blocks the elongation and depolymerization of the actin filaments at the p [...] (359 aa)

Continua/

/Continua

● Des	desmin Gene; Desmin are class-III intermediate filaments found in muscle cells. In adult striat [...] (469 aa)
● Lcp1	lymphocyte cytosolic protein 1 Gene; Actin-binding protein. Plays a role in the activation of T [...] (627 aa)
● Cenpk	centromere protein K Gene; Component of the CENPA-CAD (nucleosome distal) complex, a complex re [...] (306 aa)
● Rps17	ribosomal protein S17 Gene (135 aa)
● Itgb3bp	integrin beta 3 binding protein (beta3-endonexin) Gene; Transcription coregulator that can have [...] (176 aa)
● Mlf1ip	myeloid leukemia factor 1 interacting protein Gene; Component of the CENPA-NAC (nucleosome-asso [...] (410 aa)
● Cenpn	centromere protein N Gene; Component of the CENPA-NAC (nucleosome-associated) complex, a comple [...] (337 aa)
● Rps17	ribosomal protein S17 Gene (135 aa)
● Itgb3bp	integrin beta 3 binding protein (beta3-endonexin) Gene; Transcription coregulator that can have [...] (176 aa)
● Mlf1ip	myeloid leukemia factor 1 interacting protein Gene; Component of the CENPA-NAC (nucleosome-asso [...] (410 aa)
● Cenpn	centromere protein N Gene; Component of the CENPA-NAC (nucleosome-associated) complex, a comple [...] (337 aa)
● Tcap	titin-cap Gene; Muscle assembly regulating factor. Mediates the antiparallel assembly of titin [...] (167 aa)
● Oip5	Opa interacting protein 5 Gene; Required for recruitment of CENPA to centromeres and normal chr [...] (241 aa)
● Prkcsch	protein kinase C substrate 80K-H Gene; Regulatory subunit of glucosidase II (528 aa)
● Cenpo	centromere protein O Gene; Component of the CENPA-CAD (nucleosome distal) complex, a complex re [...] (298 aa)
● Casc5	cancer susceptibility candidate 5 Gene; Part of the MIS12 complex, which may be fundamental for [...] (2119 aa)
● Cenpi	centromere protein I Gene; Component of the CENPA-CAD (nucleosome distal) complex, a complex re [...] (746 aa)
● C79407	Kinetochore-associated protein KNL-2 homolog (Mis18-binding protein 1); Required for recruitmen [...] (998 aa)
● Ldhc	lactate dehydrogenase C Gene; Possible role in sperm motility (By similarity) (332 aa)
● Ganab	alpha glucosidase 2 alpha neutral subunit Gene; Cleaves sequentially the 2 innermost alpha-1,3- [...] (966 aa)
● B2m	beta-2 microglobulin Gene; Component of the class I major histocompatibility complex (MHC). Inv [...] (119 aa)
● Rpl5	ribosomal protein L5 Gene; Required for rRNA maturation and formation of the 60S ribosomal subu [...] (297 aa)
● Fau	Finkel-Biskis-Reilly murine sarcoma virus (FBR-MuSV) ubiquitously expressed (fox derived) Gene (133 aa)
● Rps21	ribosomal protein S21 Gene (83 aa)
● Smarca5	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member [...] (1051 aa)
● Pcx	pyruvate carboxylase Gene; Pyruvate carboxylase catalyzes a 2-step reaction, involving the ATP- [...] (1178 aa)
● H2-M3	histocompatibility 2, M region locus 3 Gene (336 aa)
● Tap1	transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP) Gene; Involved in the transport of [...] (724 aa)
● Gm3086	atlastin GTPase 1 Gene (67 aa)
● Cdc42	cell division cycle 42 homolog (S. cerevisiae) Gene; Plasma membrane-associated small GTPase wh [...] (191 aa)
● Arhgdia	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha Gene; Regulates the GDP/GTP exchange reaction of the [...] (204 aa)
● Senp3	SUMO/sentrin specific peptidase 3 Gene; Deconjugates SUMO2 and SUMO3 from CDCA8. Redox sensor t [...] (568 aa)
● H2-K1	histocompatibility 2, K1, K region Gene; Involved in the presentation of foreign antigens to th [...] (374 aa)
● H2-L	histocompatibility 2, D region Gene; Involved in the presentation of foreign antigens to the im [...] (365 aa)
● Pck2	phosphoenolpyruvate carboxykinase 2 (mitochondrial) Gene; Catalyzes the conversion of oxaloacet [...] (667 aa)
● H2-Q1	histocompatibility 2, Q region locus 1 Gene; Involved in the presentation of foreign antigens t [...] (368 aa)
● Aldoa	aldolase A, fructose-bisphosphate Gene (418 aa)
● Rac1	RAS-related C3 botulinum substrate 1 Gene; Plasma membrane-associated small GTPase which cycles [...] (211 aa)
● Pold1	polymerase (DNA directed), delta 1, catalytic subunit Gene; Possesses two enzymatic activities- [...] (1105 aa)
● Aif1	allograft inflammatory factor 1 Gene; Actin-binding protein that enhances membrane ruffling and [...] (147 aa)
● Cdk2	cyclin-dependent kinase 2 Gene; Involved in the control of the cell cycle. Interacts with cycli [...] (346 aa)
● Rhob	ras homolog gene family, member B Gene; Mediates apoptosis in neoplastically transformed cells [...] (196 aa)
● Myl4	myosin, light polypeptide 4 Gene (193 aa)
● Myl1	myosin, light polypeptide 1 Gene; Regulatory light chain of myosin. Does not bind calcium (188 aa)
● Casq2	calsequestrin 2 Gene; Calsequestrin is a high-capacity, moderate affinity, calcium-binding prot [...] (415 aa)
● Rplp0	ribosomal protein, large, P0 Gene; Ribosomal protein P0 is the functional equivalent of E.coli [...] (317 aa)
● Prkce	protein kinase C, epsilon Gene; This is calcium-independent, phospholipid-dependent, serine- an [...] (737 aa)
● Arhgdib	Rho, GDP dissociation inhibitor (GDI) beta Gene; Regulates the GDP/GTP exchange reaction of the [...] (200 aa)
● Arhgdig	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) gamma Gene; Inhibits GDP/GTP exchange reaction of RhoB. In [...] (225 aa)
● Rac2	RAS-related C3 botulinum substrate 2 Gene; Plasma membrane-associated small GTPase which cycles [...] (192 aa)
● Rpl10a	ribosomal protein L10A Gene (217 aa)
● Me2	malic enzyme 2, NAD(+)-dependent, mitochondrial Gene (589 aa)
● Cd44	CD44 antigen Gene; Main cell surface receptor for hyaluronate. Adhesion to mucosal high endothe [...] (780 aa)
● Rpl4	ribosomal protein L4 Gene (419 aa)
● Hk1	hexokinase 1 Gene (945 aa)
● Erap1	endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 Gene; Aminopeptidase that plays a central role in peptid [...] (930 aa)
● Tpm2	tropomyosin 2, beta Gene; Binds to actin filaments in muscle and non-muscle cells. Plays a cent [...] (307 aa)
● Polr1c	polymerase (RNA) I polypeptide C Gene; DNA-dependent RNA polymerase catalyzes the transcription [...] (346 aa)
● Myo1f	myosin IF Gene; Myosins are actin-based motor molecules with ATPase activity. Unconventional my [...] (1098 aa)
● ENSMUSG00000072377	predicted gene 7030 Pseudogene (88 aa)
● Pfn3	profilin 3 Gene; Binds to actin and affects the structure of the cytoskeleton (By similarity). [...] (137 aa)
● Pck1	phosphoenolpyruvate carboxykinase 1, cytosolic Gene; Catalyzes the conversion of oxaloacetate [...] (622 aa)
● Aldoc	aldolase C, fructose-bisphosphate Gene (363 aa)
● Me3	malic enzyme 3, NADP(+)-dependent, mitochondrial Gene (604 aa)
● H2-T3	histocompatibility 2, T region locus 18 Gene; Involved in the presentation of foreign antigens [...] (386 aa)
● Rhoh	ras homolog gene family, member H Gene; Binds GTP but lacks intrinsic GTPase activity and is re [...] (191 aa)
● Polr2e	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide E Gene; DNA-dependent RNA polymerase catalyzes t [...] (210 aa)
● H2-T9	histocompatibility 2, T region locus 10 Gene (379 aa)
● H2-M10.4	histocompatibility 2, M region locus 10.4 Gene (331 aa)
● Myl3	myosin, light polypeptide 3 Gene; Regulatory light chain of myosin. Does not bind calcium (204 aa)
● Tap2	transporter 2, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP) Gene; Involved in the transport of [...] (702 aa)
● H2-Q6	histocompatibility 2, Q region locus 1 Gene; Involved in the presentation of foreign antigens t [...] (333 aa)
● H2-M10.2	histocompatibility 2, M region locus 10.2 Gene (329 aa)
● H2-M5	histocompatibility 2, M region locus 6, pseudogene Pseudogene (341 aa)
● Gm8909	predicted gene 8909 Gene; Involved in the presentation of foreign antigens to the immune system [...] (393 aa)
● H2-M9	histocompatibility 2, M region locus 9 Gene (342 aa)
● H2-gs10	MHC class I like protein GS10 Gene (354 aa)
● H2-M2	histocompatibility 2, M region locus 2 Gene (346 aa)
● H2-M10.3	histocompatibility 2, M region locus 10.3 Gene (330 aa)
● H2-M10.5	histocompatibility 2, M region locus 10.5 Gene (330 aa)

Continua/

/Continua

● ENSMUSG00000064308	RIKEN cDNA 2410137M14 gene Gene (162 aa)
● H2-M11	histocompatibility 2, M region locus 11 Gene (336 aa)
● H2-M1	histocompatibility 2, M region locus 1 Gene (344 aa)
● H2-Q10	histocompatibility 2, Q region locus 10 Gene; Involved in the presentation of foreign antigens [...] (363 aa)
● H2-M10.6	histocompatibility 2, M region locus 10.6 Gene (330 aa)
● H2-M10.1	histocompatibility 2, M region locus 10.1 Gene (331 aa)
● Rpl18	ribosomal protein L18 Gene (188 aa)
● Rac3	RAS-related C3 botulinum substrate 3 Gene; Plasma membrane-associated small GTPase which cycles [...] (192 aa)
● Rpl18a	ribosomal protein L18A Gene (176 aa)
● Myo18b	myosin XVIIIb Gene (745 aa)
● Polr2f	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide F Gene; DNA-dependent RNA polymerase catalyzes t [...] (127 aa)
● Pfn4	profilin family, member 4 Gene; Binds to actin and affects the structure of the cytoskeleton (B [...] (129 aa)
● Src	Rous sarcoma oncogene Gene (541 aa)
● Pfkf	phosphofructokinase, liver, B-type Gene (780 aa)
● Zeb1	zinc finger E-box binding homeobox 1 Gene; Acts as a transcriptional repressor. Binds to E-box [...] (1117 aa)
● Polr2c	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide C Gene; DNA-dependent RNA polymerase catalyzes t [...] (302 aa)
● Pola1	polymerase (DNA directed), alpha 1 Gene; Plays an essential role in the initiation of DNA repli [...] (1465 aa)
● ENSMUSG00000056199	Malic enzyme (203 aa)
● Polr2g	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide G Gene; DNA-dependent RNA polymerase catalyzes t [...] (172 aa)
● Rpl22	ribosomal protein L22 Gene (128 aa)
● Arhgap11a	Rho GTPase activating protein 11A Gene (987 aa)
● RhoF	ras homolog gene family, member f Gene; Plasma membrane-associated small GTPase which cycles be [...] (211 aa)
● Pole	polymerase (DNA directed), epsilon Gene; Participates in DNA repair and in chromosomal DNA repl [...] (2283 aa)
● Rpl8	ribosomal protein L8 Gene (257 aa)
● Rpl23	ribosomal protein L23 Gene (140 aa)
● Rrm1	ribonucleotide reductase M1 Gene; Provides the precursors necessary for DNA synthesis. Catalyze [...] (792 aa)
● Tnni3	troponin I, cardiac 3 Gene; Troponin I is the inhibitory subunit of troponin, the thin filament [...] (211 aa)
● Thbs1	thrombospondin 1 Gene; Adhesive glycoprotein that mediates cell-to-cell and cell-to-matrix inte [...] (1171 aa)
● Gas7	growth arrest specific 7 Gene; May play a role in promoting maturation and morphological differ [...] (420 aa)
● Aldob	aldolase B, fructose-bisphosphate Gene (364 aa)
● Ube2m	ubiquitin-conjugating enzyme E2M (UBC12 homolog, yeast) Gene; Accepts the ubiquitin-like protei [...] (183 aa)
● Itpa	inosine triphosphatase (nucleoside triphosphate pyrophosphatase) Gene; Hydrolyzes ITP and dITP [...] (198 aa)
● Racgap1	Rac GTPase-activating protein 1 Gene; Essential for the early stages of embryogenesis and may p [...] (628 aa)
● Eif2s2	eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 2 (beta) Gene; eIF-2 functions in the early [...] (331 aa)
● Eif5b	eukaryotic translation initiation factor 5B Gene; Function in general translation initiation by [...] (1216 aa)
● Nme3	non-metastatic cells 3, protein expressed in Gene; Major role in the synthesis of nucleoside tr [...] (169 aa)
● Tnnt2	troponin T2, cardiac Gene; Troponin T is the tropomyosin-binding subunit of troponin, the thin [...] (302 aa)
● Nme1	non-metastatic cells 1, protein (NM23A) expressed in Gene; Major role in the synthesis of nucle [...] (152 aa)
● Il2	interleukin 2 Gene; Produced by T-cells in response to antigenic or mitogenic stimulation, this [...] (169 aa)
● Tpm1	tropomyosin 1, alpha Gene; Binds to actin filaments in muscle and non-muscle cells. Plays a cen [...] (326 aa)
● Nme4	non-metastatic cells 4, protein expressed in Gene; Major role in the synthesis of nucleoside tr [...] (186 aa)
● Syde2	synapse defective 1, Rho GTPase, homolog 2 (C. elegans) Gene (1096 aa)
● Arhgap12	Rho GTPase activating protein 12 Gene; GTPase activator for the Rho-type GTPases by converting [...] (838 aa)
● Vps18	vacuolar protein sorting 18 (yeast) Gene; May play a role in vesicle-mediated protein trafficki [...] (973 aa)
● Lrp1	low density lipoprotein receptor-related protein 1 Gene; Endocytic receptor involved in endocyt [...] (4545 aa)
● Pdhb	pyruvate dehydrogenase (lipoamide) beta Gene; The pyruvate dehydrogenase complex catalyzes the [...] (359 aa)
● Hk2	hexokinase 2 Gene (917 aa)
● Polr1d	polymerase (RNA) I polypeptide D Gene; DNA-dependent RNA polymerase catalyzes the transcription [...] (133 aa)
● Polr2d	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide D Gene; DNA-dependent RNA polymerase catalyzes t [...] (142 aa)
● Nme2	non-metastatic cells 2, protein (NM23B) expressed in Gene; Major role in the synthesis of nucle [...] (152 aa)
● Pold2	polymerase (DNA directed), delta 2, regulatory subunit Gene; The function of the small subunit [...] (469 aa)
● Ak2	adenylate kinase 2 Gene; Catalyzes the reversible transfer of the terminal phosphate group betw [...] (239 aa)
● Ezr	ezrin Gene; Probably involved in connections of major cytoskeletal structures to the plasma mem [...] (586 aa)
● Pdha2	pyruvate dehydrogenase E1 alpha 2 Gene; The pyruvate dehydrogenase complex catalyzes the overall [...] (391 aa)
● Pdha1	pyruvate dehydrogenase E1 alpha 1 Gene; The pyruvate dehydrogenase complex catalyzes the overall [...] (390 aa)
● Polr2j	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide J Gene; DNA-dependent RNA polymerase catalyzes t [...] (117 aa)
● Prim1	DNA primase, p49 subunit Gene; DNA primase is the polymerase that synthesizes small RNA primers [...] (417 aa)
● G3bp2	GTPase activating protein (SH3 domain) binding protein 2 Gene; Probable scaffold protein that m [...] (482 aa)
● Ctcf	CCCTC-binding factor Gene; Chromatin binding factor that binds to DNA sequence specific sites. [...] (736 aa)
● Rplp1	ribosomal protein, large, P1 Gene; Plays an important role in the elongation step of protein sy [...] (114 aa)
● Myl2	myosin, light polypeptide 2, regulatory, cardiac, slow Gene (176 aa)
● Adcy2	adenylate cyclase 2 Gene; This is a membrane-bound, calmodulin-insensitive adenylyl cyclase (By [...] (1095 aa)
● Rpl3l	ribosomal protein L3-like Gene (240 aa)
● Rrm2	ribonucleotide reductase M2 Gene; Provides the precursors necessary for DNA synthesis. Catalyze [...] (390 aa)
● Cant1	calcium activated nucleotidase 1 Gene; Calcium-dependent nucleotidase with a preference for UDP [...] (440 aa)
● Myh3	myosin, heavy polypeptide 3, skeletal muscle, embryonic Gene; Muscle contraction (1940 aa)
● Nme7	non-metastatic cells 7, protein expressed in (nucleoside-diphosphate kinase) Gene; Major role i [...] (395 aa)
● Rplp2	ribosomal protein, large P2 Gene; Plays an important role in the elongation step of protein syn [...] (115 aa)
● Pola2	polymerase (DNA directed), alpha 2 Gene; May play an essential role at the early stage of chrom [...] (600 aa)
● Nme5	non-metastatic cells 5, protein expressed in (nucleoside-diphosphate kinase) Gene; Does not see [...] (211 aa)
● Nme6	non-metastatic cells 6, protein expressed in (nucleoside-diphosphate kinase) Gene; Major role i [...] (189 aa)
● Guk1	guanylate kinase 1 Gene; Essential for recycling GMP and indirectly, cGMP (198 aa)
● Ldhd	lactate dehydrogenase D Gene (484 aa)
● Rpl37	ribosomal protein L37 Gene; Binds to the 23S rRNA (By similarity) (97 aa)
● Polr1b	polymerase (RNA) I polypeptide B Gene; DNA-dependent RNA polymerase catalyzes the transcription [...] (1135 aa)
● Polr3b	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide B Gene; DNA-dependent RNA polymerase catalyzes [...] (1133 aa)
● Polr2b	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide B Gene; DNA-dependent RNA polymerase catalyzes t [...] (1174 aa)
● Myo9a	myosin IXa Gene; Myosins are actin-based motor molecules with ATPase activity. Unconventional m [...] (2631 aa)
● Pnpt1	polyribonucleotide nucleotidyltransferase 1 Gene; Involved in mRNA degradation. Hydrolyzes sing [...] (783 aa)
● Adcy8	adenylate cyclase 8 Gene; This is a membrane-bound, calcium-stimulable adenylyl cyclase. May be [...] (1249 aa)

Continua/

/Continua

● Cdk1	cyclin-dependent kinase 1 Gene; Plays a key role in the control of the eukaryotic cell cycle. I [...]	(297 aa)
● Polr1a	polymerase (RNA) I polypeptide A Gene; DNA-dependent RNA polymerase catalyzes the transcription [...]	(1717 aa)
● Rhoj	ras homolog gene family, member J Gene; GTP-binding protein with GTPase activity. Elicits the f [...]	(214 aa)
● Polr2a	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide A Gene; DNA-dependent RNA polymerase catalyzes t [...]	(1970 aa)
● Rhov	ras homolog gene family, member V Gene; Plays a role in the control of the actin cytoskeleton v [...]	(236 aa)
● Rhou	ras homolog gene family, member U Gene; Acts upstream of PAK1 to regulate the actin cytoskeleto [...]	(261 aa)
● Polr3a	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide A Gene	(1390 aa)
● Rhoq	ras homolog gene family, member Q Gene; Plasma membrane-associated small GTPase which cycles be [...]	(205 aa)
● Rhobtb2	Rho-related BTB domain containing 2 Gene	(728 aa)
● Gdi1	guanosine diphosphate (GDP) dissociation inhibitor 1 Gene; Regulates the GDP/GTP exchange react [...]	(447 aa)
● Arhgap5	Rho GTPase activating protein 5 Gene; GTPase-activating protein for Rho family members. May pla [...]	(1503 aa)
● Grf1	glucocorticoid receptor DNA binding factor 1 Gene; Represses transcription of the glucocorticoi [...]	(1499 aa)
● Whrm	whirlin Gene; Necessary for elongation and maintenance of inner and outer hair cell stereocilia [...]	(918 aa)
● Vcl	vinculin Gene; Involved in cell adhesion. May be involved in the attachment of the actin-based [...]	(1066 aa)
● Tmsb15b1	thymosin beta 15b1 Gene	(80 aa)
● Rpl38	ribosomal protein L38 Gene	(70 aa)
● Gm5138	predicted gene 5138 Pseudogene	(333 aa)
● Nudt2	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 2 Gene; Asymmetrically hydrolyzes Ap4 [...]	(147 aa)
● AU040829	Rho GTPase-activating protein RICH2 (RhoGAP interacting with CIP4 homologs protein 2)(Rho-type [...]	(814 aa)
● Ralbp1	ralA binding protein 1 Gene; Can activate specifically hydrolysis of GTP bound to RAC1 and CDC4 [...]	(648 aa)
● Polr3c	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide C Gene; DNA-dependent RNA polymerase catalyzes [...]	(533 aa)
● Tnni1	troponin I, skeletal, slow 1 Gene; Troponin I is the inhibitory subunit of troponin, the thin f [...]	(187 aa)
● Entpd1	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 Gene; In the nervous system, could hydrolyze A [...]	(539 aa)
● Adcy3	adenylate cyclase 3 Gene; Mediates odorant detection (possibly) via modulation of intracellular [...]	(1145 aa)
● Adcy9	adenylate cyclase 9 Gene; May play a fundamental role in situations where fine interplay betwee [...]	(1353 aa)
● Mybpc1	myosin binding protein C, slow-type Gene	(1127 aa)
● Gm7030	predicted gene 7030 Pseudogene	(38 aa)
● Gucy1a2	guanylate cyclase 1, soluble, alpha 2 Gene	(730 aa)
● Gm5820	predicted gene 5820 Gene; GTPase-activating protein for RHOA and CDC42 (By similarity)	(847 aa)
● rho-gap	RIKEN cDNA 1100001E04 gene Gene	(590 aa)
● Arhgap4	Rho GTPase activating protein 4 Gene	(965 aa)
● Entpd8	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 8 Gene; Canalicular ectonucleoside NTPDase respo [...]	(497 aa)
● Ophn1	oligophrenin 1 Gene; Stimulates GTP hydrolysis of members of the Rho family. Its action on RHOA [...]	(802 aa)
● Znrd1	zinc ribbon domain containing, 1 Gene; DNA-dependent RNA polymerase catalyzes the transcription [...]	(123 aa)
● Arhgap25	Rho GTPase activating protein 25 Gene; GTPase activator for the Rho-type GTPases by converting [...]	(648 aa)
● Chn1	chimerin (chimaerin) 1 Gene; GTPase-activating protein for p21-rac and a phorbol ester receptor [...]	(459 aa)
● Arhgap22	Rho GTPase activating protein 22 Gene; Rho GTPase-activating protein involved in the signal tra [...]	(702 aa)
● Arhgap1	Rho GTPase activating protein 1 Gene; GTPase activator for the Rho, Rac and Cdc42 proteins, con [...]	(479 aa)
● Arhgap30	Rho GTPase activating protein 30 Gene; GTPase activator for the Rho-type GTPases by converting [...]	(1101 aa)
● Gucy2e	guanylate cyclase 2e Gene	(1108 aa)
● Pold3	polymerase (DNA-directed), delta 3, accessory subunit Gene; Required for optimal DNA polymerase [...]	(462 aa)
● Arhgap17	Rho GTPase activating protein 17 Gene; Rho GTPase-activating protein involved in the maintenanc [...]	(874 aa)
● Hmha1	histocompatibility (minor) HA-1 Gene; GTPase activator for the Rho-type GTPases (Potential)	(1127 aa)
● Tnn2	troponin C2, fast Gene; Troponin is the central regulatory protein of striated muscle contracti [...]	(160 aa)
● Dlc1	deleted in liver cancer 1 Gene; Functions as a GTPase-activating protein specific for Rho and a [...]	(1126 aa)
● Myo9b	myosin IXb Gene; Myosins are actin-based motor molecules with ATPase activity. Unconventiona [...]	(2143 aa)
● Adcy7	adenylate cyclase 7 Gene; This is a membrane-bound, calcium-inhibitable adenylyl cyclase	(1099 aa)
● Gucy2d	guanylate cyclase 2d Gene	(118 aa)
● Adcy6	adenylate cyclase 6 Gene; Membrane-bound, calcium-inhibitable adenylyl cyclase	(1168 aa)
● Pole4	polymerase (DNA-directed), epsilon 4 (p12 subunit) Gene; May play a role in allowing polymerase [...]	(118 aa)
● Arhgap24	Rho GTPase activating protein 24 Gene; Rho GTPase-activating protein involved in cell polarity, [...]	(747 aa)
● Entpd6	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 6 Gene	(455 aa)
● Gucy1a3	guanylate cyclase 1, soluble, alpha 3 Gene	(691 aa)
● Abr	active BCR-related gene Gene; GTPase-activating protein for RAC and CDC42. Promotes the exchang [...]	(871 aa)
● Fam13a	family with sequence similarity 13, member A Gene	(693 aa)
● Srgap3	SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 3 Gene; GTPase-activating protein for RAC1 and perhaps [...]	(1099 aa)
● Arap1	ArfGAP with RhoGAP domain, ankyrin repeat and PH domain 1 Gene; Phosphatidylinositol-3,4,5-tris [...]	(1452 aa)
● Srgap1	SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 1 Gene; GTPase-activating protein for RhoA and Cdc42 sm [...]	(1085 aa)
● Tnn3	troponin T3, skeletal, fast Gene; Troponin T is the tropomyosin-binding subunit of troponin, th [...]	(272 aa)
● Rhot1	ras homolog gene family, member T1 Gene; Mitochondrial GTPase involved in mitochondrial traffic [...]	(704 aa)
● Trip10	thyroid hormone receptor interactor 10 Gene; Required to coordinate membrane tubulation with re [...]	(603 aa)
● Arap2	ArfGAP with RhoGAP domain, ankyrin repeat and PH domain 2 Gene; Phosphatidylinositol-3,4,5-tris [...]	(1703 aa)
● Arhgap10	Rho GTPase activating protein 10 Gene; GTPase activator for the small GTPases RhoA and Cdc42 by [...]	(786 aa)
● Kalrn	kalirin, RhoGEF kinase Gene; Promotes the exchange of GDP by GTP. Activates specific Rho GTPase [...]	(2982 aa)
● Entpd5	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 5 Gene; Likely to promote reglycosylation reacti [...]	(452 aa)
● Tnn1	troponin T1, skeletal, slow Gene; Troponin T is the tropomyosin-binding subunit of troponin, th [...]	(262 aa)
● Inpp5b	inositol polyphosphate-5-phosphatase B Gene	(997 aa)
● Arhgap9	Rho GTPase activating protein 9 Gene	(648 aa)
● Mybpc2	myosin binding protein C, fast-type Gene; Thick filament-associated protein located in the cros [...]	(1136 aa)
● Arhgap20	Rho GTPase activating protein 20 Gene; GTPase activator for the Rho-type GTPases by converting [...]	(1182 aa)
● Entpd4	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 4 Gene; Hydrolyzes preferentially nucleoside 5'- [...]	(613 aa)
● Depdc1b	DEP domain containing 1B Gene	(529 aa)
● Rpl37a	ribosomal protein L37a Gene	(92 aa)
● Arhgap15	Rho GTPase activating protein 15 Gene; GTPase activator for the Rho-type GTPases by converting [...]	(481 aa)
● Stard13	STAR-related lipid transfer (START) domain containing 13 Gene; May function as a GTPase-activat [...]	(1132 aa)
● Grit	Rho GTPase-activating protein Gene; GTPase-activating protein (GAP) promoting GTP hydrolysis on [...]	(1740 aa)
● Gmip	Gem-interacting protein Gene; Stimulates, in vitro and in vivo, the GTPase activity of RhoA (By [...]	(971 aa)

Continua/

/Continua

● Arhgap18	Rho GTPase activating protein 18 Gene; GTPase activator for the Rho-type GTPases by converting [...] (663 aa)
● Rhot2	ras homolog gene family, member T2 Gene; Mitochondrial GTPase involved in mitochondrial traffic [...] (627 aa)
● Arhgap29	Rho GTPase activating protein 29 Gene; GTPase activator for the Rho-type GTPases by converting [...] (1266 aa)
● Polr3k	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide K Gene; DNA-dependent RNA polymerase catalyzes [...] (108 aa)
● Gucy2f	guanylate cyclase 2f Gene; Probably plays a specific functional role in the rods and/or cones o [...] (1108 aa)
● Stard8	START domain containing 8 Gene; Accelerates GTPase activity of RHOA and CDC42, but not RAC1. St [...] (1019 aa)
● Polr2l	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide L Gene; DNA-dependent RNA polymerase catalyzes t [...] (67 aa)
● Ak7	adenylate kinase 7 Gene; Play a role in maintaining ciliary structure and function (614 aa)
● Ak5	adenylate kinase 5 Gene; Active on AMP and dAMP with ATP as a donor. When GTP is used as phosph [...] (562 aa)
● Bcr	breakpoint cluster region Gene; GTPase-activating protein for RAC1 and CDC42. Promotes the exch [...] (1270 aa)
● Fam13b	family with sequence similarity 13, member B Gene (851 aa)
● Rsf1	remodeling and spacing factor 1 Gene (1441 aa)
● Entpd3	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 3 Gene (529 aa)
● D15Wsu169e	Uncharacterized protein KIAA1688 (1107 aa)
● Chn2	chimerin (chimaerin) 2 Gene; GTPase-activating protein for p21-rac (By similarity) (468 aa)
● Arap3	ArfGAP with RhoGAP domain, ankyrin repeat and PH domain 3 Gene; Phosphatidylinositol-3,4,5-tris [...] (1538 aa)
● Polr3g	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide G Gene; DNA-dependent RNA polymerase catalyzes [...] (223 aa)
● Vps11	vacuolar protein sorting 11 (yeast) Gene; May play a role in vesicle-mediated protein trafficki [...] (941 aa)
● AI449709	RIKEN cDNA 2310079N02 gene Gene; Has nucleotide phosphatase activity towards ATP, GTP, CTP, TTP [...] (190 aa)
● Pik3r2	phosphatidylinositol 3-kinase, regulatory subunit, polypeptide 2 (p85 beta) Gene; Binds to acti [...] (722 aa)
● Arhgap6	Rho GTPase activating protein 6 Gene; GTPase activator for the Rho-type GTPases by converting t [...] (987 aa)
● Tnni2	troponin I, skeletal, fast 2 Gene; Troponin I is the inhibitory subunit of troponin, the thin f [...] (190 aa)
● Polr3e	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide E Gene; DNA-dependent RNA polymerase catalyzes [...] (710 aa)
● Srgap2	SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 2 Gene; Putative GTPase-activating protein for Rho fami [...] (1098 aa)
● Gucy2c	guanylate cyclase 2c Gene; Receptor for the E.coli heat-stable enterotoxin (E.coli enterotoxin [...] (1072 aa)
● Mug1	murinoglobulin 1 Gene; A proteinase activates the inhibitor by specific proteolysis in the bait [...] (1476 aa)
● A2m	alpha-2-macroglobulin Gene; Is able to inhibit all four classes of proteinases by a unique 'tra [...] (1474 aa)
● Ak31l	adenylate kinase 3-like 1 Gene; Catalyzes the reversible transfer of the terminal phosphate gro [...] (342 aa)
● Npr2	natriuretic peptide receptor 2 Gene; Receptor for atrial natriuretic peptide. Has guanylate cyc [...] (1047 aa)
● Pole3	polymerase (DNA directed), epsilon 3 (p17 subunit) Gene; Forms a complex with DNA polymerase ep [...] (145 aa)
● Polr1e	polymerase (RNA) I polypeptide E Gene; DNA-dependent RNA polymerase catalyzes the transcription [...] (482 aa)
● Polr3gl	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide G like Gene (224 aa)
● Gucy1b3	guanylate cyclase 1, soluble, beta 3 Gene (620 aa)
● Npr1	natriuretic peptide receptor 1 Gene; Receptor for atrial natriuretic peptide. Has guanylate cyc [...] (1057 aa)
● Polr3f	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide F Gene; DNA-dependent RNA polymerase catalyzes [...] (316 aa)
● Vps16	vacuolar protein sorting 16 (yeast) Gene; May play a role in vesicle-mediated protein trafficki [...] (839 aa)
● Mybpc3	myosin binding protein C, cardiac Gene; Thick filament-associated protein located in the crossb [...] (1278 aa)
● Depdc7	DEP domain containing 7 Gene (511 aa)
● Entpd2	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 2 Gene; In the nervous system, could hydrolyze A [...] (495 aa)
● Adcy10	adenylate cyclase 10 Gene; Soluble adenylyl cyclase that has a critical role in mammalian sperm [...] (1614 aa)
● Prim2	DNA primase, p58 subunit Gene; DNA primase is the polymerase that synthesizes small RNA primers [...] (505 aa)
● Arhgap19	Rho GTPase activating protein 19 Gene; GTPase activator for the Rho-type GTPases by converting [...] (494 aa)
● Pold4	polymerase (DNA-directed), delta 4 Gene; Required for optimal DNA polymerase delta activity. Ma [...] (107 aa)
● Arhgap28	Rho GTPase activating protein 28 Gene; GTPase activator for the Rho-type GTPases by converting [...] (729 aa)
● Adcy5	adenylate cyclase 5 Gene; This is a membrane-bound, calcium-inhibitable adenylyl cyclase (1348 aa)
● Cdgap	CDC42 GTPase-activating protein Gene; Functions as a GTPase-activating protein (GAP) for RAC1 a [...] (1425 aa)
● Polr3h	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide H Gene; DNA-dependent RNA polymerase catalyzes [...] (204 aa)
● Rrm2b	ribonucleotide reductase M2 B (TP53 inducible) Gene; Plays a pivotal role in cell survival by r [...] (351 aa)
● Gucy1b2	guanylate cyclase 1, soluble, beta 2 Gene (824 aa)
● Tnncl	troponin C, cardiac/slow skeletal Gene; Troponin is the central regulatory protein of striated [...] (161 aa)
● Polr2h	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide H Gene; DNA-dependent RNA polymerase catalyzes t [...] (150 aa)
● Pole2	polymerase (DNA directed), epsilon 2 (p59 subunit) Gene; Participates in DNA repair and in chro [...] (527 aa)
● Adcy1	adenylate cyclase 1 Gene; This is a calmodulin-sensitive adenylyl cyclase. May be involved in r [...] (1118 aa)
● Polr2i	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide I Gene; DNA-dependent RNA polymerase catalyzes t [...] (125 aa)
● Arhgap8	Rho GTPase-activating protein 8 (Rho-type GTPase-activating protein 8); GTPase activator for th [...] (425 aa)
● Sh2b2	SH2B adaptor protein 2 Gene; Adapter protein for several members of the tyrosine kinase recepto [...] (621 aa)
● Ocr1	oculocerebrorenal syndrome of Lowe Gene (900 aa)
● Polr3d	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide D Gene; DNA-dependent RNA polymerase catalyzes [...] (398 aa)
● Fkbp2	FK506 binding protein 2 Gene; PPIases accelerate the folding of proteins. It catalyzes the cis- [...] (140 aa)
● Calm1	calmodulin 1 Gene; Calmodulin mediates the control of a large number of enzymes and other prote [...] (197 aa)
● Cfl1	cofilin 1, non-muscle Gene; Controls reversibly actin polymerization and depolymerization in a [...] (227 aa)
● Cfl2	cofilin 2, muscle Gene; Controls reversibly actin polymerization and depolymerization in a pH-s [...] (166 aa)
● Rock2	Rho-associated coiled-coil containing protein kinase 2 Gene; Regulates the assembly of the acti [...] (1388 aa)
● Tmsb4x	thymosin, beta 4, X chromosome Gene; Plays an important role in the organization of the cytoske [...] (50 aa)
● Dlk2	delta-like 2 homolog (Drosophila) Gene (425 aa)
● Plk1	polo-like kinase 1 (Drosophila) Gene; Serine/threonine-protein kinase that performs several imp [...] (603 aa)
● Vasp	vasodilator-stimulated phosphoprotein Gene; Ena/VASP proteins are actin-associated proteins inv [...] (375 aa)
● Myh9	myosin, heavy polypeptide 9, non-muscle Gene; Cellular myosin that appears to play a role in cy [...] (1960 aa)
● Iqgap1	IQ motif containing GTPase activating protein 1 Gene; Binds to activated CDC42 but does not sti [...] (1657 aa)
● Pla2g4a	phospholipase A2, group IVA (cytosolic, calcium-dependent) Gene; Selectively hydrolyzes arachid [...] (748 aa)
● Plg	plasminogen Gene; Plasmin dissolves the fibrin of blood clots and acts as a proteolytic factor [...] (812 aa)
● Gck	glucokinase Gene; Catalyzes the initial step in utilization of glucose by the beta-cell and liv [...] (465 aa)
● Actn4	actinin alpha 4 Gene; F-actin cross-linking protein which is thought to anchor actin to a varie [...] (912 aa)
● Msn	moesin Gene; Probably involved in connections of major cytoskeletal structures to the plasma me [...] (577 aa)
● Actn2	actinin alpha 2 Gene; F-actin cross-linking protein which is thought to anchor actin to a varie [...] (894 aa)
● Trp53	transformation related protein 53 Gene; Acts as a tumor suppressor in many tumor types; induces [...] (390 aa)
● Tkt	transketolase Gene (623 aa)

Continua/

/Continua

● Stat3	signal transducer and activator of transcription 3 Gene; Transcription factor that binds to the [...] (770 aa)
● Prkcd	protein kinase C, delta Gene; This is calcium-independent, phospholipid-dependent, serine- and [...] (700 aa)
● Cul2	cullin 2 Gene; Core component of multiple cullin-RING-based ECS (ElonginB/C-CUL2/5-SOCS-box pro [...] (745 aa)
● Insr	insulin receptor Gene; This receptor binds insulin and has a tyrosine-protein kinase activity. [...] (1372 aa)
● Myh10	myosin, heavy polypeptide 10, non-muscle Gene; Cellular myosin that appears to play a role in c [...] (2013 aa)
● Zfx2	zinc fingers and homeoboxes 2 Gene; Acts as a transcriptional repressor (By similarity) (836 aa)
● Arpc2	actin related protein 2/3 complex, subunit 2 Gene; Functions as actin-binding component of the [...] (300 aa)
● Tjp1	tight junction protein 1 Gene; The N-terminal may be involved in transducing a signal required [...] (1745 aa)
● App	amyloid beta (A4) precursor protein Gene; Functions as a cell surface receptor and performs phy [...] (770 aa)
● Lpl	lipoprotein lipase Gene; The primary function of this lipase is the hydrolysis of triglycerides [...] (474 aa)
● Arpc1b	actin related protein 2/3 complex, subunit 1B Gene; Functions as component of the Arp2/3 comple [...] (376 aa)
● Hkdc1	hexokinase domain containing 1 Gene (915 aa)
● Hspa1a	heat shock protein 1A Gene; In cooperation with other chaperones, Hsp70s stabilize preexistent [...] (642 aa)
● Actn1	actinin, alpha 1 Gene; F-actin cross-linking protein which is thought to anchor actin to a vari [...] (892 aa)
● Fn1	fibronectin 1 Gene; Fibronectins bind cell surfaces and various compounds including collagen, f [...] (2477 aa)
● Plk2	polo-like kinase 2 (Drosophila) Gene; May play a role in the division of at least some cell typ [...] (682 aa)
● Was	Wiskott-Aldrich syndrome homolog (human) Gene; Effector protein for Rho-type GTPases, providing [...] (520 aa)
● Wasl	Wiskott-Aldrich syndrome-like (human) Gene; Regulates actin polymerization by stimulating the a [...] (501 aa)
● Pelp1	proline, glutamic acid and leucine rich protein 1 Gene; Coactivator of estrogen receptor-mediat [...] (1123 aa)
● Naca	nascent polypeptide-associated complex alpha polypeptide Gene; Prevents inappropriate targeting [...] (2187 aa)
● Itgb1	integrin beta 1 (fibronectin receptor beta) Gene; Integrins alpha-1/beta-1, alpha-2/beta-1, alp [...] (798 aa)
● Myh11	myosin, heavy polypeptide 11, smooth muscle Gene; Muscle contraction (1972 aa)
● Ifit1	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1 Gene (463 aa)
● Mcm7	minichromosome maintenance deficient 7 (S. cerevisiae) Gene; Acts as a factor that allows the D [...] (719 aa)
● Arpc4	actin related protein 2/3 complex, subunit 4 Gene; Functions as actin-binding component of the [...] (168 aa)
● Myh13	myosin, heavy polypeptide 13, skeletal muscle Gene (1938 aa)
● Cops5	COP9 (constitutive photomorphogenic) homolog, subunit 5 (Arabidopsis thaliana) Gene; Probable p [...] (334 aa)
● Tkt1	transketolase-like 1 Gene (595 aa)
● Tktl2	transketolase-like 2 Gene; Plays an essential role in total transketolase activity and cell pro [...] (627 aa)
● Wasf3	WAS protein family, member 3 Gene; Downstream effector molecules involved in the transmission o [...] (501 aa)
● Myh1	myosin, heavy polypeptide 1, skeletal muscle, adult Gene; Muscle contraction (1942 aa)
● Lmnb1	lamin B1 Gene; Lamins are components of the nuclear lamina, a fibrous layer on the nucleoplasm [...] (588 aa)
● Actn3	actinin alpha 3 Gene; F-actin cross-linking protein which is thought to anchor actin to a varie [...] (900 aa)
● Rhoa	ras homolog gene family, member A Gene; Regulates a signal transduction pathway linking plasma [...] (193 aa)
● Coro1a	coronin, actin binding protein 1A Gene; May be a crucial component of the cytoskeleton of high [...] (461 aa)
● Gm14446	predicted gene 14446 (Gm14446), transcript variant 2, mRNA (470 aa)
● Wipf1	WAS/WASL interacting protein family, member 1 Gene; May have direct activity on the actin cytos [...] (493 aa)
● Taldo1	transaldolase 1 Gene; Transaldolase is important for the balance of metabolites in the pentose- [...] (337 aa)
● Wasf2	WAS protein family, member 2 Gene; Downstream effector molecules involved in the transmission o [...] (497 aa)
● Prkca	protein kinase C, alpha Gene; This is a calcium-activated, phospholipid-dependent, serine- and [...] (672 aa)
● Arpc1a	actin related protein 2/3 complex, subunit 1A Gene; Probably functions as component of the Arp2 [...] (370 aa)
● Arpc3	actin related protein 2/3 complex, subunit 3 Gene; Functions as component of the Arp2/3 complex [...] (178 aa)
● Prkcg	protein kinase C, theta Gene; This is a calcium-independent, phospholipid-dependent, serine- an [...] (707 aa)
● Baiap2	brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2 Gene; Adapter protein that links m [...] (535 aa)
● Arpc5	actin related protein 2/3 complex, subunit 5 Gene; Functions as component of the Arp2/3 complex [...] (151 aa)
● Ftcd	formiminotransferase cyclodeaminase Gene; Folate-dependent enzyme, that displays both transfera [...] (541 aa)
● Hk3	hexokinase 3 Gene (922 aa)
● Lgalp1	lectin, galactose binding, soluble 1 Gene; May regulate apoptosis, cell proliferation and cell [...] (135 aa)
● P4hb	prolyl 4-hydroxylase, beta polypeptide Gene; This multifunctional protein catalyzes the formati [...] (509 aa)
● Myh6	myosin, heavy polypeptide 6, cardiac muscle, alpha Gene; Muscle contraction (1938 aa)
● Csnk2a2	casein kinase 2, alpha prime polypeptide Gene; Casein kinases are operationally defined by thei [...] (350 aa)
● Aqp2	aquaporin 2 Gene; Forms a water-specific channel that provides the plasma membranes of renal co [...] (271 aa)
● Gm5637	predicted pseudogene 5637 (372 aa)
● Mink1	misshapen-like kinase 1 (zebrafish) Gene; Serine/threonine kinase that may play a role in the r [...] (1344 aa)
● Cdh1	cadherin 1 Gene; Cadherins are calcium-dependent cell adhesion proteins. They preferentially in [...] (884 aa)
● Kat5	K(lysine) acetyltransferase 5 Gene; Catalytic subunit of the NuA4 histone acetyltransferase com [...] (546 aa)
● Scrib	scribbled homolog (Drosophila) Gene; Scaffold protein involved in different aspects of polariz [...] (1665 aa)
● Pxn	paxillin Gene; Cytoskeletal protein involved in actin-membrane attachment at sites of cell adhe [...] (591 aa)
● Eif1ay	eukaryotic translation initiation factor 1A, Y-linked Gene; Seems to be required for maximal ra [...] (144 aa)
● Cdkn2a	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A Gene; Capable of inducing cell cycle arrest in G1 and G2 p [...] (169 aa)
● Bcar1	breast cancer anti-estrogen resistance 1 Gene; Docking protein which plays a central coordinati [...] (874 aa)
● Cebpalpha	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha Gene; C/EBP is a DNA-binding protein that recogni [...] (359 aa)
● Myh2	myosin, heavy polypeptide 2, skeletal muscle, adult Gene (1912 aa)
● Alk	anaplastic lymphoma kinase Gene; Orphan receptor with a tyrosine-protein kinase activity. Appea [...] (1621 aa)
● Arpc5l	actin related protein 2/3 complex, subunit 5-like Gene; May function as component of the Arp2/3 [...] (153 aa)
● Wasf1	WASP family 1 Gene; Downstream effector molecules involved in the transmission of signals from [...] (559 aa)
● Hsp90b1	heat shock protein 90, beta (Grp94), member 1 Gene; Molecular chaperone that functions in the p [...] (802 aa)
● Acta1	actin, alpha 1, skeletal muscle Gene; Actins are highly conserved proteins that are involved in [...] (377 aa)
● Myh4	myosin, heavy polypeptide 4, skeletal muscle Gene; Muscle contraction (1939 aa)
● Dmap1	DNA methyltransferase 1-associated protein 1 Gene; Involved in transcription repression and act [...] (468 aa)
● Etv4	ets variant gene 4 (E1A enhancer binding protein, E1AF) Gene; Binds to the PEA3 motif (5'-AGGAA [...] (486 aa)
● Itga6	integrin alpha 6 Gene; Integrin alpha-6/beta-1 is a receptor for laminin on platelets. Integrin [...] (1091 aa)
● Nos3	nitric oxide synthase 3, endothelial cell Gene; Produces nitric oxide (NO) which is implicated [...] (1202 aa)
● Tjp2	tight junction protein 2 Gene; Plays a role in tight junctions and adherens junctions (1167 aa)
● S100a6	S100 calcium binding protein A6 (calcyclin) Gene; May function as calcium sensor and contribute [...] (89 aa)
● Nop58	NOP58 ribonucleoprotein homolog (yeast) Gene; Required for 60S ribosomal subunit biogenesis (By [...] (536 aa)

Continua/

/Continua

● Prkcc	protein kinase C, gamma Gene; This is a calcium-activated, phospholipid-dependent, serine- and [...] (697 aa)
● Myh7	myosin, heavy polypeptide 7, cardiac muscle, beta Gene; Muscle contraction (By similarity) (1935 aa)
● Prkcb	protein kinase C, beta Gene; This is a calcium-activated, phospholipid-dependent, serine- and t [...] (673 aa)
● Prkch	protein kinase C, eta Gene; This is calcium-independent, phospholipid-dependent, serine- and th [...] (683 aa)
● Eif2s3y	eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 3, structural gene Y-linked Gene; eIF-2 fun [...] (472 aa)
● Eif2s3x	eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 3, structural gene X-linked Gene; eIF-2 fun [...] (472 aa)
● Itgb3	integrin beta 3 Gene; Integrin alpha-V/beta-3 is a receptor for cytotactin, fibronectin, lamini [...] (787 aa)
● Prkg1	protein kinase, cGMP-dependent, type I Gene; Phosphorylates PPP1R12A (By similarity) (686 aa)
● Ncr1	natural cytotoxicity triggering receptor 1 Gene; Cytotoxicity-activating receptor that may cont [...] (325 aa)
● Itga5	integrin alpha 5 (fibronectin receptor alpha) Gene; Integrin alpha-5/beta-1 is a receptor for f [...] (1053 aa)
● Myh14	myosin, heavy polypeptide 14 Gene; Cellular myosin that appears to play a role in cytokinesis, [...] (2000 aa)
● Tgfb1	transforming growth factor, beta 1 Gene; Multifunctional protein that controls proliferation, d [...] (390 aa)
● Itgav	integrin alpha V Gene; The alpha-V integrins are receptors for vitronectin, cytotactin, fibrone [...] (1044 aa)
● Itga2	integrin alpha 2 Gene; Integrin alpha-2/beta-1 is a collagen receptor, being responsible for ad [...] (1178 aa)
● Itga4	integrin alpha 4 Gene; Integrins alpha-4/beta-1 (VLA-4 or LPAM-2) and alpha- 4/beta-7 (LPAM-1) [...] (1038 aa)
● Myh7b	myosin, heavy chain 7B, cardiac muscle, beta Gene; Involved in muscle contraction (By similarit [...] (1941 aa)
● Myh8	myosin, heavy polypeptide 8, skeletal muscle, perinatal Gene; Muscle contraction (1937 aa)
● Eif1a	eukaryotic translation initiation factor 1A Gene; Seems to be required for maximal rate of prot [...] (144 aa)
● Zyx	zyxin Gene; Adhesion plaque protein. Binds alpha-actinin and the CRP protein. Important for tar [...] (564 aa)
● Foxm1	RIKEN cDNA 4933413G19 gene Gene; Transcriptional activatory factor. May play a role in the cont [...] (757 aa)
● Atp6v1f	ATPase, H+ transporting, lysosomal V1 subunit F Gene; Subunit of the peripheral V1 complex of v [...] (119 aa)
● Nub1	negative regulator of ubiquitin-like proteins 1 Gene; Specific down-regulator of the NEDD8 conj [...] (614 aa)
● Ndel1	nuclear distribution gene E-like homolog 1 (A. nidulans) Gene; Required for organization of the [...] (345 aa)
● Ctnna1	catenin (cadherin associated protein), alpha 1 Gene; Associates with the cytoplasmic domain of [...] (906 aa)
● Itgb4	integrin beta 4 Gene; Integrin alpha-6/beta-4 is a receptor for laminin. It plays a critical st [...] (1818 aa)
● Itga1	integrin alpha 1 Gene; Integrin alpha-1/beta-1 is a receptor for laminin and collagen. It recog [...] (1179 aa)
● Tceb2	transcription elongation factor B (SIII), polypeptide 2 Gene; SIII, also known as elongin, is a [...] (118 aa)
● Gpc3	glypican 3 Gene; Cell surface proteoglycan that bears heparan sulfate. May be involved in the s [...] (579 aa)
● Gch1	GTP cyclohydrolase 1 Gene; May positively regulate nitric oxide synthesis in endothelial cells. [...] (241 aa)
● Itgb5	integrin beta 5 Gene; Integrin alpha-V/beta-5 is a receptor for fibronectin. It recognizes the [...] (816 aa)
● Ruvbl2	RuvB-like protein 2 Gene; Possesses single-stranded DNA-stimulated ATPase and ATP- dependent DN [...] (463 aa)
● Yeats4	YEATS domain containing 4 Gene; Component of the NuA4 histone acetyltransferase (HAT) complex w [...] (227 aa)
● Myl12b	myosin, light chain 12B, regulatory Gene; Myosin regulatory subunit that plays an important rol [...] (172 aa)
● C1qb	complement component 1, q subcomponent, beta polypeptide Gene; C1q associates with the proenzym [...] (253 aa)
● S100g	S100 calcium binding protein G Gene (80 aa)
● Nanog	Nanog homeobox Gene; Transcription regulator involved in inner cell mass and embryonic stem (ES [...] (305 aa)
● Gata6	GATA binding protein 6 Gene; Transcriptional activator. Involved in gene regulation specificall [...] (589 aa)
● Rbck1	RanBP-type and C3HC4-type zinc finger containing 1 Gene; Might act as an E3 ubiquitin-protein I [...] (508 aa)
● Skp1a	S-phase kinase-associated protein 1A Gene; Essential component of the SCF (SKP1-CUL1-F-box prot [...] (163 aa)
● Itga3	integrin alpha 3 Gene; Integrin alpha-3/beta-1 is a receptor for fibronectin, laminin, collagen [...] (1068 aa)
● Myl7	myosin, light polypeptide 7, regulatory Gene (175 aa)
● Diap1	diaphanous homolog 1 (Drosophila) Gene; Acts in a Rho-dependent manner to recruit PFY1 to the m [...] (1264 aa)
● Pomp	proteasome maturation protein Gene; Molecular chaperone essential for the assembly of standard [...] (141 aa)
● Parva	parvin, alpha Gene; Probably plays a role in the regulation of cell adhesion and cytoskeleton o [...] (372 aa)