



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

KAIO MORAES DE FARIAS

**EFEITOS FARMACOLÓGICOS, FENOTÍPICOS E PROTEÔMICOS DO
TRATAMENTO COM PTC (+) EM LINHAGENS DE CÂNCER DE PRÓSTATA**

FORTALEZA

2017

KAIO MORAES DE FARIAS

EFEITOS FARMACOLÓGICOS, FENOTÍPICOS E PROTEÔMICOS DO TRATAMENTO
COM PTC (+) EM LINHAGENS DE PRÓSTATA

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação da Rede Nordeste de Biotecnologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutorado em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia em Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Claudia do Ó Pessoa
Co-orientador: Prof. Dr. Hernandes Faustino de Carvalho

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- F238e Farias, Kaio Moraes de.
Efeitos farmacológicos, fenotípicos e proteômicos do tratamento com PTC (+) em linhagens de câncer de próstata / Kaio Moraes de Farias. – 2017.
256 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (Rede Nordeste de Biotecnologia), Fortaleza, 2017.
Orientação: Prof. Dr. Claudia do Ó Pessoa .
Coorientação: Prof. Dr. Hernandes Faustino de Carvalho.
1. Neoplasia. 2. Drug discovery. 3. Isoflavonóides. 4. Atividade anti-câncer . I. Título.
CDD 660.6
-

KAIO MORAES DE FARIAS

EFEITOS FARMACOLÓGICOS, FENOTÍPICOS E PROTEÔMICOS DO TRATAMENTO
COM PTC (+) EM LINHAGENS DE CÂNCER DE PRÓSTATA

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação da Rede Nordeste de Biotecnologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutorado em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia em Saúde.

Aprovada em: 16/10/2017

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Cláudia do Ó Pessoa (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. Hernandes Faustino de Carvalho (Co-orientador)
Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

Profa. Dra. Marcília Pinheiro da Costa
Universidade Federal do Piauí – UFPI

Prof. Dr. Arlindo de Alencar Araripe Noronha Moura
Universidade Federal do Ceará – UFC

Profa. Dra. Ana Cristina de Oliveira Monteiro Moreira
Universidade de Fortaleza – UNIFOR

Prof. Dr. Marcos Venício Alves Lima
Instituto do Câncer Ceará – IC

Profa. Dra. Cristiana Libardi Miranda Furtado
Universidade Federal do Ceará – UFC

Dedico esta tese a Deus, aos meus pais, irmãos
e amigos

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dra. Claudia Pessoa pela oportunidade de trabalhar em sua equipe no LOE. Pelos exemplos como profissional e como pessoa. Por ter acreditado que eu poderia desenvolver um bom trabalho. Pelo investimento, pela paciência, pelas orientações e por ter me dado todo o suporte para que eu pudesse concluir essa tese. Fazendo jus ao que me foi proposto em nossa primeira conversa, espero ter correspondido. Obrigado por tudo!

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Hernandes Faustino de Carvalho por ter me recebido na Unicamp e ter dado todo o suporte para que esse trabalho fosse concluído. Por ter confiado em mim, acreditando que os resultados gerados seriam muito importantes não só para a tese, mas também para minha formação. Obrigado pelas lições e pelas orientações.

Agradeço ao Prof Dr. Daniel Martins de Sousa pela confiança ao me receber no Laboratório de Neuroproteômica – LNP, acreditando que nosso trabalho e nossa colaboração seria de grande valia para geração de resultados consistentes e valiosos aqui apresentados.

Ao Prof. Dr. Manuel Odorico de Moraes pelo investimento no LOE e por ceder o espaço do laboratório, incentivando o interesse pela pesquisa aos demais integrantes do Núcleo de Pesquisa e de Desenvolvimento de Medicamentos - NPDM.

Aos meus pais, José Rogério de Farias e Maria França Moraes de Farias, e irmãos, Josefranci Moraes de Farias e Kauê Moraes de Farias, pelo carinho, confiança, paciência e incentivo. Por mostrar o caminho certo, o caminho da verdade, visando sempre a decência como ser humano. Aos meus sobrinhos Jackson Filho e Kauã Benício.

Em especial, à Profa. Dra. Diana Magalhães de Oliveira, pela oportunidade de ter iniciado minha carreira científica e, ainda, desenvolvido em mim, o espírito e o interesse na pesquisa, buscando sempre a verdade, ética e a criticidade. Meu eterno agradecimento.

Aos meus amigos sempre presentes na minha vida! Agradeço a vocês. Sem a nossa amizade, muitos dos meus “experimentos” teriam dado errado! Haha O meu obrigado: Derval Araújo, Flaviano Pereira, Sheila Pereira, Claudio Castro, Carlos Eduardo Alves Soares, Daniel Viana, Fabio Venâncio, Ubiratan Diniz, Marcília Pinheiro, Aline Mesquita, Filomena (Filó), Carol Meira, Giovanna Krawiec, Danielle Miranda, Julio Santana, Glenn McGugan (Glenny), Mariana Baratti (Mari), Léo & Tiago, Airton Rodrigues, Vladimir Onofre.

Em especial, agradeço ao meus amigos Carlos Henrique e Rafaela Ribeiro pela amizade verdadeira, pela paciência, por ter me recebido como membro da família em Campinas. Esse período foi mágico! Eu percebi verdadeiramente quando a amizade existe e o

quanto ela pode ser gratificante no momento em que conhecemos as pessoas certas. Sem o apoio deles, grande parte dessa tese não poderia ser realizada. Muito obrigado meus amigos!!!!

Aos amigos e também colegas do LOE: Marcília Pinheiro, Cristiana Libardi, Maria Júlia, Carlos Koscky, Silvana França, Bianca França, Adelânia Marinho, Cássia Evagelista, Claudia Luciano, Daisy Lima, Andréa Felinto, Sarah Sant'Anna, Renan Santos, Stefâncio Barreto, Treissy Soares, Bruno Soares, Daniel Pascoalino, Augusto César, Francilene Silva, Igor Bomfim, Bruno Cavalcanti, Danilo Damasceno, Teiliane Rodrigues, Neto, Washington, Dona Rogéria pelos momentos de descontração, paciência e ajuda constante.

À tod@s alun@s e pessoas maravilhosas que conheci em Campinas/Unicamp: Edmarcia Elise, Danilo Ferucci, Andrés Osorio, Isabella Barbutti, Mariana Baratti, Guilherme Barbosa, Ariane Tocci, Aline Zanatta, João Ito, André Amaral, Caroline Zanatta, Carol Brandão, Sheila Garcia, Adriano Aquino, Juliana Cassoli, Juliana Minardi.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para minha formação acadêmica e para a formação deste trabalho, tornando a minha vida mais especial.

Este trabalho foi realizado com o auxílio das seguintes instituições:

Universidade Federal do Ceará- UFC

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico- CNPq

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- CAPES

Financiadora de Estudos e Projetos- FINEP

Fundação Cearense de Amparo a Pesquisa- FUNCAP

RESUMO

As neoplasias malignas estão aumentando com o controle progressivo de outras doenças e o conseqüente envelhecimento da população. A busca de agentes anti-câncer ainda é uma necessidade vez que os fármacos disponíveis, até agora, não são suficientes para controlar a doença. Além disso, muitos compostos têm efeitos secundários indesejáveis bastante pronunciados ou bem como, as células desenvolvem resistência, o que limita o tratamento. Os pterocarpanos representam a maior classe de isoflavonóides, depois das isoflavonas e estudos mostram atividades tais como: antifúngicas, antibacterianas, insecticidas e antitumorais. O presente estudo avaliou o efeito antiproliferativo do pterocarpano dextrógeno (PTC (+)) em linhagens tumorais de próstata, com maior destaque para a linhagem de PC3, utilizando de abordagem farmacológica, fenotípica e proteômica. Os resultados evidenciam a potencial atividade anti-câncer que o PTC (+) causou contra as linhagens de próstata, causando parada na divisão celular (G_2/M) em prometáfase, diminuindo, assim, a proliferação celular. A disposição dos fusos mitóticos em monopólos foram, em sua maioria, presentes nos tratamentos de 2,5 μM e 7,95 μM . O tratamento com PTC (+) causou desorganização dos centrossomos, comprometendo sua integridade, entretanto, o tratamento não impediu a divisão dos centríolos. Ainda, após longo período de exposição ao PTC (+), a rede de actina foi comprometida pela desorganização das fibras e polarização em regiões corticais e em pontos focais no citoplasma celular. O tratamento com PTC (+) modificou o proteoma de PC3. As proteínas diferencialmente expressas foram analisadas em termos de seus processos biológicos, função molecular, componente celular, vias e classe de proteína. As proteínas associadas aos processos de citoesqueleto, dobramento/desdobramento, rede de actina e divisão celular foram, em sua maioria, reguladas negativamente no tratamento. Curiosamente a proteína do gene *CHD3* (subregulada) é apontada como potencial desencadeador de todos os efeitos fenotípicos observados. O PTC (+) apresentou resultados que levam a crer que seu mecanismo de ação envolva mais de um alvo, tornando-o, assim, um modelo na pesquisa e desenvolvimento de compostos multi-alvos e de ação multi-segmentada.

Palavras-chave: neoplasia; *drug discovery*; isoflavonóides; atividade anti-câncer

ABSTRACT

Malignant neoplasms are increasing with the progressive control of other diseases and consequent aging of the population. The search for anticancer agents is still necessary since the drugs available so far are not enough to control the disease. In addition, many drugs have quite pronounced side effects or the cells develop resistance, which limits a therapy. Pterocarpan (PTC) represent the major class of isoflavonoids after isoflavones and studies show activities such as: antifungal, antibacterial, insecticidal and antitumor. The present study evaluated the antiproliferative effect of PTC (+) on prostate cancer cell lines, most prominently for a PC3 cell line. A pharmacological, phenotypic and proteomic approach was used. The results showed a potential anti-cancer activity that the PTC (+) caused against prostate cell lines, causing cell cycle arrest in (G₂/M) in prometaphase, decreasing cell proliferation. The arrangement of mitotic spindles in monopoles, for the most part, was present in 2.5 μM and 7.95 μM treatments. The treatment with PTC (+) caused disorganization of the centrosomes, compromising their integrity; however, the treatment did not prevent the division of the centrioles. Furthermore, after a long period of exposure to PTC, the actin network was compromised by fiber disorganization and polarization in cortical regions and at focal points in the cellular cytoplasm. The treatment with PTC (+) modified the PC3 proteome. Differentially expressed proteins were analyzed in terms of their biological processes, molecular function, cellular component, pathways and class of protein. Proteins associated with cytoskeletal processes, folding/unfolding, actin network and cell division were, for the most part, negatively regulated in the treatment. Interestingly, a *CH3* (downregulated) gene's protein is identified as a potential trigger for all observed phenotypic effects. The PTC (+) results presented suggest that its mechanism of action involves more than one target, making it a model in the research and development of multi-target compounds and multi-segmented action.

Keywords: neoplasia; drug discovery; isoflavonoids; anti-cancer activity

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Distribuição proporcional dos dez tipos de cânceres mais incidentes estimados para 2016.....	20
Figura 2 –	Características do câncer.....	21
Figura 3 –	Visualização genérica do ciclo celular.....	25
Figura 4 –	Progressão de células tumorais independente de andrógenos no câncer de próstata.....	31
Figura 5 –	Mecanismo de ação dos andrógenos e sinalização do receptor de andrógeno em células de próstata.....	32
Figura 6 –	Os principais componentes do centríolo.....	45
Figura 7 –	O ciclo de divisão dos centríolos e maturação dos centrosomos.....	46
Figura 8 –	Numeração e estereoquímica da estrutura dos pterocarpanos.....	55
Figura 9 –	Delineamento experimental contendo as principais etapas metodológicas.	59
Figura 10 –	Estruturas dos pterocarpanos.....	60
Figura 11 –	Synapt G2. Compartimentos do espectrômetro de massas.....	69
Figura 12 –	Esquema dos tipos de fragmentação por dissociação induzida por colisão (CID).....	70
Figura 13 –	Inibição da proliferação de linhagens de PC3, LNCaP, DU-145 e RWPE-1 pelo PTC, composto dextrógiro (+), após 24, 48 e 72 horas de incubação.....	76
Figura 14 –	Visualização por microscopia óptica.....	79
Figura 15 –	Visualização por coloração de panótico.....	84
Figura 16 –	Efeito do PTC (+) (7,95 μ M) sobre a proliferação das células PC3 após 24 horas de incubação.....	86
Figura 17 –	Efeito do PTC (+) (7,95 μ M) sobre a proliferação das células PC3 após 24 horas de incubação, avaliado pela integridade de membrana.....	87
Figura 18 –	Efeito do PTC (+) (7,95 μ M) sobre as fases do ciclo celular.....	88
Figura 19 –	Avaliação do efeito PTC (+) em células PC3 quando analisadas em tempo real pelo <i>software Xcellingence system</i>	91
Figura 20 –	Avaliação do efeito do PTC (+) 7,95 μ M nos diferentes tempos após a exposição à substância.....	94
Figura 21 –	Pterocarpano (+) induz a formação de fusos monopolares em células PC3.	95

Figura 22 –	O tratamento com PTC (+) causa desorganização do centróssomo em células de PC3.....	97
Figura 23 –	O tratamento com PTC (+) causa perda de volume e de superfície do centróssomo.....	99
Figura 24 –	O tratamento com PTC (+) causou parada do ciclo celular em prometáfase	101
Figura 25 –	O tratamento com PTC (+) não interfere na duplicação dos centríolos.....	102
Figura 26 –	Diagramas de Venn para proteínas identificadas e quantificadas por LC-MS ^E	104
Figura 27 –	Representação gráfica da classificação de proteínas superexpressas durante 24 horas classificadas de acordo com a função molecular, processo biológico, componente celular, classe proteica e vias.....	110
Figura 28 –	Representação gráfica comparativa dos perfis proteicos para as classes em termos ontológicos.....	113
Figura 29 –	Interatoma no tratamento com PTC (+) durante 24 horas em células PC3 para as proteínas diferencialmente expressas.....	118

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Linhagens utilizadas com suas respectivas origens e concentrações de plaqueamento.....	62
Tabela 2 -	Avaliação de inibição da proliferação in vitro do PTC (+) em linhagens tumorais de próstata humana após 24, 48 e 72 horas de incubação ^a	75
Tabela 3 -	Proteínas diferencialmente expressas em diferentes condições de tratamento PTC (+), Monpastrol e Nocodazol, após 24 h de exposição. PTC: PTC (+); MON: Monastrol e NOC: Nocodazol.....	106

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Å	Angstrom
ANOVA	Análise de Variância
ANU	<i>Australian National University</i>
AR	Receptor de andrógeno – <i>androgen receptor</i>
ARE	Elemento responsivo a andrógeno – <i>androgen responsive elemento</i>
AURA	Aurora A
BPE	Extrato pituitário bovino - <i>bovine pituitary extract</i>
Céls.	Células
Cdk	Quinases dependentes de ciclina - <i>cyclin dependent kinases</i>
BSA	Albumina de soro bovino - <i>Bovine Serum Albumin</i>
CCCI-01	<i>Centrosome Clustering Chemical Inhibitor-01</i>
Chck2	<i>Checkpoint kinase 2</i>
CID	Dissociação induzida por colisão - <i>collision induced dissociation</i>
CNTROB	Marcador para centríolo filho
CPIA	câncer de próstata independente de andrógeno
CRPC	Câncer de próstata resistente a castrações - <i>castrate-resistant prostate cancer</i>
CTL	Linfócitos T citotóxicos
DHT	Di-hidrotestosterona
DIA	Análise independente de dados - <i>data-independent analysis</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOX	Doxorrubicina
DU-145	Linhagem celular de adenocarcinoma de próstata (metástase cerebral)
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
Eg5	Proteína motora quinesina 5
EGF	Fator de crescimento epidermal recombinante humano - <i>human recombinant epidermal growth fator</i> ;
EMBL	<i>European Molecular Biology Laboratory</i>
ERM	Família <i>Ezrin, Radixin, Moesin</i>
ESI	Fonte de ionização do tipo eletrospray - <i>electrospray ionization</i>
F12K	<i>Ham's F-12K (Kaighn's) Medium</i>
FA	Ácido fórmico – <i>formic acid</i>

FDA	<i>U.S. Food and Drug Administration's</i>
FDS	Taxa de falsa descoberta – <i>false discovery ratio</i>
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
FSC	<i>Forward Scatter</i>
FSH	Hormônio foliculo-estimulante
GJIC	Comunicação intercelular juncional <i>gap - gap junctional intercellular communication</i>
GLUT-1	Receptor de glucose
GO	Ontologia gênica – <i>Gene Ontology</i>
HBP	Hiperplasia benigna da próstata
HCL	Ácido clorídrico
HMG-CoA	de 3-hidróxi-3-metilglutaril- coenzima A
HSP	Proteína de choque térmico – <i>heat-shock protein</i>
HIF1 α	Fator indutor de hipóxia 1 alfa
IC ₅₀	<i>inhibitory concentration</i>
INCA	Instituto Nacional do Câncer
K-SFM	Meio de queratinócito livre de soro - <i>Keratinocyte Serum Free Medium</i>
KLK3	Calicreína 3
LAMIN A	Marcador para lamina A
LC-MS ^E	<i>Liquid chromatography–mass spectrometry</i>
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LH	Hormônio luteinizante
LHRH	Hormônio liberador do hormônio luteinizante - <i>Luteinizing hormone-releasing hormone</i>
LINC	<i>Linker of nucleoskeleton and cytoskeleton</i>
LNCaP	Linhagem celular de adenocarcinoma de próstata (metástase de linfonodo)
LOE	Laboratório de Oncologia Experimental
Mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MSe	Espectrometria de massas de forma sequencial
MTT	3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-brometo de tetrazólio
MTOC	Centro de organização de microtúbulos - <i>microtubule-organizing center</i>
NCI	<i>National Cancer Institute</i>

NK	<i>Natural Killers</i>
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
NIMA	Never-in-mitosis cinases de <i>A. nidulans</i>
NPDK	Nucleosídeo difosfato quinase - <i>nucleoside diphosphate kinase</i>
NuRD	Complexo de desacetilase de remodelação de nucleosomas - <i>nucleosome remodeling deacetylase</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PANTHER	<i>Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships</i>
PBS	Solução salina tamponada com fosfato - <i>Phosphate Buffer Solution</i>
PBST-AT	Solução de bloqueio - 3% BSA (Sigma - 85040C) e 0,5% Triton X-100 em PBS1x)
PC3	Linhagem celular de adenocarcinoma de próstata (metástase óssea)
PCM	Material pericentriolar - <i>pericentriolar material</i>
PCNT	Marcador para pericentrin
PIP2	Fosfatidil inositol bisfosfato
PLKs	<i>Polo-Like-Kinases</i>
PPIA	<i>Peptidilprolyl isomerase A</i>
PSA	Antígeno específico da próstata - <i>prostate-specific antigen</i>
PTC	2,3,9 trimetoxipterocarpano
PTC (+/-)	2,3,9 trimetoxipterocarpano mistura racêmica
PTC (+)	2,3,9 trimetoxipterocarpano enantiômero positivo
PTC (-)	2,3,9 trimetoxipterocarpano enantiômero negativo
Q-TOF	Analisador quadrupolo (Q) seguido de outro analisador do tipo tempo de voo (<i>time of flight</i> - TOF)
RANK	Anticorpo monoclonal humano contra o receptor ativador do fator nuclear kappa- β - <i>receptor activator of nuclear factor kappa-β</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	RNA mensageiro
rpm	Rotações por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RWPE-1	Linhagem celular de células imortalizadas não-malignas epiteliais da próstata
SAC	<i>Spindle assembly checkpoint</i>
SAHA	<i>Suberoylanilide hydroxamic acid</i>

SBF	Soro Bovino fetal;
SHBP	Proteína de ligação do hormônio esteróide - <i>steroid hormone binding protein</i>
siRNA	RNA de interferência
SSC	<i>Side SCatter</i>
THM	Tradicional medicina herbal - <i>Traditional Herbal Medicine</i>
TOF	tempo de vôo - <i>time of flight</i>
TUBA	tubulina alfa
TUBB	tubulina beta
TUBG	tubulina gama
TWIN	<i>travelling wave ion mobility</i>
UFC	Universidade Federal do Ceará
UV	Radiação ultravioleta
v/v	Volume per volume
VDC	<i>Vanadocene dichloride</i>
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
%	Porcentagem
°C	Grau Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
nL	Nanolitro
γ-TuRC	Complexo do anel de γ-tubulina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
1.1	Câncer.....	19
1.2	Biologia do câncer.....	20
1.3	Marcas gerais do câncer (<i>Hallmarks</i>).....	21
<i>1.3.1</i>	<i>Proliferação ilimitada.....</i>	<i>22</i>
<i>1.3.2</i>	<i>Invasão tecidual e metástase.....</i>	<i>22</i>
<i>1.3.3</i>	<i>Angiogênese.....</i>	<i>22</i>
<i>1.3.4</i>	<i>Resistência à morte celular.....</i>	<i>22</i>
<i>1.3.5</i>	<i>Autossuficiência de sinais de crescimento.....</i>	<i>23</i>
<i>1.3.6</i>	<i>Evasão do Sistema Imune.....</i>	<i>23</i>
<i>1.3.7</i>	<i>Inflamação.....</i>	<i>23</i>
<i>1.3.8</i>	<i>Reprogramação do metabolismo genético.....</i>	<i>24</i>
<i>1.3.9</i>	<i>Resistência a sinais anti-proliferativos.....</i>	<i>24</i>
1.4	Divisão celular e câncer.....	24
<i>1.4.1</i>	<i>Interfase.....</i>	<i>26</i>
<i>1.4.2</i>	<i>Fase M.....</i>	<i>26</i>
<i>1.4.3</i>	<i>Reguladores do ciclo celular.....</i>	<i>27</i>
<i>1.4.4</i>	<i>Pontos de checagem do ciclo celular.....</i>	<i>28</i>
<i>1.4.5</i>	<i>Ponto de checagem para montagem do fuso.....</i>	<i>29</i>
<i>1.4.6</i>	<i>Ponto de checagem dano ao DNA.....</i>	<i>29</i>
1.5	Câncer de próstata.....	30
<i>1.5.1</i>	<i>Patobiologia do câncer de próstata.....</i>	<i>30</i>
<i>1.5.2</i>	<i>Modelo de progressão do câncer de próstata.....</i>	<i>30</i>
<i>1.5.3</i>	<i>Sinalização do receptor de andrógeno – um regulador chave na .progressão do câncer de próstata.....</i>	<i>32</i>
<i>1.5.4</i>	<i>Mutações no receptor de andrógeno.....</i>	<i>33</i>
<i>1.5.5</i>	<i>Tratamentos para o câncer de próstata.....</i>	<i>34</i>
<i>1.5.6</i>	<i>Prostatectomia radical.....</i>	<i>36</i>
<i>1.5.7</i>	<i>Terapia de radiação</i>	<i>36</i>
<i>1.5.8</i>	<i>Terapia de Deprivação de Andrógeno.....</i>	<i>37</i>
<i>1.5.9</i>	<i>Quimioterapia para o câncer de próstata agressivo e avançado.....</i>	<i>38</i>

1.5.10	<i>Terapias Emergentes para o câncer de próstata.....</i>	39
1.5.11	<i>O citoesqueleto como alvo de novas drogas contra o câncer de próstata..</i>	41
1.5.12	<i>Actina.....</i>	41
1.5.13	<i>Microtúbulos.....</i>	42
1.5.14	<i>Filamentos Intermediários.....</i>	43
1.5.15	<i>Centrossomo.....</i>	43
1.5.16	<i>Integridade do citoesqueleto sob ação de drogas no câncer de próstata</i>	47
1.5.17	<i>Modelos para estudo no Câncer de Próstata.....</i>	49
1.5.17.1	<i>Modelos de Cultura Celular – In Vitro.....</i>	50
1.5.17.2	<i>Proteômica como ferramenta em câncer.....</i>	51
1.6	Natureza como fonte e painel de compostos bioativos.....	52
1.6.1	<i>Pterocarpanos.....</i>	55
2	OBJETIVOS.....	57
2.1	Objetivo Geral.....	57
2.2	Objetivos Específicos.....	57
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	58
3.1	Materiais e reagentes utilizados.....	58
3.2	Desenho experimental.....	58
3.3	Obtenção da amostra.....	60
3.4	Cultivo e manutenção das linhagens celulares.....	60
3.5	Avaliação da atividade antiproliferativa <i>in vitro</i> – ensaio de MTT.....	61
3.6	Análise morfológica – Coloração diferencial por Panótico rápido.....	63
3.7	Monitoramento dinâmico da proliferação e viabilidade celular em tempo real-<i>XCelligence System</i>.....	64
3.8	Citometria de Fluxo.....	65
3.9	Microscopia confocal.....	66
3.10	Ensaio proteômico.....	68
3.10.1	<i>Tratamentos das células.....</i>	68
3.10.2	<i>Espectrometria de Massas.....</i>	69
3.10.3	<i>Preparação das amostras proteicas.....</i>	71
3.10.4	<i>Identificação e quantificação por LC-MS/MS.....</i>	71
3.10.5	<i>Análises In Silico – biologia de sistemas (Banco de Dados, Ontologia e Interação proteína-proteína).....</i>	72

4	RESULTADOS.....	75
4.1	Avaliação da inibição da proliferação pelo MTT.....	75
4.2	Avaliação da morfologia celular em cultura e pela coloração com panótico rápido.....	77
4.3	Avaliação do efeito do PTC (+) sobre o número de células viáveis, na integridade de membrana e no perfil no ciclo celular de PC3 após tratamento de 24 horas.....	86
4.4	Avaliação do efeito do PTC (+) no crescimento celular utilizando o sistema <i>xCELLigence</i>.....	90
4.5	Pterocarpano induziu, em células PC3, a disposição de fusos mitóticos em monopólos.....	94
4.6	Pterocarpano induziu, em células PC3, desorganização do centrossomo.....	96
4.7	Pterocarpano não impede a divisão de centríolos durante a divisão celular.....	102
4.8	Caracterização do perfil proteico no tratamento com PTC (+), Monastrol e Nocodazol – <i>Shotgun</i>.....	103
4.9	Interação proteína-proteína (Interatoma)	117
5	DISCUSSÃO.....	120
6	CONCLUSÃO.....	155
7	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	156
	REFERÊNCIAS.....	157
	APÊNDICE A - LISTA DE PROTEÍNAS QUANTIFICADAS NO TRATAMENTO COM PTC (+) EM 24 HORAS. DO TOTAL DE 137 PROTEÍNAS, 24 FORAM SUPEREXPRESSAS (<i>UP-REGULATED</i>), 28 SUBEXPRESSAS (<i>DOWN-REGULATED</i>) E 85 NÃO FORAM DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS (<i>UNCHANGED</i>).	198
	APÊNDICE B - ARTIGO: THE ANTITUMOR POTENTIAL OF THE ISOFLAVONOIDS (+)- AND (-)-2,3,9-TRIMETHOXYPTEROCARPAN: MECHANISM-OF-ACTION STUDIESPUBLISHED: 20 MAY 2020.....	252

APÊNDICE C - ARTIGO: THE ISOFLAVANOID (+)-PTC REGULATES CELL-CYCLE PROGRESSION AND MITOTIC SPINDLE ASSEMBLY IN A PROSTATE CANCER CELL LINE....	253
APÊNDICE D – ARTIGO: GLOBAL PROTEOMICS ANALYSIS OF BONE MARROW: ESTABLISHING TALIN-1 AND CENTROSOMAL PROTEIN OF 55 KDA AS POTENTIAL MOLECULAR SIGNATURES FOR MYELOYDYSPLASTIC SYNDROMES.....	254
APÊNDICE E – ARTIGO: NAPHTHOQUINONE-BASED CHALCONE HYBRIDS AND DERIVATIVES: SYNTHESIS AND POTENT ACTIVITY AGAINST CANCER CELL LINES.....	255
APÊNDICE E – PATENTE: COMPOSTO 5-CARBA- PTEROCARPANOS, PROCESSO DE OBTENÇÃO DOS ANÁLOGOS DE CARBA-PTEROCARPANOS E USO DO COMPOSTO.....	256

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

As células estão constantemente expostas aos agentes mutagênicos do ambiente os quais são capazes de provocar danos ao material genético. A frequência destes danos depende dos tipos de agentes que causam mutação, da intensidade de exposição a estes agentes, do tecido sob exposição, entre outros. O câncer é uma das doenças resultantes à exposição daqueles agentes. É caracterizado pela perda do controle normal da proliferação celular, desse modo, a manutenção de toda a organização celular e tecidual é prejudicada (Burstein *et al.*, 2017).

A origem da palavra câncer, conceito introduzido por Hipócrates na Grécia antiga, que significa caranguejo, faz analogia ao comportamento infiltrante da população de células malignas e, daí a forma de caranguejo. O conceito atual determina que o câncer é resultante de linhagens de células clonais malignas que surgiram devido às alterações somáticas. Tais alterações promovem a proliferação e sobrevivência celular dessas células. Embora o organismo promova seleção natural no câncer, há favorecimento do crescimento de clones malignos com imortalidade e alto poder replicativo, sendo que a sobrevivência das células tumorais é geralmente limitada pelo tempo de vida do seu hospedeiro. As células cancerígenas diferem das células normais devido as suas vantagens e aos processos moleculares que as permitem se dividir com mais velocidade, ocupando e competindo por espaço e por nutrientes. Essas células podem ainda ganhar a circulação, o que se denomina de metastização, para diferentes sítios do organismo, causando, em curto espaço de tempo, a morte do hospedeiro (Brown; Attardi, 2005).

O câncer pode ser causado tanto por fatores internos (mutações genéticas herdáveis, condições de respostas hormonais e imunes, etc) quanto fatores externos (consumo de tabaco, bebidas alcoólicas, dietas não saudáveis, etc). Geralmente, levam dez anos ou mais para que esses fatores de exposição causam alterações significativas e promovam alguma formação e transformação neoplásica (American Cancer Society, 2016).

Atualmente, já foram descritos mais de 100 tipos de câncer, cada um com diagnóstico e tratamento específicos (Who, 2016). Dentre esses, o câncer de pulmão (13%), o de mama feminino (12%), o colorretal (10%) e o de próstata (8%) são os mais prevalentes, excluindo os casos de câncer de pele não melanoma. Esses quatro tipos de câncer são os responsáveis por 4 em cada 10 novos casos diagnosticados no mundo (Cancer Research UK, 2015; CDC, 2015).

No Brasil, assim como no resto do mundo, é incontestável que o câncer seja um problema de saúde pública. A estimativa indica que nos anos de 2016 e 2017 ocorram aproximadamente 596 mil novos casos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma. O câncer de pele do tipo não melanoma (176 mil novos casos) será o mais incidente da população brasileira, seguido pelos cânceres de próstata (61 mil), mama feminina (58 mil), colorretal (34 mil), pulmão (28 mil), estômago (20 mil) e colo do útero (16 mil) (Figura 1) (Inca, 2016).

Figura 1 – Distribuição proporcional dos dez tipos de cânceres mais incidentes estimados para 2016 por sexo, exceto pele não melanoma, na população brasileira

Homens			Mulheres		
Localização primária	casos novos	%	Localização primária	casos novos	%
Próstata	61.200	28,6%	Mama Feminina	57.960	28,1%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	8,1%	Cólon e Reto	17.620	8,6%
Cólon e Reto	16.660	7,8%	Colo do Útero	16.340	7,9%
Estômago	12.920	6,0%	Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
Cavidade Oral	11.140	5,2%	Estômago	7.600	3,7%
Esôfago	7.950	3,7%	Corpo do Útero	6.950	3,4%
Bexiga	7.200	3,4%	Ovário	6.150	3,0%
Laringe	6.360	3,0%	Glândula Tireoide	5.870	2,9%
Leucemias	5.540	2,6%	Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%
Sistema Nervoso Central	5.440	2,5%	Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%

Fonte: INCA, 2016.

1.2 Biologia do câncer

A transformação celular maligna leva ao desenvolvimento de câncer. Este é um processo complexo que pode ser iniciado por uma variedade de eventos, tais como perfis mutagênicos induzidos pela radiação ultravioleta (UV) – ou irradiação e/ou agentes intercalantes de DNA (Inca, 2016). Tipicamente, o câncer surge depois de uma aquisição de várias etapas de muitas mutações genéticas ou epigenéticas que, em última instância, conduzem a uma desregulação fatal de processos celulares envolvidos na reparação do DNA, na sobrevivência celular, na proliferação e na motilidade. Como resultado, uma célula saudável adquire a capacidade de acumular, em diferentes graus, mutações e proliferar de uma maneira descontrolada. Essa proliferação forma uma massa tumoral, a partir da qual, células individuais disseminam para formar metástases em locais distantes no corpo. Esse diferencial da doença frequentemente leva à morte do paciente (Burstein et al., 2017).

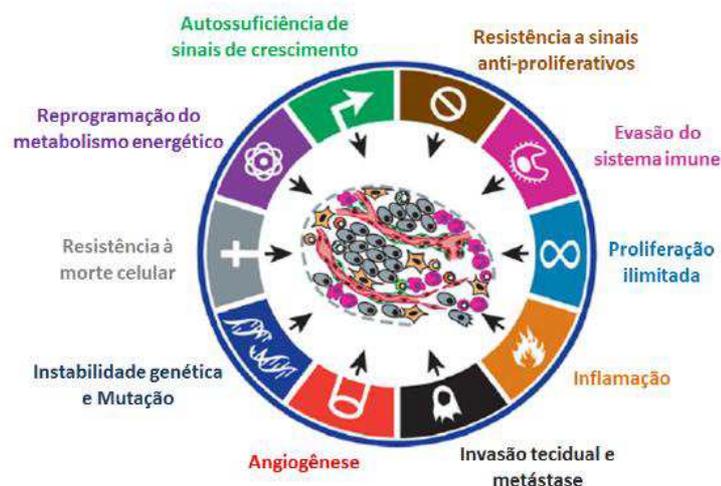
Muitas destas mutações estão localizadas nos chamados oncogenes e genes supressores de tumor (Croce, 2008; Sherr, 2004). Os oncogenes são genes que, após várias ativações de forma crônica, por exemplo, devido a muitos eventos mutacionais, conferem vantagem de crescimento à célula, ao passo que, a mutação em genes supressores de tumores permitem o crescimento celular descontrolado.

É importante ressaltar que muitas proteínas, produtos dos referidos genes, podem abrigar mutações em várias regiões, indicando a sua importância para a tumorigênese. Em geral, muitos tumores compartilham os padrões de mutação equivalentes, proporcionando-lhes características semelhantes os quais levaram à classificação das marcas (*hallmarks*) do câncer por Hanahan e Weinberg (Hanahan; Weinberg, 2011), sendo discutidas em seguida.

1.3 Marcas gerais do câncer (*Hallmarks*)

Como apresentado anteriormente, a instabilidade genética que as células neoplásicas adquirem podem causar uma quantidade tremenda de mutações genéticas e epigenéticas, concedendo às células tumorais seu crescimento anormal e, mais tarde, um comportamento de disseminação (Vogelstein *et al.*, 2013). Hanahan e Weinberg em 2000 propuseram, a princípio, uma organização mostrando que mutações durante oncogênese servem, basicamente, uma de seis marcas principais (Hanahan; Weinberg, 2006). Devido à importância das características adicionais emergentes em 2011, uma nova versão com duas novas marcas e duas características foram lançadas (Figura 2) (Hanahan; Weinberg, 2011). Devido à importância dessas características para a biologia do câncer, estas serão introduzidas de forma sucinta:

Figura 2 – Características essenciais do câncer



Fonte: Adaptado de HANAHAN E WEINBERG (2011).

1.3.1 Proliferação ilimitada

As células tumorais adquirem um estado de imortalidade. Normalmente, depois de muitas etapas de divisão celular, os telômeros dos cromossomos ficam excessivamente truncados e agregam, levando à morte celular. As células do tumor, ao contrário de células não imortalizadas, não expressam uma telomerase funcional, este processo cromossomal é evitado por uma proteína que, constantemente, adiciona repetições de nucleotídeos à extremidade dos cromossomos em células tumorais (Greider, 1998).

1.3.2 Invasão tecidual e metástase

Os tumores primários frequentemente iniciam uma sequência de etapas conhecidas como cascata de invasão - metástases, levando a disseminação de células tumorais individuais. Estes são transportados via vasos linfáticos ou vasos sanguíneos para órgãos distantes, colonizando-os. Este processo complexo apresenta uma regulação através da adesão de moléculas, como E-caderina, mas também, tumores infiltrantes de células derivadas da medula óssea, tais como macrófagos podem fornecer enzimas que degradam a matriz, facilitando, assim, o estabelecimento de metástases (Wittekind; Neid, 2005).

1.3.3 Angiogênese

As células cancerosas são metabolicamente muito ativas, um tumor precisa permanentemente de nutrientes, fornecidos de forma adequada com vários metabólitos importantes e, além disso, requer uma troca gasosa bem estabelecida. Ambos os processos são mediados pela corrente sanguínea. Assim, o crescimento sustentado dos tumores necessita de um sistema de vascularização sanguínea, cuja geração é denominada de angiogênese ou neo-angiogênese. O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), neste contexto, é uma molécula prototípica pró-angiogênica, participando no desencadeamento do processo como "interruptor" (Nishida *et al.*, 2006).

1.3.4 Resistência à morte celular

Como sinalização proliferativa sustentada, a resistência leva à indução de morte celular, por exemplo, através via Bcl-2, fatores anti-apoptóticos, os quais são necessários para

manter as células malignas vivas. Esses processos são possíveis também pela ausência de *p53*, a superexpressão de fatores anti-apoptóticos tais como na leucemia de células B/linfoma ou mesmo na sub-regulação dos fatores pró-apoptóticos tais como Bim ou Bax. (Igney; Krammer, 2002)

1.3.5 Autossuficiência de sinais de crescimento

As células normais constantemente necessitam receber sinais de crescimento e/ou de sobrevivência. Isto é garantido, por exemplo, através da estimulação autócrina por fatores de crescimento, isto é, sinalização de receptores ligante-independente e sinalização de receptores para fatores de crescimento. No processo para a transformação oncogênica, as células adquirem essa capacidade de sintetizar esses fatores de crescimento de forma mais acentuada, logo, a produção desses fatores impedem que as células cancerosas dependam de outras células para tal (Fedi *et al.*, 1997).

1.3.6 Evasão do Sistema Imune

Na sinalização proliferativa sustentada, as células tumorais também necessitam evitar a supressão da sinalização de crescimento. Um exemplo muito famoso é o gene supressor de tumor: *p53*, conhecido como "Guardião do genoma". Quando há dano ao DNA, proteínas que controlam os processos que podem levar as células à senescência ou apoptose, mantém todos esses processos sob controle. Por outro lado, as mutações genéticas são cumulativas. Dessa maneira, *p53* é uma das proteínas de controle mais frequentemente mutadas em câncer, destacando em cerca de 50% de todos os tumores sequenciados. A aquisição dessas seis marcas importantes é crucial para as células cancerosas, mas eles podem ocorrer em várias ordens e com diferentes tempos nos diferentes tipos de câncer (Hanahan; Weinberg, 2011). Todas as seis marcas aqui introduzidas podem se manifestar por causa de outras importantes características seguintes:

1.3.7 Inflamação

Infiltrado de células inflamatórias no tumor pode ser encontrado em um dado tumor. Apesar da presença de muitas células no interior do tumor, o processo inflamatório pode contribuir para ajudar às células a avançar nos estágios de proliferação celular e estágios de

malignidade. O ambiente inflamatório contribui para a modificação da matrix extracelular, levando a uma neovascularização, além de apresentar moléculas como as espécies reativas de oxigênio (ROS). Essas moléculas aumentam a instabilidade genômica das células no local, proporcionado pelos danos causados ao DNA e, assim, aumentando ainda mais o caráter maligno das células (Coussens; Werb, 2002).

1.3.8 Reprogramação do metabolismo genético

As células tumorais necessitam de muitos nutrientes para o seu crescimento excessivo. Por outro lado, o microambiente tumoral, geralmente hipóxico, é muitas vezes resultado do uso do ciclo do ácido cítrico, que depende criticamente da oxigenação normal. Este fato foi proposto em 1930 por Otto Warburg (1956). Desde então, tornou-se cada vez mais claro que na hipóxia, por exemplo, a sinalização *Ras* pode aumentar de forma independente do fator indutor de hipóxia 1 alfa (HIF1 α) que, posteriormente, supra regula a glicólise. Juntos com a superexpressão de transportadores de glucose como o transportador de glucose-1 (GLUT-1), este fenômeno fornece energia suficiente para conduzir a proliferação descontrolada de células tumorais em estados de hipóxia tecidual (Semenza, 2007).

1.3.9 Resistência a sinais anti-proliferativos

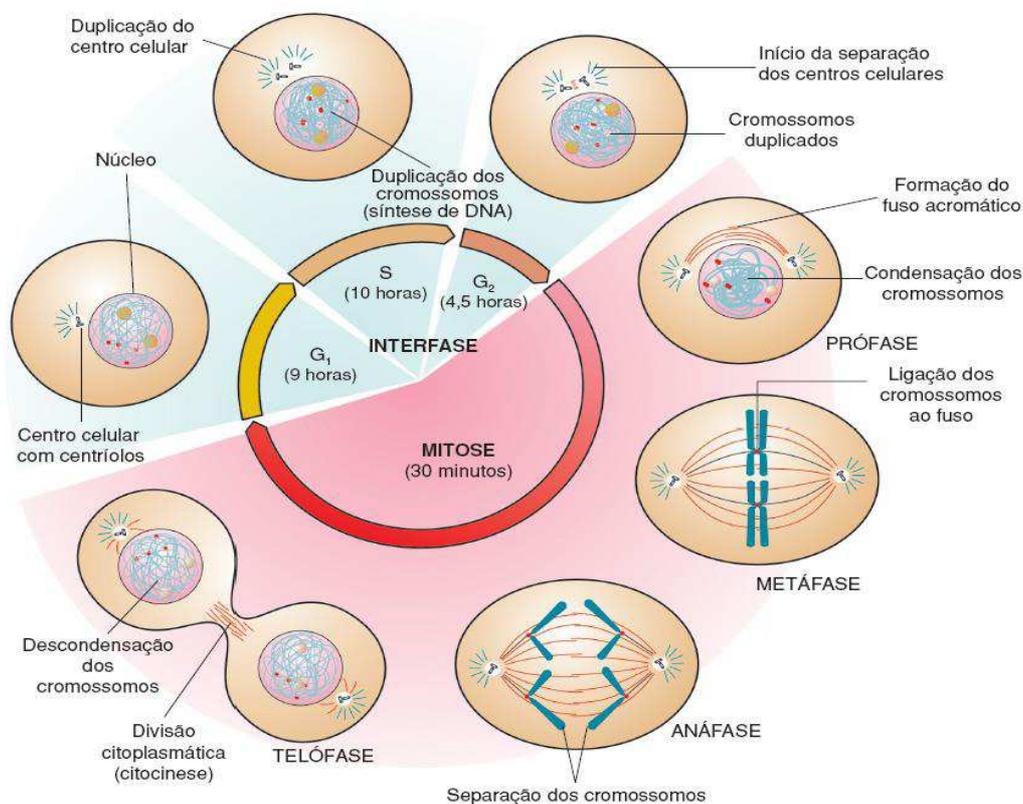
Demonstrou-se com sucesso em modelos experimentais que linfócitos T citotóxicos (CTL) e células NK podem controlar o crescimento do tumor *in vivo* (Gorelik; Flavell, 2001). Em consonância a isso, foi demonstrado que os indivíduos imunodeprimidos, por exemplo receptores de órgãos, também apresentam um maior risco de desenvolver câncer. Além disso, vários estudos relataram que geralmente, em nível de infiltração de tumor nos tecidos, células NK e/ou T estão correlacionadas com melhor prognóstico (Kuribayashi *et al.*, 1981; Huang, *et al.*, 2005).

1.4 Divisão celular e câncer

O ciclo celular é uma sequência ordenada de eventos, conhecidos como fases, em que uma célula cresce, replica seu DNA e produz, no caso da mitose, duas células geneticamente idênticas. O ciclo celular, didaticamente, possui quatro fases a saber: fase G1, fase S, fase G2 e fase M (Figura 3). Alguns autores consideram uma quinta, a fase G0. Defeitos

na regulação do ciclo celular podem causar proliferação não programada e instabilidade genômica, dando origem às células cancerígenas (Ruchaud *et al.*, 2007; Cerveira *et al.*, 2012). No final da mitose, a célula sofre citocinese, processo pelo qual há formação de duas células, cada uma com um genoma completo. Das quatro fases, as três primeiras não originam alterações morfológicas que possam ser observadas por microscopia óptica. Em contraste, a fase M produz uma alteração dramática na forma da célula e na condensação cromossômica, onde, facilmente, são observadas pela técnica citada anteriormente. Essas características levam a classificação do ciclo celular: interfase (fases G₁, S e G₂) e mitose (fase M).

Figura 3 – Visualização genérica do ciclo celular



As quatro fases do ciclo celular e sua ordem são mostradas. O genoma é duplicado durante a fase S e segregado em duas cópias separadas durante a fase M. No final da fase M, as células sofrem citocinese para formar duas células filhas. A transição da fase G₂ para a fase M é regulada por um dos pontos de verificação de dano ao DNA. Na presença de DNA danificado, as células permanecem na fase G₂

Fonte: Adaptado de RUCHAUD *et al.*, (2007).

1.4.1 Interfase

As células humanas, como a maioria das células eucarióticas, iniciam o ciclo celular em G₁, fase que ocupa a maior parte do tempo no ciclo celular (Norbury; Nurse, 1992). Durante

a fase G1, a célula cresce pela síntese de biomoléculas, como proteínas e lipídios (mas não de DNA), quase duplicando seu tamanho original (Vermeulen *et al.*, 2003). A síntese de DNA é específica para a fase S do ciclo celular (fase de síntese) (Cerveira *et al.*, 2012). Durante a fase S, todo o genoma é duplicado pelo processo de polimerização dirigida pela fita molde. Depois que as duas cópias de DNA são sintetizadas, a célula sai da fase S e entra na fase G2. Durante esta fase, a célula pode crescer, mas prepara-se especificamente para entrar na fase M, através da síntese de proteínas específicas da referida fase. Embora as características bioquímicas distintas das fases G1, S e G2 estejam bem descritas, a morfologia da célula muda pouco durante essas fases (Cerveira *et al.*, 2012).

1.4.2 Fase M

A última fase do ciclo celular é a fase M. Nesta fase, uma cópia completa do genoma é cuidadosamente segregada e distribuída para pólos opostos de uma célula. Este processo é coordenado com a citocinese para garantir que cada célula filha tenha uma cópia completa do genoma original (Rieder; Khodjakov, 2003). A mitose é caracterizada por vários processos bem definidos: condensação de eucromatina em cromossomos mitóticos; repartição do envelope nuclear; alinhamento de cromossomos emparelhados; seguido pela separação das cromátides irmãs para os pólos opostos da célula e reestabelecimento nuclear (Rieder; Khodjakov, 2003).

As células em mitose têm uma morfologia arredondada que as distingue das células em interfase (Harris *et al.*, 1973). O arredondamento permite que a célula gere um fuso mitótico, o qual é essencial para uma divisão celular bem-sucedida (Lancaster *et al.*, 2013).

A mitose também pode ser caracterizada por muitas vias bioquímicas, além de alterações na morfologia celular. Por exemplo, as células mitóticas têm níveis elevados de atividade de ciclina B1, Cdk1 e níveis elevados de SER10 fosforilado (Pines; Hunter, 1989, Meijer *et al.*, 1989, Hendzel *et al.*, 1997). Essas características tornam possível identificar e acompanhar as células, à medida em que entram em mitose, tanto naquelas em divisão normal (Juan *et al.*, 1998) quanto nas que contêm DNA danificado (Syljuåsen *et al.*, 2006; Kubara *et al.*, 2012).

1.4.3 Reguladores do ciclo celular

A transição entre as fases do ciclo celular é rigorosamente regulada por quinases dependentes de ciclina (*cyclin dependent kinases* - Cdk). O papel das Cdks é controlar a

progressão do ciclo celular pela fosforilação de substratos, proteínas específicas em seus resíduos de aminoácidos serina e treonina. Os substratos proteicos têm papéis específicos que contribuem para os eventos celulares que ocorrem durante o ciclo celular. Por exemplo, a proteína lamina B é fosforilada por Cdk1 durante a mitose, o que provoca a desorganização do envoltório nuclear (Nigg, 1995). O momento correto das alterações de fase do ciclo celular é regulado por complexos específicos de proteína quinase dependente de ciclina. As cinases dependentes de ciclina são compostas por duas proteínas: uma subunidade catalítica conhecida como Cdk e uma subunidade de proteína reguladora conhecida como ciclina. As proteínas ciclinas não tem atividade enzimática, contudo, ligam e ativam as subunidades catalíticas (Kastan; Bartek, 2004). Globalmente, uma série de fosforilações e vias de síntese de proteínas convergem para regular quinases dependentes de ciclina. A complexidade dessas etapas fornece às células a oportunidade de garantir que seus genomas sejam copiados e distribuídos com precisão para as células filhas, evitando a mudança do genoma.

As ciclinas de fase G1 incluem as ciclinas do tipo D e do tipo E que desempenham as suas funções ligando-se respectivamente a CDK4/6 e CDK2. Embora as ciclinas D1, D2 e D3 tenham demonstrado papéis distintos em diferentes sistemas celulares (Ciemerych *et al.*, 2002; Cooper *et al.*, 2006; Cole *et al.*, 2010; Jirawatnotai *et al.*, 2011), elas compartilham homologia significativa e são críticas para a progressão da fase G1 (Sheer, 2000). O mecanismo indutor de expressão, bem como o tempo de ativação, são distintos para as ciclinas tipo D e tipo E. As ciclinas de tipo D são expressas na parte inicial da metade da fase G1 e servem como elementos de ligação funcionais entre a maquinaria do ciclo celular e os sinais mitogênicos externos que regulam a sua expressão. Vários fatores de crescimento demonstraram estimular os níveis de ciclina D1, incluindo o factor de crescimento epitelial, o factor de crescimento de insulina I e II e os hormônios múltiplos (Albanese *et al.*, 1999; FU *et al.*, 2002; Holnthoner *et al.*, 2002). Uma vez ativada, a ciclina D se liga a CDK4/6 e desencadeia a fosforilação de Rb, o produto do gene supressor de tumor de Retinoblastoma, que posteriormente leva à liberação de fatores de transcrição de E2F. A ativação de fatores E2F é um evento essencial para promover a progressão através da fase G1 a S devido à sua capacidade de transcrever uma bateria de genes, incluindo a ciclina E (Ohtani *et al.*, 1995; BOTZ *et al.*, 1996; GENG *et al.*, 1996). A expressão de ciclinas E1 e E2 começa no período tardio da fase G1. A ativação de CDK2 pela ciclina E (Koff *et al.*, 1991; Koff *et al.*, 1992) mantém o estado hiperfosforilado de Rb, levando a sua repressão transcripcional. Várias funções adicionais de ciclina E-CDK2, incluindo papéis na duplicação de centrosomos, biossíntese de histonas e carregamento do

complexo de pré-replicação nas origens de replicação de DNA (Gladden; Diehl, 2003), participam da progressão para a fase S.

A atividade do complexo ciclina E-CDK2 e a entrada na fase S pode ser inibida por uma família de inibidores de cinase Cip/Kip dependentes de ciclina. p21Cip1, p27Kip1 e p57Kip1 podem inibir uma ampla gama de complexos de ciclina-CDK (Nakayama *et al.*, 1996; Di Stefano *et al.*, 2011). P27Kip1 mostrou-se que liga não apenas à ciclina E-CDK2, mas também à ciclina A-CDK2 e ciclina D-CDK4/6. Este último é conhecido pelo sequestro de p27Kip1 em um complexo trimérico (Koh *et al.*, 1995; Montagnoli *et al.*, 1999). Quando o estímulo mitogênico cessa, o grupo sequestrado de p27Kip1 é liberado e livre para se ligar e inibir a atividade da ciclina E-CDK2 (Labaer *et al.*, 1997; Sherr; Roberts, 2004). Por sua vez, o complexo ciclina E-CDK2 pode fosforilar p27Kip1 em Thr-187, um resíduo alvo para degradação de p27Kip1, mediada pela via da ubiquitina ligase de SCFSkp2 (Pagano *et al.*, 1995; Sheaff *et al.*, 1997).

1.4.4 Pontos de checagem do ciclo celular

Além dos reguladores do ciclo celular, a progressão adequada através do ciclo é rigorosamente monitorada por uma série de pontos de controle (*checkpoints*). Os pontos de verificação do ciclo celular são vias bioquímicas que detectam alterações fisiológicas nas células. A célula deve então responder a essas mudanças antes que ela possa prosseguir para a próxima fase, por exemplo, antes que possa sair da fase G2 e entrar na mitose (Hartwell; Weinert, 1989). Existem pelo menos três pontos de controle em células eucarióticas, cada uma com seus papéis distintos, mas, por vezes, sobrepostos. O primeiro é o ponto de restrição, que é um caso especial, pois esse determina se uma célula entrará na divisão celular ou não. Na transição entre as fases G1 e S, o ponto de restrição acontece quando as células são “verificadas” quanto aos padrões normais de crescimento, limitações espaciais potenciais e integridade do genoma (Weinert, 1998). A célula responde como se tomasse uma decisão sobre se deve dividir-se, atrasar a divisão ou sair do ciclo celular para a fase G0. Quando as condições nas células estiverem corretas, o ponto de restrição será passado e a célula será comprometida a entrar na fase S e, conseqüentemente, na fase M (Figura 3) (Abraham, 2001).

1.4.5 Ponto de checagem para montagem do fuso

A montagem das fibras do fuso é o segundo ponto de verificação no qual ocorre monitoramento da ligação e a segregação cromossômica durante a mitose. Isso assegura que as células filhas recebam um conjunto cromossômico completo (Rudner; Murray, 1996). Defeitos na estrutura do fuso, ou falha de um ou mais cromossomos durante o alinhamento, serão, desse modo, detectados no ponto de verificação da montagem do fuso, retardando a mitose até que os defeitos sejam corrigidos (Gonzalez *et al.*, 2012). O mau funcionamento no ponto de verificação da montagem da fibra do fuso pode levar à segregação inadequada dos cromossomos, aneuploidia, câncer ou mesmo morte celular (Abraham, 2001).

1.4.6 Ponto de checagem dano ao DNA

As células com DNA danificado iniciam uma via bioquímica denominada "ponto de controle de dano ao DNA", causando atraso no ciclo celular durante a fase S ou fase G2, a fim de permitir o devido reparo (Galgoczy; Toczyski, 2001; Weinert, 1998). Acredita-se que o papel dos pontos de verificação de dano do DNA é impedir que o ácido desoxirribonucléico danificado seja transmitido às células filhas (Bartek; Lukas, 2007). O ponto de verificação de dano do DNA é composto de vários sistemas de pontos de verificação sobrepostos. Um ponto de verificação da fase S proporciona monitoramento contínuo do DNA durante a replicação, a fim de assegurar que os complexos de replicação bloqueados, ou o DNA danificado, sejam reparados antes da replicação (Palou *et al.*, 2010).

A conclusão bem sucedida da replicação do DNA é avaliada no ponto de verificação em G2. O ponto de verificação G2 permite que as células detectem o DNA não replicado, ou o DNA que pode ter sido danificado por várias maneiras, tais como agentes genotóxicos (Vermeulen *et al.*, 2003), por exemplo. A célula retardará sua progressão através do ciclo celular na fase G2 até que os erros sejam corrigidos.

1.5 Câncer de próstata

O câncr de próstata é uma doença mais comumente diagnosticada entre os homens tanto no Brasil, como também na América do Norte (Gronberg, 2003; Inca, 2016) e o segundo câncer que mais atinge os homens no mundo (Siegel *et al.*, 2016). Estatisticamente, um em cada seis homens desenvolvem câncer de próstata e, surpreendentemente, cerca de 50% dos casos

são diagnosticados em autopsias. No entanto, existem formas agressivas da doença que, muitas vezes, levam a óbito. O câncer de próstata é inicialmente diagnosticado com o exame físico retal, seguido pelo teste sorológico de identificação do antígeno específico da próstata (*prostate-specific antigen* - PSA) (Diamandis, 2008; Sardana *et al.*, 2008). O PSA é um dos biomarcadores mais conhecidos disponíveis. Por outro lado, tem suas limitações quanto ao teste. O PSA no soro pode ser encontrado alterado em outras condições patológicas as quais são: outras patologias prostáticas como a hiperplasia benigna da próstata (HBP) e prostatites. Ainda, não é considerada uma ferramenta poderosa no diagnóstico e como biomarcador prognóstico, sendo, portanto, um teste que não discrimina doenças indolentes e formas agressivas de câncer de próstata (Diamandis, 2008; Sardana *et al.*, 2008). Pacientes que apresentam testes de PSA positivos são submetidos a biópsias da próstata, em que a avaliação histológica do tecido prostático é analisado para determinar se o câncer é detectado ou não. Não surpreendentemente, 75% dos casos de pacientes PSA positivos não apresentam câncer, indicando a falta de especificidade do biomarcador.

1.5.1 Patobiologia do câncer de próstata

1.5.2 Modelo de progressão do câncer de próstata

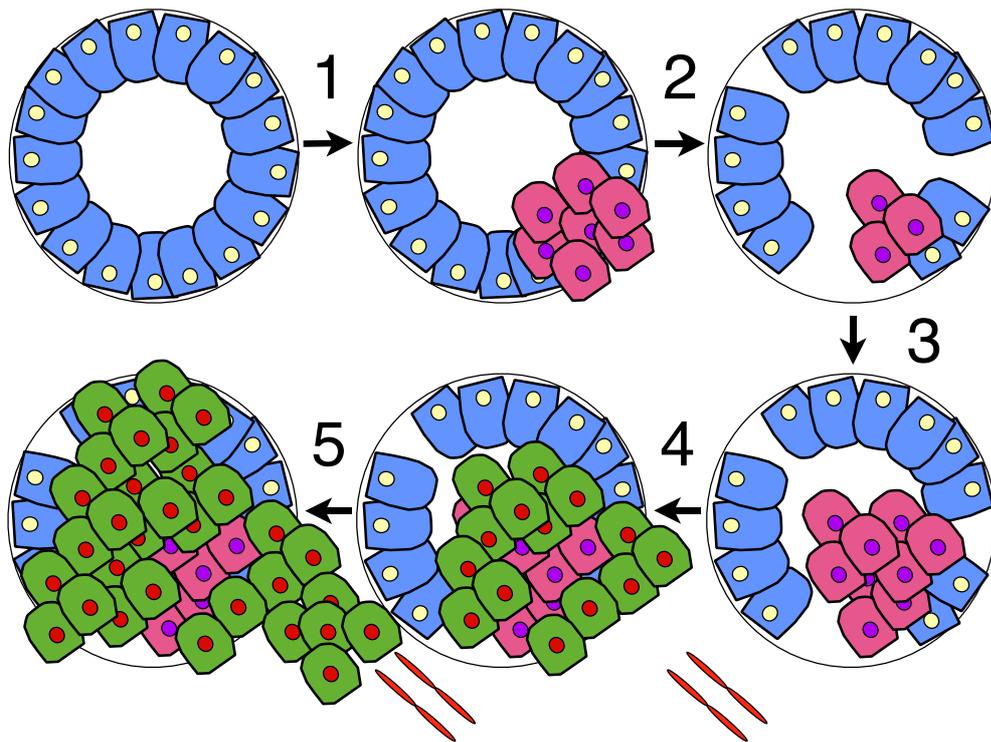
Uma próstata normal requer níveis basais de andrógeno para crescimento e sobrevivência. Do mesmo modo, durante o desenvolvimento do câncer, as células cancerosas são inicialmente dependentes de andrógenos (Webber, 1986). A Figura 4 ilustra um modelo simplificado de progressão do câncer de próstata. No início, vários processos cancerígenos ocorrem, em que, algumas células estão alteradas e começam a proliferar fora de controle.

Caso detectado precocemente, a terapia de ablação de andrógenos pode ser utilizada, quer através de castração química, utilizando anti- andrógenos, quer por meio de remoção cirúrgica dos testículos, os maiores produtores de andrógenos. Essa terapia é muito eficaz na destruição de células dependentes de andrógenos (Balter *et al.*, 1993). No entanto, ao longo do tempo, esta ablação de andrógenos contínua resulta na seleção de sub-populações de células, as quais podem sobreviver na ausência de andrógenos. Isso leva o surgimento de um câncer independente de andrógenos (Sun *et al.*, 2010; Hörnberg *et al.*, 2011).

Além disso, a evolução destas células independente de andrógenos pode resultar em aumento da angiogênese, as quais as células migram e metastatizam para locais distantes, principalmente para os gânglios linfáticos e ossos (Sun *et al.*, 2010). As alterações moleculares

específicas que regem essas mudanças ainda permanecem desconhecidas, mas uma coisa permanece clara, o receptor de andrógeno é o grande protagonista envolvido neste processo (Hörnberg *et al.*, 2011)

Figura 4 – Progressão de células tumorais independente de andrógenos no câncer de próstata



1) As células sofrem diversas alterações mutacionais, processos esses pelos quais algumas células da próstata proliferam fora de controle. 2) as células cancerosas da próstata são inicialmente andrógeno-dependentes. Portanto, a terapia de privação de androgênio é bem sucedida em destruir estas células cancerosas. 3) Algumas células são capazes de sobreviver a esse tratamento e continuam proliferando. 4) As células são agora andrógeno-independentes e ganham novas alterações, resultando em aumento da angiogênese. 5) As células andrógeno-independentes começam formar metástases para locais distantes

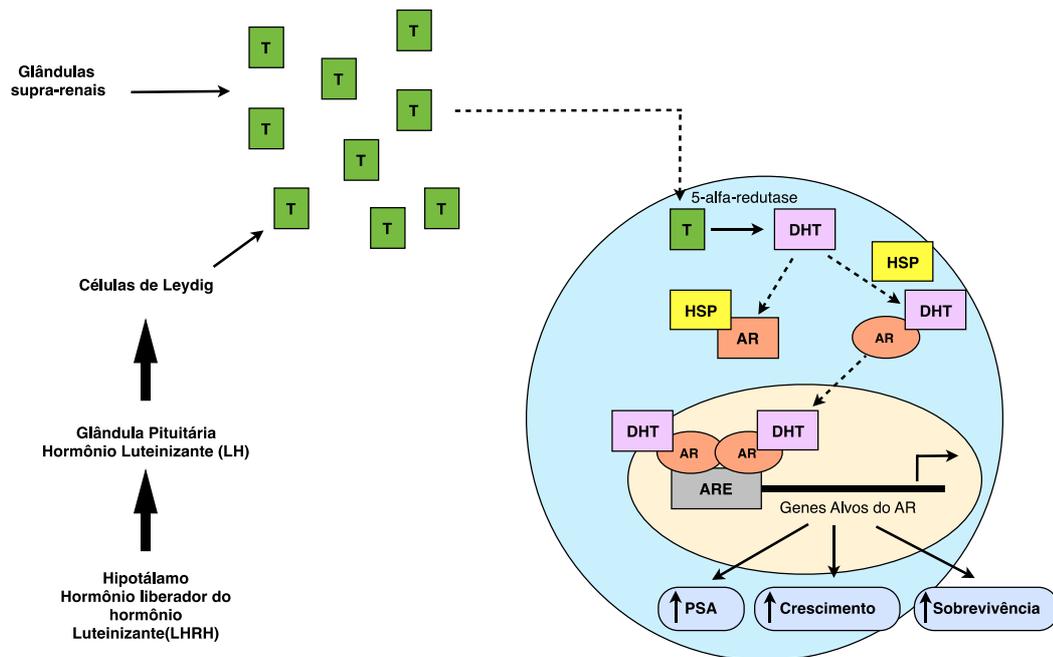
Fonte: Adaptado de SUN *et al.*, (2010) e HÖRNBERG *et al.*, (2011).

1.5.3 Sinalização do receptor de andrógeno – um regulador chave na progressão do câncer de próstata

A testosterona é o principal andrógeno produzido pelo organismo, sendo predominantemente liberado pelas células de Leydig dos testículos (Radmayr *et al.*, 2008). Pequenas quantidades são também produzidas nas glândulas supra-renais. A testosterona livre circulante, que não está ligada à proteína de ligação de hormônio esteróide (*steroid hormone binding protein* - SHBP), pode entrar nas células da próstata, onde é convertida no seu mais

potente metabólito, di-hidrotestosterona (DHT), o qual, por sua vez, se liga à proteína receptora de andrógeno (AR) (Figura 5) (Radmayr *et al.*, 2008; Tan *et al.*, 2015).

Figura 5 – Mecanismo de ação dos andrógenos e sinalização do receptor de andrógeno em células de próstata



T, testosterona; DHT, di-hidrotestosterona; HSP, proteína de choque térmico (*heat-shock protein*); AR, receptor de andrógeno; ARE, elemento responsivo a andrógeno (*androgen responsive element*). Para uma explicação detalhada das vias, consulte o texto

Fonte: Adaptado de TAN *et al.*, (2015). Glândula (hipotálamo), SETA, descrição da célula e núcleo

A testosterona pode ligar-se ao receptor de andrógeno, mas a DHT tem uma afinidade superior (Radmayr *et al.*, 2008). O receptor de andrógeno é um fator de transcrição nuclear que pode ativar e regular a expressão de muitos genes envolvidos no crescimento e na proliferação celular. A proteína AR consiste de três domínios: um domínio central de ligação ao DNA, um domínio de ligação no C-terminal e um domínio de transativação no N-terminal. O domínio do N-terminal desempenha um papel crítico na atividade de transativação transcricional do AR. Estudos de inibição deste domínio mostraram diminuição da atividade transcricional do AR (Andersen *et al.*, 2010). O domínio de ligação no C-terminal é o local onde interagem os andrógenos. Essa ligação resulta numa alteração conformacional no AR, onde esse receptor se dissocia das proteínas de choque térmico (*heat shock proteins* - HSP) no citoplasma, e passa a se localizar, posteriormente, no núcleo (Cardozo *et al.*, 2003). No núcleo, o AR se liga a sequências de DNA específicas, chamadas de elementos responsivos a andrógeno

(*androgen responsive element - ARE*), via domínio de ligação ao DNA, promovendo uma maior associação de fatores dentro de um complexo, o que conduz a transcrição de genes (Powell *et al.*, 2004). Vários genes são regulados pelo AR, incluindo calicreína-3 (KLK3) e o PSA.

Como mencionado anteriormente, a maioria dos cânceres de próstata começam em um estado dependente de andrógenos, em que esses são necessários para o *AR* ser ativado e regular seus efetores. Por outro lado, durante a privação de andrógeno, o *AR* é ativado prontamente, resultando em diminuição do crescimento e proliferação de células cancerosas (Denmeade *et al.*, 1996). Os receptores de andrógenos, bem como fatores da via de sinalização do receptor de andrógeno, foram encontrados como expressos de forma aberrante ou com mutações em muitos cânceres da próstata, levando à especulação de que estas proteínas permanecem como moléculas-chave na progressão do câncer de próstata (Taplin; Balk, 2004; Mcphaul, 2008; Devlin; Mellado *et al.*, 2009; Mudryj, 2009; Attar *et al.*, 2010).

1.5.4 Mutações no receptor de andrógeno

Uma das principais mutações e alterações importantes que ocorrem na patobiologia do câncer de próstata acontece no receptor de andrógeno. Essas alterações podem ocorrer nas células cancerosas da próstata, processos esses que culminam em células andrógeno-independentes. O gene *AR* está localizado no cromossomo X e a perda de função do gene resulta na síndrome de insensibilidade androgênica. As frequências de mutações genéticas nos loci do *AR* são tipicamente raras em tumores da próstata em fase inicial (0-4%) (Gleason, 1966), mas tornam-se mais frequentes nos tumores avançados e recorrentes (Taplin *et al.*, 1995). As mutações no *AR* são relatadas em 10-20% dos pacientes com tumores independentes de andrógeno e esse processo funciona como modelo, ajudando na proliferação e sobrevivência em condições de privação de andrógeno (Taplin *et al.*, 1995).

A mutação no *AR* relatada pela primeira vez foi descrita na linhagem celular de câncer de próstata humano dependente de hormônio (LNCaP). Essa linhagem deriva de metástase de nódulo linfático (Wilding *et al.*, 1989). LNCaP contém uma mutação *missense* no códon 877 do RNAm de *AR*, o que resulta numa substituição de aminoácidos treonina em alanina (Wilding *et al.*, 1989). Essa mutação ocorre no domínio de ligação do ligante, resultando em diminuição da especificidade do ligante, portanto, outros hormônios tais como a progesterona, estrogênios e vários anti-androgênios podem ligar-se e ativar o fator de transcrição.

Durante a ablação androgênica, tal mutação torna-se benéfica para as células cancerosas, pois aumenta a especificidade para a ativação, conferindo vantagem de crescimento e sobrevivência sobre as células que não possuem esta mutação. Num estudo inicial, Gaddipati *et al.* (1994) verificaram que 6 de 24 amostras tumorais metastáticas abrigavam esta mutação, T877A, indicando que a alteração é comumente encontrada em pacientes com células andrógeno-independentes. Além disso, a frequência e natureza das mutações do *AR* em câncer de próstata parecem ser dependentes do estágio e de pressões seletivas exercidas sobre os tipos de câncer. Cânceres localizados exibem uma menor frequência de mutações, enquanto que os tumores que metastatizaram, apresentam aumento da incidência de mutações no *AR* (Taplin *et al.*, 1995). Um estudo realizado por Marcelli *et al.* (2000) mostrou que mutações pontuais foram encontradas em 8 de 38 pacientes submetidos à terapia hormonal, com metástases em linfonodos, enquanto que nenhuma mutação foi encontrada em 99 pacientes com glândulas removidas por prostatectomia, sem terapia hormonal.

1.5.5 Tratamentos para o câncer de próstata

As opções de tratamento para câncer de próstata dependem se o câncer é clinicamente localizado ou se metastatizou. Tumores clinicamente localizados representam desafios para o tratamento. Como uma grande parte destes casos permanecem em estado indolente, não necessitando de tratamento imediato, a maioria destes tumores são de crescimento lento. No entanto, 15% destes casos são conhecidos por serem agressivos na natureza, o que requer alguma forma de tratamento direto (Cooperberg *et al.*, 2010; Chang *et al.*, 2014).

Um dos principais problemas para o tratamento é a definição de doença de alto risco. Embora a literatura sobre o câncer de próstata de “alto risco” seja extensa, um esquema de classificação conjunto que permita definir o tipo de tratamento com base nos resultados para os pacientes de alto risco deve ser determinado de forma confiável. Porém, atualmente tal esquema permanece indefinido. Isso também é confundido pelos vários métodos de diagnóstico utilizados para classificar os pacientes, e por variações nas próprias modalidades de tratamento, com base principalmente em cirurgia ou radioterapia (Pienta; Esper, 1993).

As opções de tratamento variam com base na pontuação de Gleason. O escore de Gleason varia de 2 a 10. Um escore de 2 está associado com o melhor prognóstico, enquanto o escore de 10 com o pior (Epstein *et al.*, 2005). É bem aceito que os pacientes que apresentam grau de Gleason de 6 ou menos são considerados "baixo grau" ou indolentes. Para esses

pacientes, uma abordagem de acompanhamento referido como "vigilância ativa" é realizada. Os pacientes são direcionados a um programa de acompanhamento clínico, em que o tamanho do tumor e progressão é medida por testes de PSA no soro rotineiramente (Ganz *et al.*, 2012). Se há suspeita de elevado PSA no soro e, aumento na progressão do tumor, biópsias subsequentes são realizadas e o tecido resultante é avaliado para deduzir se o tumor se tornou mais agressivo. Isso exigirá tratamentos diretos. Para muitos pacientes idosos que apresentam tumores localizados e de baixo grau ou indolentes, a abordagem de vigilância ativa pode parecer a opção melhor, a fim de evitar o excesso de tratamento. Verificou-se que os pacientes submetidos ao tratamento convencional de câncer de próstata com tumores localizados, submetidos aos protocolos de vigilância ativa, exibiram sobrevivência de 94% para 10 anos. Estes pacientes mostraram escore de Gleason 2 a 4 e, quando em comparação com pacientes com escore de 8-10, a sobrevivência foi de 45% (Lu-Yao *et al.*, 1997).

Muitos pesquisadores estão trabalhando para identificar moléculas biológicas, tais como proteínas e marcadores de RNA em tumores de amostras de biópsia, para refinar ainda mais a avaliação dos riscos em câncer de próstata (Cooperberg *et al.*, 2013). Esses incluem marcadores de proliferação celular tais como Ki-67, alterações nas vias específicas, como a cascata de sinalização PI3K/PTEN e alterações do número de cópias a nível de DNA. Além disso, o PCA3, um RNAm não codificante específico do câncer de próstata, é sub-expresso em comparação com o tecido normal benigno e detectado na urina. Essa molécula tem potencial como marcador e também tem sido utilizada eficazmente em uma opção na estratégia de vigilância ativa (Durand *et al.*, 2013; Ploussard *et al.*, 2012). Embora os níveis de PCA3 correlacionem bem com o grau de Gleason e o alto volume do tumor, esses são parâmetros ainda incertos para definir o risco da doença. Para os pacientes que apresentam câncer de próstata de alto risco, as opções de tratamento imediatas são necessárias. As opções de tratamento para câncer de próstata agressivo incluem: prostatectomia radical, radioterapia, terapia de privação de andrógeno e quimioterapia.

1.5.6 Prostatectomia radical

Desde o advento dos testes de PSA, os diagnósticos de câncer de próstata são elevados na doença clinicamente localizada, muitos dos quais são relevantes (Lu-Yao *et al.*, 1997). A prostatectomia radical é a remoção completa do órgão para tratar o câncer localizado e de alto risco, como também, na obstrução urinária devido à HBP. Uma extensa dissecação pélvica do linfonodo também é normalmente realizada para remover o potencial tecido canceroso,

comumente encontrado em áreas circundantes. O benefício na sobrevivência de pacientes que passaram pela prostatectomia radical varia. O paciente pode morrer de câncer de próstata ou de outras condições patológicas, mais notavelmente doenças cardiovasculares ou em decorrência da velhice. Dois grandes estudos independentes avaliaram se os homens que foram submetidos a prostatectomia radical, versus espera em protocolos de vigilância ativa, tinham benefícios mediante esse procedimento cirúrgico. O primeiro estudo conhecido como a Intervenção do câncer de próstata versus Observação Trial, distribuiu, aleatoriamente, 731 homens com câncer de próstata diagnosticado. Foi estabelecida terapia de vigilância ativa ou prostatectomia radical. Surpreendentemente, nenhum benefício global nos pacientes cirúrgicos foi observado, muito embora a sobrevivência em pacientes livres de metástase óssea foi maior no grupo de prostatectomia radical (Wilt *et al.*, 2012). O segundo estudo foi na Escandinávia, onde, os pacientes foram distribuídos aleatoriamente para receber a prostatectomia radical ou a terapia de vigilância ativa (Bill-Axelsson *et al.*, 2011). Este estudo mostrou que, após 15 anos, a prostatectomia radical diminuiu a mortalidade por câncer de próstata, e a incidência de metástases ósseas.

1.5.7 Terapia de radiação

Outra opção de tratamento tipicamente utilizada para tratar pacientes com câncer de próstata é a terapia com uso de radiação. Existem duas terapias com radiação, sendo as mais largamente utilizadas para esse tipo de câncer a radiação com feixe externo e a braquiterapia. A terapia de radiação fundamenta-se no conceito de que a radiação dirigida para uma região específica maligna da próstata causará danos no DNA, levando à instabilidade genética, resultando na destruição das células alvo. As células cancerosas, normalmente, tem uma maior susceptibilidade à radiação, uma vez que geralmente têm defeitos nos mecanismos de reparo celular, tipicamente resultando em maior morte celular em comparação com as células normais (D'amico *et al.*, 1998; King *et al.*, 2000).

O feixe de radiação externo tem sido utilizado há muitos anos para tratamento de câncer de próstata (D'amico *et al.*, 1998; Shipley *et al.*, 1999). Essa terapia consiste na administração externa e diária de raios X ou gama, com duração de 6 a 10 semanas. O uso de técnicas de imagem na radioterapia permitiu maior precisão em localizar o alvo, o que por sua vez, reduziu a quantidade de tecido saudável no campo de tratamento (Zelefsky *et al.*, 1998). As imagens tridimensionais de alta resolução da próstata e de tecidos circundantes são geradas usando imagens computadorizadas. A partir daí, a dose e a distribuição ideais de radiação são

determinadas e administradas (Fuks *et al.*, 1991). O feixe de radiação externo é frequentemente administrado em pacientes com aumento do PSA, ou mesmo quando detectável após a prostatectomia radical.

Contrariamente, a braquiterapia é uma forma de radioterapia que utiliza uma fonte de radiação, colocada no interior ou ao lado da área que necessita de tratamento (Blasko *et al.*, 1993; Porter *et al.*, 1993; Ragde *et al.*, 1998). Muitas vezes, representa uma abordagem vantajosa quando a radiação está confinada às áreas malignas da próstata. A taxa de sobrevivência da braquiterapia é semelhante ao da radiação de feixe externo ou da prostatectomia radical. A braquiterapia é também, muitas vezes, administrada em conjunção com radiação de feixe externo. O procedimento também é concluído mais rapidamente e os pacientes são capazes de ir para casa no mesmo dia do tratamento (King *et al.*, 2000). Alguns dos efeitos colaterais mais comuns na radiação de feixe externo e na braquiterapia incluem incontinência, impotência, infertilidade, problemas intestinais e fadiga (D'amico *et al.*, 1998; Ragde *et al.*, 1998; King *et al.*, 2000).

1.5.8 Terapia de Deprivação de Andrógeno

Tanto as células da próstata normais e quanto as malignas requerem andrógenos para o seu crescimento e desenvolvimento. A descoberta de que o crescimento do câncer de próstata se baseou em elementos tais como andrógenos, resultou na atribuição ao Dr. Charles Huggins com o Prêmio Nobel em 1966 (Huggins; Hodges, 1972). Desde então, sabe-se que essas células privadas de andrógenos tem diminuição da proliferação e taxas de apoptose elevadas, enquanto que as células da próstata normais sofrem atrofia, resultando numa redução do tamanho total da glândula. Em consequência, os métodos para bloquear as ações dos andrógenos tornaram-se uma estratégia muito eficaz para esse tipo de câncer, especialmente na doença metastática (Taplin *et al.*, 1995).

Existem vários métodos utilizados para diminuir os níveis de andrógenos globais, incluindo orquiectomia (castração cirúrgica) e castração química. O padrão ouro para câncer de próstata metastático tem sido orquiectomia bilateral. Por este método, 95% dos níveis de testosterona no soro são eliminados, resultando num aumento permanente dos hormônios luteinizante (LH) e dos hormônios folículo-estimulante (FSH), ambos os quais são parte integrante do mecanismo de *feedback* para a produção de testosterona. Alguns dos agonistas e antagonistas utilizados na clínica mais comum de glândula liberadora de hormônio luteinizante incluem leuprolida, goserelina, triptorelina, histrelina e degarelix (Lavorato, 2012) Essas drogas

são normalmente injetadas no sangue, obtendo resultados semelhantes ao da castração cirúrgica. Outro método para a privação de andrógeno é o uso de anti-androgênios.

O andrógeno é o substrato para a proteína do gene *AR*. Esse é um fator de transcrição nuclear que regula a expressão de muitos genes (Radmayr *et al.*, 2008). Muitas moléculas que podem inibir a atividade de *AR* também tem sido utilizadas, e são conhecidas como anti-androgênios. Moléculas anti-androgênicas podem entrar nas células do câncer de próstata e prevenir a ligação da testosterona com o AR, devido a uma maior afinidade para esta proteína. Isso efetivamente inibe a função das proteínas e impede-o de exercer as suas funções normais como um fator de transcrição. Os anti-androgênios mais comumente usados incluem flutamida, bicalutamida, nilutamida, sendo todas administradas por via oral (Sáez; Galcerán, 2004).

1.5.9 Quimioterapia para o câncer de próstata agressivo e avançado

Embora muitos dos tratamentos acima mencionados são eficazes, os pacientes que se apresentam com câncer de próstata independente de andrógeno (CPIA) e agressivo, muitas vezes, não possuem opções de tratamento disponíveis definitivos, que não as quimioterapias convencionais. Agentes quimioterápicos atuais utilizados para o tratamento de CPIA/agressivo não demonstraram benefícios na sobrevivência, mas fornecem cuidados paliativos e melhoram a qualidade de vida global. Os atuais agentes quimioterápicos disponíveis para o câncer de próstata avançado incluem: mitoxantrona, prednisona, docetaxel e paclitaxel (Petrylak *et al.*, 2004). A grande maioria destes agentes tem como alvo células de crescimento rápido e alteram importantes mecanismos da maquinaria celular. Por exemplo, o docetaxel e o paclitaxel inibem a formação de microtúbulos do fuso, o que resulta em defeitos na mitose. Muitos desses mecanismos serão discutidos nos itens subsequentes. Embora todos eles pareçam ter uma ligeira vantagem sobre a sobrevivência (geralmente meses), eles são não-específicos, pois afetam outras células não-cancerosas. Por essas razões, que a pesquisa contínua na prospecção de moléculas é necessária para melhor identificar potenciais alvos no câncer de próstata, a fim de descobrir novos compostos anti-câncer, os quais possam ser melhor utilizados na terapia, com menos efeitos colaterais e tóxicos.

1.5.10 Terapias Emergentes para o câncer de próstata

Desde 2010, vários ensaios clínicos abordando câncer de próstata, resistente à castração metastático, foram publicados com resultados favoráveis. Sipuleucel-T, vacina autóloga imunoterapêutica de células dendríticas CD54-positivo, demonstrou influência significativa na sobrevivência em doentes com câncer de próstata metastático resistente à castração (Kantoff *et al.*, 2010). Cabazitaxel, um novo taxano semi-sintético, aumentou a sobrevida média por > 3 meses e mostrou significativa eficácia após falha no uso do docetaxel (De Bono *et al.*, 2010). Foi observado que o denosumabe, um anticorpo monoclonal humano contra o receptor ativador do fator nuclear kappa- β (*receptor activator of nuclear factor kappa- β - RANK*), retardou o aparecimento dos efeitos adversos, influenciando de forma significativa no tratamento do câncer de próstata resistente à castração metastático, em relação ao uso do ácido zolendrônico (Fizazi *et al.*, 2011).

Uma terapia fundamentada no uso do isótopo rádio-223 foi observada como paliativa da dor nos ossos, visto que houve melhora nas condições de sobrevivência de pacientes com câncer de próstata resistente à castração metastático, (Nilsson *et al.*, 2012).

No entanto, os resultados de ensaios clínicos obtidos com compostos que atuam na sinalização AR ganharam mais atenção. MDV-3100 (enzalutamida), um novo antagonista de AR, reduz a ligação do ligante e, conseqüentemente, há acúmulo nuclear de AR, resultando em declínio de PSA, pelo menos, 50% em ambos os doentes sem tratamento prévio e tratados com docetaxel (Scher *et al.*, 2010). Ensaios de Fase III com MDV- 3100 foram concluídos com êxito em 2010 e foi anunciado que a droga melhora a sobrevivência de pacientes tratados com câncer de próstata resistente à castração por quase cinco meses de quimioterapia. MDV-3100 é uma droga que espera receber a aprovação da *U.S. Food and Drug Administration's* (FDA).

O acetato de abiraterona, que bloqueia uma etapa chave da síntese de androgênio catalisada por 17,20-liase (CYP17A1), recebeu a aprovação da FDA em 2011 para uso em tratamento de pacientes com câncer de próstata resistentes à castração metastáticos e que falharam na quimioterapia. O acetato de abiraterona resultou em quase quatro meses de sobrevivência nos ensaios clínicos iniciais (De Bono *et al.*, 2011; Vasaitis; Bruno; Njar, 2011).

Muitos outros compostos que atuam na sinalização de AR estão atualmente em desenvolvimento clínico, incluindo outros inibidores 17,20 liase (TAK-700, TOK-001) (Vasaitis; Bruno; Njar, 2011) e antagonistas de AR (ODM-201, ARN-509) (Fizazi *et al.*, 2014). Apesar desses avanços, uma parte da população com câncer de próstata resistente à castração

apresenta resistência intrínseca também para os novos agentes terapêuticos ou a resistência se desenvolve durante o curso do tratamento. As razões para estes mecanismos de resistência à terapia podem estar relacionadas com a diversidade e heterogeneidade genética de genomas para o câncer de próstata resistente à castração e plasticidade genômica dos cânceres (Grasso *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2011). O conhecimento aprofundado da Biologia Molecular e dos perfis proteômicos do câncer de próstata podem, assim, abrir novas opções de tratamento.

Outro grupo de substâncias utilizadas no tratamento do câncer de próstata são as drogas estatinas - *Statins*. As estatinas são medicamentos que reduzem o colesterol, prevenindo doenças cardiovasculares. Estas drogas estão entre os medicamentos mais prescritos em todo o mundo (Mann *et al.*, 2008). Estatina inibe a 3-hidróxi-3-metilglutaril-coenzima A redutase, uma enzima que controla a conversão de 3-hidróxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) em mevalonato, esse sendo o precursor essencial de colesterol (Chao *et al.*, 2013). Isso resulta em aumento da expressão da lipoproteína de baixa densidade (LDL) em receptores no fígado, logo, aumentando a eliminação de LDL a partir do sangue (Bilheimer *et al.*, 1983).

Os efeitos da inibição pleomórfica da HMG-CoA redutase são o impedimento da ativação de importantes reguladores do ciclo celular, tais como as proteínas Ras e da família Rho. A desregulação dessas proteínas tem sido associada a carcinogênese (Benitah *et al.*, 2003; Jackson *et al.*, 1977). A regulação do colesterol com uso das estatinas pode também afetar indiretamente a carcinogênese da próstata através de vias parcialmente reguladas pelo colesterol como Akt e produção de andrógeno (Chao *et al.*, 2013; Dillard *et al.*, 2008). As estatinas mostraram atividade anti-câncer em numerosos estudos *in vitro* e *in vivo*, apresentando atividades anti-neoplásicas, tais como na indução de apoptose (Hoque *et al.*, 2008), na supressão da angiogênese (Dulak; Jozkowicz, 2005), na supressão de crescimento tumoral (Weis *et al.*, 2002) e na inibição do potencial metastático (Kusama *et al.*, 2002).

1.5.11 O citoesqueleto como alvo de novas drogas contra o câncer de próstata

Como dito anteriormente, o tratamento da deprivação de andrógeno é umas das estratégias empregadas no tratamento do câncer de próstata. Infelizmente, na maior parte dos casos, os pacientes sofrem de recidiva do tumor, este tornando-se independente de andrógeno e reativando a sinalização do AR. Consequentemente, vias envolvidas com a proliferação celular e outras que favorecem os processos de carcinogênese são ativadas. Superar essa resistência terapêutica e promover o correto direcionamento no tratamento destes tumores é um grande desafio clínico e envolve o uso de agentes citotóxicos/citostáticos que tenham como

alvo os microtúbulos, por exemplo, estabelecendo-se, assim, uma quimioterapia de primeira linha para os casos da doença avançada (Sella *et al.*, 1994).

O citoesqueleto é uma estrutura dinâmica de polímeros interligados por uma variedade de microfilamentos. Em quase todas as células o citoesqueleto está em constante mudança, o que resulta em um arranjo muito adaptável. Esta capacidade de adaptação permite ao citoesqueleto cumprir três tarefas principais: a distribuição espacial dos conteúdos da célula, a resistência e a transmissão de tensão, o que liga a célula para o meio ambiente, além da geração de forças dentro da célula, o que resulta em alterações na forma e na migração celular (Elson, 1988). O citoesqueleto consiste em três principais polímeros filamentosos, microtúbulos, actina, e filamentos intermediários. Cada um deles pode montar, desmontar e interligar entre si e aos outros, formando diferentes tipos de redes com a ajuda de proteínas de regulação e de ligação. Essas redes podem interagir umas com as outras e proporcionar, ainda, uma maior gama de propriedades. Os três componentes do citoesqueleto diferem nas suas propriedades mecânicas, na sua polaridade, na dinâmica de montagem e desmontagem dos seus monômeros (Elson, 1988).

1.5.12 Actina

O componente principal do citoesqueleto é a actina. A actina é constituída a partir de monômeros de actina globular (actina G), que podem polimerizar e formar filamentos helicoidais com um diâmetro de cerca de 7-9 nm, chamado F-actina. Como actina G é assimétrica, F-actina tem polaridade. As duas extremidades diferem em sua taxa de crescimento, com a extremidade do filamento que termina com ponta de flecha designada de extremidade penetrante, enquanto a extremidade oposta é designada de extremidade farpada. Dessa forma, os filamentos apresentam uma extremidade na qual, preferencialmente, ocorre o crescimento (extremidade +), enquanto na outra (extremidade -) a perda de monômeros é favorecida. A extremidade de maior crescimento do filamento (+) coincide com a extremidade farpada, enquanto a de remoção mais rápida dos monômeros (-) coincide com a extremidade penetrante (Carvalho *et al.*, 2013). Existem várias isoformas de F-actina, denominadas como α -, β -, ou γ -actina, que são extremamente semelhantes na sua estrutura e diferem apenas na sua região N-terminal (Kashina, 2006). No entanto, as funções são diferentes, por exemplo, a α -actina é usada em células de músculo e desempenha um papel importante para a contração muscular, β -actina pode ser encontrada na parte da frente das células e as formas de γ -actina formam as fibras em movimento e são necessárias para manutenção do citoesqueleto

(Belyantseva *et al.*, 2009; Karakozova *et al.*, 2006). Os filamentos de actina podem alongar de forma constante, a fim de exercer forças ou desmontar. Isso depende da quantidade de monômeros disponíveis e da necessidade da célula, a qual transmite sinalização para que os processos ocorram. A polimerização de actina e despolimerização é altamente regulada dentro de diferentes regiões da célula (Naumanen *et al.*, 2008).

1.5.13 Microtúbulos

Os microtúbulos são os componentes mais rígidos do citoesqueleto. Os microtúbulos têm comprimento variados e possuem cerca de 25 nm de diâmetro. Esses comprimentos ajudam o microtúbulo a percorrer toda a célula formando longos tubos, utilizados, por exemplo, no fuso mitótico durante a divisão celular (Brangwynne *et al.*, 2006). Além de desempenhar papel essencial no movimento, no transporte e na segregação de cromossomos durante a divisão celular (Downin; Nogales, 1998), as subunidades de microtúbulos são assimétricas gerando, assim, polaridade. Essas subunidades são heterodímeros e consistem de α - e β -tubulinas, ambas componentes possuem um sítio de ligação nucleotídica para GTP, o chamado *N-site* e *E-site*, para α - e β -tubulinas, respectivamente. Vários heterodímeros ligados em conjunto, formam um protofilamento, em que, o lado que termina em α -tubulina, é geralmente identificado como (-) e o lado que termina em β -tubulina, como (+), porção final. Treze protofilamentos em conjunto, formam um único microtúbulo, um tubo oco que tem um diâmetro de 25 nm. Dentro da célula, os microtúbulos são organizados por centros de organização de microtúbulos, onde a região (-) dos microtúbulos são centralizadas. As células podem ter várias regiões organizadoras de microtúbulos, as quais, mais proeminentes, são chamadas de centrossomos. A montagem e desmontagem de microtúbulos é bastante complexa e tem principalmente duas condições dinamicamente estáveis, crescimento ou dissociação (desmontagem). Os microtúbulos estão crescendo e encolhendo na porção final (+) (Mitchison; Kirschner, 1984), e podem alternar rapidamente entre os dois processos, o que permite aos microtúbulos se reorganizar rapidamente (Holy; Leibler, 1994).

1.5.14 Filamentos Intermediários

Os filamentos intermediários são o terceiro componente principal do citoesqueleto. Com comprimento de cerca de 1 μm proporciona estabilidade mecânica para a célula (Mücke

et al., 2004). Os filamentos resistem a forças de tração mais elevadas do que os microtúbulos ou actina e são muitas vezes observados em resposta ao estresse, por exemplo, nas células epiteliais do pulmão para resistir a fortes tensões (Flitney *et al.*, 2009).

As subunidades dos filamentos intermediários são compostas por dois dímeros simétricos e, portanto, constituem filamentos apolares. O diâmetro destes filamentos é de cerca de 10-12 nm. Existem diferentes classes de filamentos intermediários. Os exemplos de maior destaque são vimentina e queratina. A organização dos filamentos intermediários depende do tipo de célula, essa organização pode ser distribuída por toda a célula, como no caso da queratina em células epiteliais ou assimetricamente e orientadas para o exterior da célula, como para o caso da vimentina. A montagem não é tão dinâmica como na actina ou nos microtúbulos. Os filamentos intermediários podem desempenhar um papel ativo na dinâmica celular, em geral, dependendo do tipo, quantidade e ligação (Helfand *et al.*, 2004). A quantidade e a distribuição dos filamentos intermediários pode ser diferente com os tipos de células e se refletir em suas propriedades mecânicas, especialmente para casos de grandes deformações celulares. Um bom exemplo são os queratinócitos que podem resistir a grandes forças, devido à sua forte rede de queratina (Fudge *et al.*, 2008).

1.5.15 Centrossomo

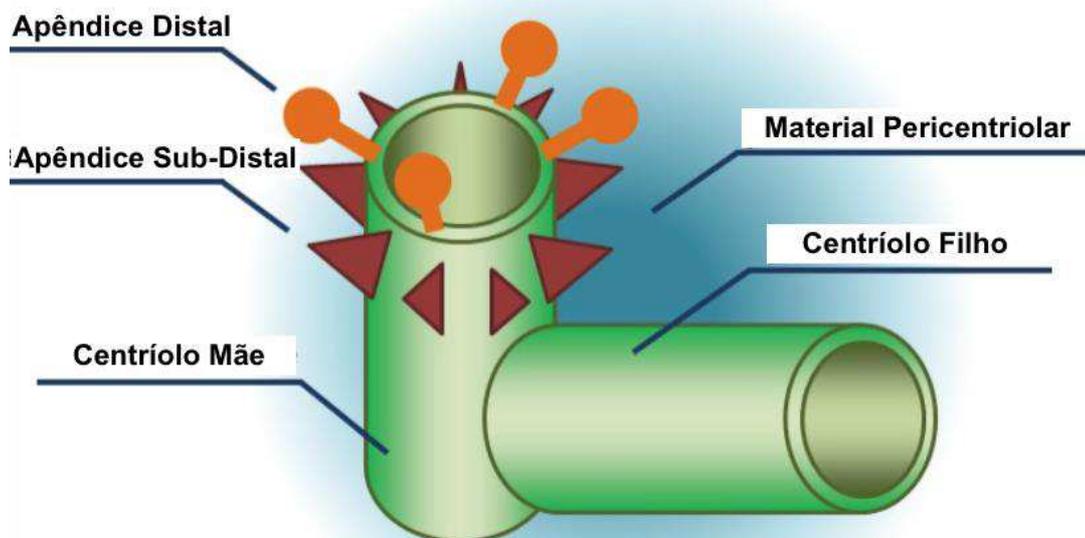
Outro alvo de drogas bastante pesquisado é o centrossomo. O centrossomo é o principal centro de organização de microtúbulos (*microtubule-organizing center* - MTOC). É uma organela celular de grande importância em muitos processos dependentes de microtúbulos durante a interfase e a mitose. Na interfase, o centrossomo organiza o citoesqueleto dos microtúbulos e está envolvido na formação do cílio primário. Na mitose, o centrossomo estabelece matrizes de microtúbulos nos pólos do fuso (Bettencourt-Dias; Glover, 2007; Pihan, 2013).

O centrossomo é constituído por um par de centríolos orientados ortogonalmente, com comprimento de 200 nm cada, esses incorporados em uma rede de material pericentriolar (*pericentriolar material* - PCM) e localizado próximo ao núcleo. Os dois centríolos não são idênticos, pois estão em diferentes estádios de maturação. Um totalmente maduro, denominado de mãe, pode ser distinguido pela presença de dois conjuntos de apêndices de proteínas, utilizadas para a ancoragem dos microtúbulos. O centríolo menos maduro, filho, em contraste, não possui as mesmas estruturas (Figura 6) (Azimzadeh; Bornens, 2007; Bornens, 2002; Mazzorana *et al.*, 2011). É importante destacar que os centríolos tem um papel no recrutamento

do material centriolar. Sem eles, há dispersão do PCM e perda da integridade centrossomal (Basto, 2006; Bettencourt-Dias; Glover, 2007; Dammermann *et al.*, 2004).

Durante a mitose, os centrossomos, subseqüentemente, movem-se para os pólos opostos do núcleo, enquanto continuamente aumentam de tamanho. Um estudo em embriões de *C. elegans* estimou um diâmetro máximo de 500 nm (Jaensch *et al.*, 2010). Além de desempenhar importante papel na mitose, o centrossomo também influencia nos processos dependentes de microtúbulos, incluindo a forma da célula, polaridade e motilidade (Knockleby; Lee, 2010; Nigg, 2007).

Figura 6 – Os principais componentes do centrossomo são aqui representados



Os centríolos mãe e filho, orientados a 90°, um em relação ao outro, estão incorporados no material pericentriolar. O centríolo mãe apresenta apêndices distais e sub-distais. O centríolo filho está ligado à extremidade proximal do centríolo mãe

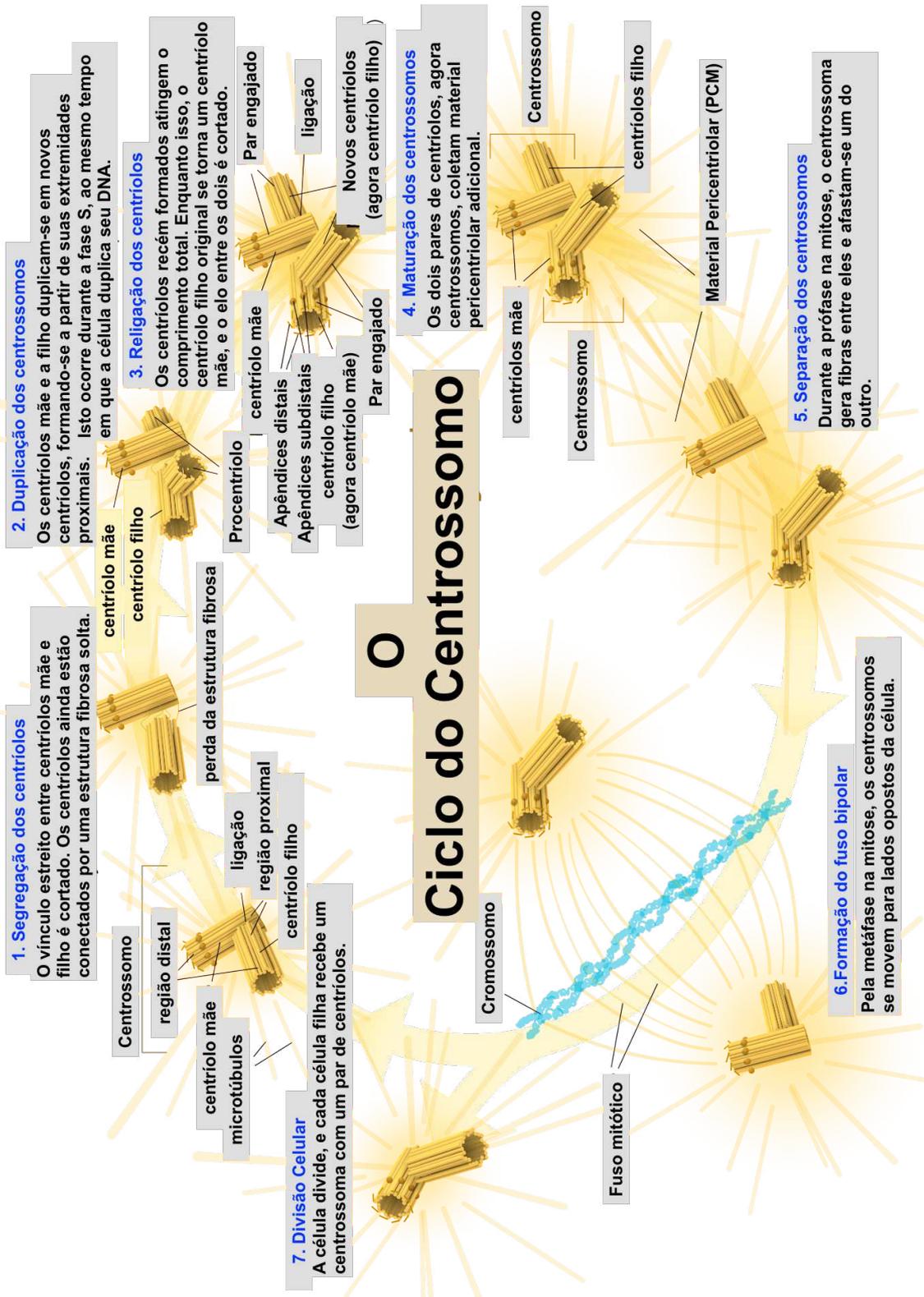
Fonte: Adaptado de AZIMZADEH; BORNENS, (2007).

Como DNA, os centríolos normalmente duplicam de forma semiconservativa uma vez por ciclo celular durante a fase S, garantindo que cada célula filha herde um centrossomo no final da divisão celular (Firat-Karalar; Stearns, 2014). O ciclo do centrossomo pode ser subdividido em cinco etapas distintas: segregação do centrossomo (fase M), desengajamento do centríolo (Fase M tardia/fase G1), duplicação dos centríolos (fase S), maturação do

centrossomo e separação do centrossomo (fase G2) (Figura 7) (Bettencourt-Dias; Glover, 2007; Blagden; Glover, 2003; Rosenblatt, 2005).

O controle desregulado na separação central do centrossomo pode causar eixos mitóticos monopolares e multipolares e podem ser a causa da instabilidade genômica (Ganem; Godinho; Pellman *et al*, 2009) e câncer (Basto *et al.*, 2008; Castellanos; Dominguez; Gonzalez *et al*, 2008). Foi proposto que o PCM tem um papel importante na duplicação dos centríolos, controlando a formação e estabilização do centríolo filho (Dammermann *et al.*, 2004; Loncarek *et al.*, 2008), levando a crer que os centríolos e o PCM têm uma relação simbiótica para a sua montagem e estabilização do centrossomo.

Figura 7 – O ciclo de divisão dos centríolos e maturação dos centrosomos



Fonte: elaborado pelo autor

Para que todos esses processos ocorram de maneira regulada e ordenada, várias proteínas são responsáveis pela progressão na modulação e regulação da mitose e no desenvolvimento centrossomal. As quinases mitóticas medeiam a duplicação, segregação e maturação dos centrossomos. Quatro famílias de proteínas quinases estão envolvidas no centrossomo e na regulação mitótica, tais como: Aurora, *Polo-Like-Kinases* (PLKs), *never-in-mitosis cinases* de *A. nidulans* (NIMA) relacionadas às quinases e quinases dependente de ciclinas (LACEY *et al.*, 1999). Quinases centrossômicas, tais como Aurora A, também interagem com outras moléculas onde formam complexos de multi-proteicos transitórios. Além disso, a localização de proteínas no centrossomo assim como o seu estado de fosforilação indicam a importância desta modificação pós-transcricional no controle da função centrossomal. Nesse sentido, o centrossomo atua como uma “plataforma” através da qual as enzimas e substratos podem ser recrutados, processados e possivelmente relocados, garantindo assim a correta distribuição das proteínas no determinado tempo e no espaço (Firat-Karalar; Stearns, 2014; Mazzorana *et al.*, 2011).

Os centrossomos fornecem o papel estrutural adicional e crucial para a divisão celular. Isso reflete quando esta organela mantém a forma correta do fuso, durante a mitose com o intuito de distribuir o material genético igualmente às células filhas (Bettencourt-Dias; Glover, 2007; Dammermann *et al.*, 2004). O comprometimento desse mecanismo leva a fenótipos aberrantes, como a aneuploidia, sendo esses causadores da instabilidade cromossômica associada ao início do câncer (Godinho *et al.*, 2009). Os centrossomos e microtúbulos também recrutam proteínas específicas, tais como moléculas motoras ou fatores para recrutamento de mais proteínas, os quais concedem a adequada montagem e dinâmica dessas organelas. Portanto, a integridade dos centrossomos requerem não apenas a presença e a atividade de quinases, mas também de interações proteína-proteína específicas com proteínas associadas aos microtúbulos para o correto funcionamento desta organela (Godinho *et al.*, 2009; Mazzorana *et al.*, 2011).

1.5.16 Integridade do citoesqueleto sob ação de drogas no câncer de próstata

Os agentes que tem como alvo os microtúbulos, pertencentes a família dos taxanos, causam estabilização dos componentes do citoesqueleto, tornando-se a primeira linha de quimioterapia para câncer de próstata metastático resistente à castração. Uma vez que os componentes principais do citoesqueleto, actina e microtúbulos, possuem papéis vitais na

mitose, na motilidade celular e no movimento de cargas dentro, fora, e em torno da célula, esses são alvos relevantes para a quimioterapia do câncer (Darshan *et al.*, 2011; Jordan; Wilson, 2004; Pellegrini; Budman, 2005; Woods *et al.*, 1995).

O taxol, (paclitaxel), foi o primeiro fármaco taxano descoberto em 1970 como uma molécula derivada da casca da árvore Teixo do Pacífico (Schiff *et al.*, 1979). O paclitaxel se liga com alta afinidade aos microtúbulos (Schiff *et al.*, 1979), estabilizando assim toda a estrutura e impedindo as células de sofrer mitose, resultando em um bloco de células mitóticas. Posteriormente, a apoptose acontece nas células que se dividem rapidamente (Jordan; Wilson, 2004; Schiff *et al.*, 1979). O paclitaxel também induz a parada do ciclo celular em dois pontos diferentes: na fase G1 do ciclo celular e na fase M. Durante a parada do crescimento, uma via dependente de *p53* induz a morte celular, enquanto que, na prófase, uma via independente *p53* é ativada (Woods *et al.*, 1995). O paclitaxel se liga à extremidade (+) da estrutura do microtúbulo, especialmente na subunidade β da tubulina, quando esta se heterodimeriza com a subunidade α -tubulina (Pellegrini; Budman, 2005). Esta ação explica a estabilização da estrutura, uma vez que a subunidade β -tubulina tem de se ligar a um local específico da subunidade α , importante para realizar a alongação (Pellegrini; Budman, 2005).

Evidências recentes mostraram mudanças de paradigma, levando-se em conta um novo efeito da estratégia de quimioterapia dirigida à tubulina e, como alvo também o AR (Zhu *et al.*, 2010), proporcionando novas perspectivas mecanicistas para uma resistência cruzada entre anti-andrógenos e taxanos em pacientes com câncer de próstata. A análise de imunoprecipitação de mutantes, na deleção de *AR*, revelou que o domínio N-terminal do AR está associado com a subunidade α -tubulina do microtúbulo. Além disso, tumores da próstata, após tratamento com docetaxel, mostraram significativa translocação de *AR* a partir do núcleo até a porção citoplasmática. Em que em pacientes não tratados, o AR foi localizado principalmente no núcleo (Zhu *et al.*, 2010). Ao direcionar o tratamento para a rede de microtúbulos foi possível prevenir a translocação de AR para o núcleo e este foi associado com a ativação transcricional de genes alvo e participantes de funções do AR (Darshan *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2010).

O cabazitaxel é uma segunda geração de taxanos, com base no desenho racional da estrutura α -tubulina por cristalografia (Paller; Antonarakis, 2011). Esse desenho racional, de um novo taxano, possui grupos metálicos extras, indiretamente ligados a estruturas do anel, permitindo a droga passar pela barreira hematoencefálica, com importantes resultados para os tumores que metastatizam para o cérebro (Paller; Antonarakis, 2011).

As epotilonas são uma outra classe de fármacos anti-tumorais que tem como alvo a estabilização da estrutura de microtúbulos de maneira semelhante aos taxanos (Goodin *et al.*, 2005). Eles compartilham os mesmos sítios de ligação na tubulina como paclitaxel. No entanto, eles também possuem algumas diferenças fundamentais que levam ao seu diferencial no uso clínico. As células cancerosas que exibem resistência ao taxano tem mais expressão de bombas p-glicoproteína. As epotilonas e seus derivados não são afetados por estas bombas, de forma semelhante ao cabazitaxel, portanto, mantendo a sua citotoxicidade (Jordan; Wilson, 2004; Goodin *et al.*, 2005). Mutações em tubulina β geralmente envolvem uma substituição de alanina para treonina, diminuindo a citotoxicidade dos taxanos. No entanto, a expressão de outros isotipos de tubulina β podem conferir resistência às epotilonas (Goodin *et al.*, 2005).

A pesquisa farmacológica do antagonista $\alpha 1$ -adrenoreceptor doxazosin[®] conduziu à geração de novos compostos à base de quinazolina, como agente de ligação, DZ-50, tendo efeitos como potentes indutores de *anoikis* contra células de câncer de próstata (Garrison; Kyprianou, 2006; Garrison *et al.*, 2007). O DZ-50 suprime o crescimento em ensaios xenográficos em tumores de câncer de próstata resistentes a castração e anula o seu potencial metastático *in vivo*, ao alterar a angiogênese, migração e invasão através de adesões focais (Hensley *et al.*, 2014). Recentemente, análises baseadas no estudo do genoma identificaram efetores críticos de adesão focal e interações nas junções, sendo alvos moleculares fundamentais do novo agente quinazolina. Significativamente, o DZ-50 provoca *anoikis* de células cancerosas, tendo como alvo talina e fibronectina, em complexos de adesão focal (Hensley *et al.*, 2014). Em células de câncer renal, a perda funcional da talina, completamente bloqueada pela formação do complexo de adesão focal, deu-se através da ação do composto (Sakamoto *et al.*, 2010). O DZ-50 também exibiu outros efeitos, bloqueando a via de sinalização de AKT, permitindo a indução *anoikis* entre células tumorais (Hensley *et al.*, 2014). Estudos estão em andamento a fim de caracterizar a ação antitumoral da DZ-50, estando na Fase I de ensaios clínicos para pacientes com câncer metastático resistente à castração.

1.5.17 Modelos para estudo no Câncer de Próstata

O desenvolvimento e utilização de vários modelos de culturas de células de câncer de próstata têm permitido o estudo e a compreensão da progressão da doença, bem como realizar ensaios em *Drug Discovery*, com a finalidade de caracterizar mecanismos de ação e fenótipos celulares. Esses modelos são especialmente úteis para estudar a função mecânica de

vários genes e proteínas, bem como para comparar condições de tratado e não-tratado. Aqui vamos discutir os modelos de linhagens celulares em relação à compreensão patobiologia do câncer de próstata e efeito do PTC sobre as células de PC3.

1.5.17.1 Modelos de Cultura Celular – *In Vitro*

A utilização de linhagens celulares derivadas de tumores humanos permite estabelecer o modelo simplificado para estudar patobiologia do câncer de próstata. Existem muitas linhagens celulares de câncer de próstata disponíveis, sendo a maioria dessas geradas a partir de tumores metastáticos (Peehl *et al.*, 2005). As linhagens celulares de câncer de próstata mais comumente utilizadas incluem a LNCaP (metástase de linfonodo), PC3 (metástase óssea), DU145 (metástase cerebral), 22Rv1 (tumor primário localizado), VCaP (metástase óssea) e MDA CaP 2b (metástase óssea). As células RWPE são células imortalizadas não-malignas epiteliais da próstata. Estas linhagens celulares podem ser ainda mais sub-classificadas em sua capacidade de resposta aos andrógenos, como andrógeno dependentes: LNCaP, VCaP, MDA CaP 2b e RWPE; e andrógeno-independentes: PC3, DU145 e 22Rv1 (Peehl *et al.*, 2005).

Há muitas vantagens e desvantagens quando da utilização de linhagens de células em comparação aos modelos *in vivo*, camundongos, por exemplo. Um dos principais benefícios da utilização de linhagens celulares é que elas são mais fáceis de manter e crescer em comparação com modelos animais, e, como resultado, são menos dispendiosos de utilizar. Além disso, as linhagens celulares são versáteis nos tipos de estudos moleculares que podem ser conduzidas. As linhagens podem ser facilmente manipuladas geneticamente, e também ser tratadas em cultura para avaliar os efeitos de vários estimulantes. Além disso, como mencionado anteriormente, as linhagens celulares podem ser xenoenxertado em ratos para avaliar o seu potencial de crescimento *in vivo*. No entanto, como com qualquer sistema modelo, as linhagens celulares tem as suas desvantagens e limitações. Uma das principais limitações de linhagens celulares é que estas não manifestam a heterogeneidade do microambiente do tumor ou o tumor em si. As linhagens celulares representam na sua maior parte, um grupo homogêneo de células que atuam de uma forma semelhante. O câncer é uma doença complexa que envolve não só as células cancerosas em si, mas também outros tipos de células que compõem o microambiente do tumor (Hawksworth, 1994).

Ainda, para se adaptar ao ambiente artificial, as linhagens de células apresentam alterações genéticas e fenotípicas, as quais, levam-nos a questionar se aquelas linhagens são

realmente representantes do tumor original de onde foram extraídas ou não. Muitas das linhagens celulares de câncer de próstata disponíveis já existem há décadas, e muitas delas já foram caracterizadas quanto às alterações genéticas devido ao tempo e o número de vezes de passagens (Hawksworth, 1994). No entanto, independentemente dessas questões, as linhagens celulares continuam a ser uma ferramenta valiosa e poderosa para a investigação do câncer de próstata, uma vez que proporcionam um forte ponto de partida para muitos estudos que buscam compreender o papel de vários genes, proteínas, vias moleculares e bioquímicas com relação à patobiologia do câncer de próstata e potenciais efeitos em testes de compostos anti-tumorais.

Os ensaios baseados em células são amplamente utilizados na descoberta de fármacos, pois a avaliação da interação molecular ocorre no contexto de um ambiente celular vivo (Baker *et al.*, 2007). Muitos compostos bioativos que inibem o crescimento de células cancerosas foram isolados utilizando linhagens celulares (Kakeya *et al.*, 2002, Kawada *et al.*, 2009). Na maioria dos casos, o alvo molecular para compostos isolados recentemente permanece desconhecido. A identificação de um alvo plausível às vezes só é possível com base nos resultados de ensaios baseados em células. No entanto, o alvo exato deve ser comprovado por ensaios enzimáticos, análises de proteínas de ligação, ou métodos genéticos empregando sirna (Kazami *et al.*, 2006; Teruya *et al.*, 2005). A confirmação de alvos moleculares, no entanto, é geralmente um processo difícil e demorado.

1.5.17.2 Proteômica como ferramenta em câncer

O proteoma é definido como o conjunto de proteínas expressas por uma célula, tecido ou organismo em um determinado tempo sob uma dada condição (WILKINS *et al.*, 1996). Como as proteínas são as bases dos processos metabólicos celulares e, conseqüentemente, do organismo como um todo, qualquer alteração no equilíbrio proteico pode acarretar mudanças fisiológicas e fenotípicas que, muitas vezes, são associadas à doenças ou condições não fisiológicas. O uso da proteômica como ferramenta de biologia de sistemas na pesquisa do câncer continua a se expandir em escopo e profundidade, à medida que a referida ferramenta evolui rapidamente para um método universalmente aplicável para a investigação de praticamente qualquer processo biológico.

Na pesquisa do câncer, a Proteômica é particularmente atraente para a investigação da patologia, pois muitas vezes envolve grandes redes de proteínas envolvidas em processos de alta complexidade como na tumorigênese, progressão da doença, regressão tumoral e metástase.

De fato, em pouco mais de uma década, especialmente as aplicações da Proteômica baseadas em espectrometria de massas na pesquisa relacionada ao câncer, desde a investigação mecanística até a descoberta de novos alvos terapêuticos, aumentaram exponencialmente (Guo; Zou; Wang, 2013).

Muitos trabalhos de revisão abordam diferentes tipos de câncer, tais como: mama (Sharma; Martin; McCabe, 2012), pancreático (Tonack *et al.*, 2009), ovariano (Callesen *et al.*, 2012), colorretal (Barderas; Babel; Casal, 2010), gliomas (Kalinina *et al.*, 2011) e outros. Diversos trabalhos, com base nos tipos de amostras coletadas de pacientes, investigam componentes subcelulares a exemplo de: tecido (Cazares *et al.*, 2011), soro sanguíneo (Fanayan; Hincapie; Hancock, 2012) e secretoma (Stastna; Van Eyk, 2012). Além disso, existem revisões que sugerem metodologias proteômicas inovadoras ou mesmo abordagens mais tradicionais na pesquisa do câncer, como a fosfoproteômica (Harsha; Pandey, 2010), estudos dos mecanismos de resistência aos fármacos (Koomen; Smalley, 2011) e busca de biomarcadores da doença (Liang *et al.*, 2012).

As abordagens proteômicas têm sido cada vez mais utilizadas no processo de descoberta pré-clínica de fármacos, para compreender os efeitos dos potenciais candidatos nos seus alvos protéicos e, para lançar luz sobre os mecanismos celulares por trás do fenótipo observado. Por outro lado, outros biomateriais, incluindo ácido desoxirribonucléico (DNA), ácido ribonucléico (RNA) e carboidratos também podem ser usados como novos alvos de fármacos com abordagens diferenciadas (Schirle; Bantscheff; Kuster, 2012). Estudos proteômicos com o principal objetivo de identificar novos alvos *druggable* para o tratamento do câncer têm sido relativamente pouco explorados. Nesse contexto, a Proteômica torna-se uma das principais ferramentas nesta tese para caracterização do perfil proteico da substância em estudo.

1.6 Natureza como fonte e painel de compostos bioativos

A natureza, fonte de muitos materiais químicos e biológicos, tem sido visada por muitos cientistas como uma fonte de produtos biologicamente ativos utilizados para manter a saúde e restaurar os desequilíbrios do paciente doente. Um termo genérico para tais sistemas medicinais é a tradicional medicina herbal (*Traditional Herbal Medicine* - THM). Muito antes da medicina ocidental se estabelecer, a natureza era considerada sagrada, e, portanto, acreditava-se possuir a cura divina e poderes revitalizantes. As pessoas costumavam utilizar de

plantas, animais e minerais para tratar desequilíbrios e restaurar a energia interior (Ichikawa *et al.*, 2007). Aproximadamente 80% das pessoas que vivem em países em desenvolvimento ainda aprendem sobre a estes sistemas/técnicas medicinais. No entanto, o uso de medicamentos a base dessa medicina em países industrializados aumentou significativamente na última década. Atualmente, muitos sistemas de saúde ao redor do mundo têm incorporado a medicina herbal como parte dos serviços de saúde. Pesquisadores em todo o mundo estão dedicando seu trabalho para o isolamento e identificação dos constituintes químicos e caracterizar os potenciais efeitos biológicos dos compostos isolados a partir de fontes investigadas (Ichikawa *et al.*, 2007).

Há uma notável diversidade química encontrada em milhões de espécies de plantas, animais, organismos marinhos, microorganismos, e tem sido uma das principais fontes de novos compostos terapêuticos candidatos (Cragg *et al.*, 2009; Kinghorn *et al.*, 2009). Particularmente, as plantas foram amplamente utilizadas como medicamentos tradicionais em quase todas as culturas antigas para o tratamento de um amplo espectro de doenças. Um exemplo é o registro conhecido "Ebers Papyrus", datado de 1.500 a.C., onde foi documentada a medicina egípcia a qual incluiu mais de 700 medicamentos, na sua maioria de origem vegetal. Outro registro de aproximadamente 1.000 substâncias derivadas de plantas foi encontrado na civilização da Mesopotâmia cuja data é estimada em 2.600 a.C. (Borchardt, 2002).

No século XX, o surgimento dos antibióticos produzidos por fermentação microbiana, aliado ao desenvolvimento marcante de fármacos sintéticos produzidos pela indústria farmacêutica, logo depois da Segunda Grande Guerra, foram marcantes no declínio do uso de plantas medicinais e conseqüentemente, no investimento em fármacos de origem vegetal. Nas últimas décadas, uma importante mudança no paradigma das sociedades ocidentais fez com que os produtos de plantas passassem novamente a ocupar papel de destaque por grandes contingentes das populações de países desenvolvidos e em desenvolvimento (Montanari; Bolzani, 2001).

Os metabólitos secundários produzidos por vegetais, melhor conceituados como metabólitos especiais, desempenharam um papel fundamental no desenvolvimento da química orgânica sintética moderna. Historicamente, o desenvolvimento da química orgânica ocorreu paralelamente ao estudo de plantas, principalmente a partir do século XIX, quando foram registrados os primeiros estudos, com base científica. Isso resultou no isolamento de alguns princípios ativos vegetais, já então conhecidas como medicinais. Desses estudos foram obtidas algumas substâncias que se consagraram como princípios ativos eficazes, e que até hoje, ainda

são muito empregados no tratamento de certas doenças, a exemplo de morfina, quinina, cânfora e cocaína (Decorte, 2016).

Os produtos naturais e seus análogos sintéticos tem seu papel crítico na prevenção e terapia do câncer (Kinghorn *et al.*, 2009), e mais de 60% do uso atual dos medicamentos anti-câncer são de fontes naturais (Cragg; Newman, 2005). Quatro classes principais de compostos têm sido amplamente utilizadas como agentes anticancerígenos, estes incluem alcalóides bisindol (vinca), pododifilotoxinas, taxanos e camptotecinas (Kinghorn *et al.*, 2009). Alcalóides da vinca e seus derivados (vinblastina e vincristina) foram inicialmente isolados da pervinca de Madagascar (*Catharanthus roseus* G.Don) e são bastante utilizados em terapias combinadas para tratar linfomas, leucemias, cânceres testicular avançado, mama e de pulmão (Gueritte; Fahy, 2005). Os taxanos e seus derivados (paclitaxel e docetaxel) foram inicialmente extraídos da casca do teixo do Pacífico (Schiff *et al.*, 1979) e são usados para o tratamento de múltiplos cânceres (Kingston, 2005). O camptotecinas e seus derivados (topotecano e irinotecano) foram identificados em extratos da *Camptotheca acuminata* e são muito utilizados para o tratamento de diversos tipos de cânceres (Rahier *et al.*, 2005). A podofilotoxina foi isolada das raízes de *Podophyllum peltatum* e *P. emodi*. Os etoposídeos e teniposídeos são derivados de *Podophyllotoxin* e são largamente utilizados no tratamento de linfomas, cânceres de brônquios, e testiculares (Lee; Xiao, 2005).

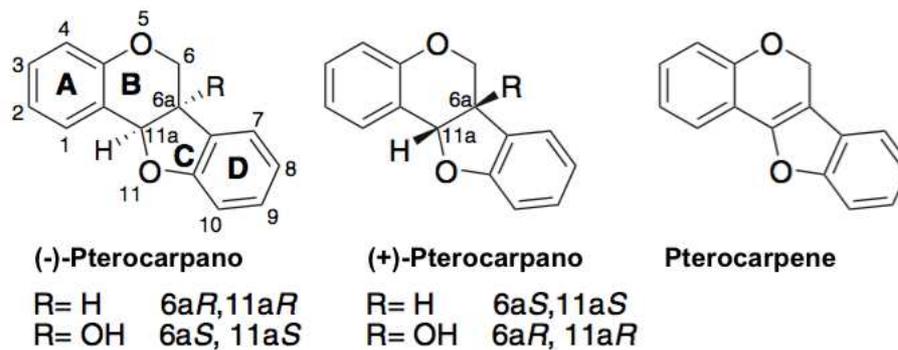
Numerosos ensaios pré-clínicos e clínicos na literatura procuram descrever os mecanismos moleculares inerentes às atividades anti-tumorais de potenciais compostos a candidatos terapêuticos. A grande maioria dos compostos avaliados é oriunda de fontes naturais em suas formas estruturais iniciais, como derivados ou como moléculas semi-sintéticas. Como resultado, os atuais agentes quimioterapêuticos foram inicialmente caracterizados de derivados de painéis constituídos por compostos naturais (Teiten *et al.*, 2012).

1.6.1 Pterocarpanos

Os Pterocarpanos são metabólitos secundários derivados da isoflavona e possuem um sistema de núcleos tetracíclico de anéis de benzofurano-benzopirano (Daniel; Purkayastha, 1995). A estrutura principal contém dois centros quirais em posições 6a e 11a que determinam

a estereoquímica da molécula (Figura 8) e constituem o segundo maior grupo de isoflavonóides naturais, desempenhando um papel importante como fitoalexinas¹.

Figura 8 – Numeração e estereoquímica da estrutura dos pterocarpanos. (JIMÉNEZ-GONZÁLEZ et al., 2008)



Fonte: elaborado pelo autor

O que aumentou muito o interesse em se estudar os pterocarpanos foi o fato desse grupo de substâncias apresentarem diferentes tipos de atividades biológicas, sendo algumas já testadas em estudos *in vitro* e *in vivo* (Muruges *et al.*, 1996). Além disso, esses compostos apresentam importantes atividades antifúngicas, antibacterianas, atividade inseticida e antitumoral (Jiménez-González *et al.*, 2008). Estudos apontam outras atividades biológicas interessantes tais como: atividade anti-ofídica (Nakagawa; Nakanishi, 1982), propriedades anti-HIV (Engler *et al.*, 1993), atividades contra protozoários do gênero *Leishmania* spp e *Trypanosoma* spp. (Salem; Werbovetz, 2006; Vieira *et al.*, 2008), entre outras.

Com maior relevância para este trabalho aqui desenvolvido, os compostos do grupo dos pterocarpanos atuam, em sua grande maioria, como citotóxicos em várias linhagens de células tumorais. Um exemplo é o composto (\pm)-3,4-diidroxi-8,9-metilenodioxipterocarpano, o qual foi sintetizado por NETTO e colaboradores, 2009. Essa molécula apresentou atividade citotóxica contra cinco linhagens diferentes de células de leucemia, incluindo algumas já resistentes aos fármacos atualmente utilizados. Merece destaque o fato que células resistentes a muitos fármacos representam a maior causa de falha nos tratamentos de quimioterapia da atualidade (Netto *et al.*, 2009). Pesquisas seminais realizadas em exemplos importantes de pterocarpanos, com atividade citotóxica contra células tumorais,

¹Substâncias com atividade antimicrobiana produzidos por plantas em resposta a um fator de estresse, tal como um fungo ou invasão bacteriana, ou a influência de agentes externos abióticos, sais de metais pesados ou a radiação UV.

mostraram efeitos em modelos de linhagem de células do câncer de mama (Nguyen *et al.*, 2009), cólon, pulmão e de cérvix (Liet *et al.*, 2008a); câncer de pâncreas (Awale *et al.*, 2008); carcinoma cervical humano (LI *et al.*, 2008b), e de fígado (Wätjen *et al.*, 2007).

Recentes trabalhos sobre a atividade citotóxica e possível mecanismo de ação do composto isolado de *Platymiscium floribundum*, PTC, foram realizados em linhagens tumorais, incluindo leucemia, câncer de mama e melanoma (Militão *et al.*, 2006; Militão *et al.*, 2007a; Militão *et al.*, 2007b; Militão *et al.*, 2014). Nesses estudos, a molécula PTC foi testada contra a linhagem leucêmica HL-60 e mostrou redução do número de células viáveis em 42,6%, na concentração de 2,5 µg/mL, além da parada do ciclo celular em G2/M e ativação de caspase 3. A morfologia das células, observadas em lâminas coradas com hematoxilina/eosina, refletia um padrão apoptótico de morte celular (Militão *et al.*, 2006). Em estudos posteriores, especialmente ensaios sobre o mecanismo de ação utilizando a linhagem celular MCF-7 (carcinoma de mama), foi observado que essa droga causa parada o ciclo celular na prometáfase, inibindo o fuso mitótico e impedindo a separação das cromátides. Essa longa parada do ciclo leva a célula a entrar em apoptose (Militão *et al.*, 2014).

Considerando a relevância dos dados obtidos e o potencial da molécula de pterocarpano descrita acima nos trabalhos citados, o PTC, obtido por meio de uma rota sintética inédita, motivo de um registro de patente², foi caracterizado quanto aos efeitos farmacológicos neste trabalho, confirmando os resultados já publicados por Militão e colaboradores (2006, 2007a, 2007b e 2014). Isso abre novas perspectivas no desenvolvimento de potenciais drogas anti-câncer para este grupo particular de substâncias bioativas.

²Depósito de patente junto ao Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI), pela UFC sob número 221105718268, realizado no dia 30/06/2011, e no PCT BRPI1103116 (A2) — 2013-07-23, intitulado: “Processo de produção de pterocarpanos composição citomoduladora compreendendo pterocarpanos, e uso dos pterocarpanos”. E depositada no PCT WO2013000054 (A1) — 2013-01-03 METHOD FOR PRODUCING PTEROCARPANS, CYTOMODULATING COMPOSITION CONTAINING PTEROCARPANS, AND USE OF PTEROCARPANS, tendo com aplicantes a Universidade Federal do Ceará, Australian University e Instituto Fraunhofer.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Caracterizar o efeito antiproliferativo do PTC (+), *in vitro*, em linhagens tumorais de próstata utilizando plataformas e ensaios farmacológicos, de biologia celular e proteômicos.

2.2 Objetivos Específicos

- a) Avaliar a atividade citotóxica em linhagens tumorais de próstata e determinar IC_{50} ;
- b) Caracterizar os efeitos fenotípicos no tratamento com o PTC (+) por meio de marcações em microscopia confocal;
- c) Observar a relação existente entre a biologia celular e molecular das células tumorais ao(s) putativo(s) mecanismo(s) de ação do PTC (+);
- d) Identificar o mapa de expressão diferencial dos perfis protéicos no tratamento com PTC (+);
- e) Caracterizar funcionalmente as interações proteína-proteína e potenciais vias de atuação dessas proteínas com o provável mecanismo de ação;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais e reagentes utilizados

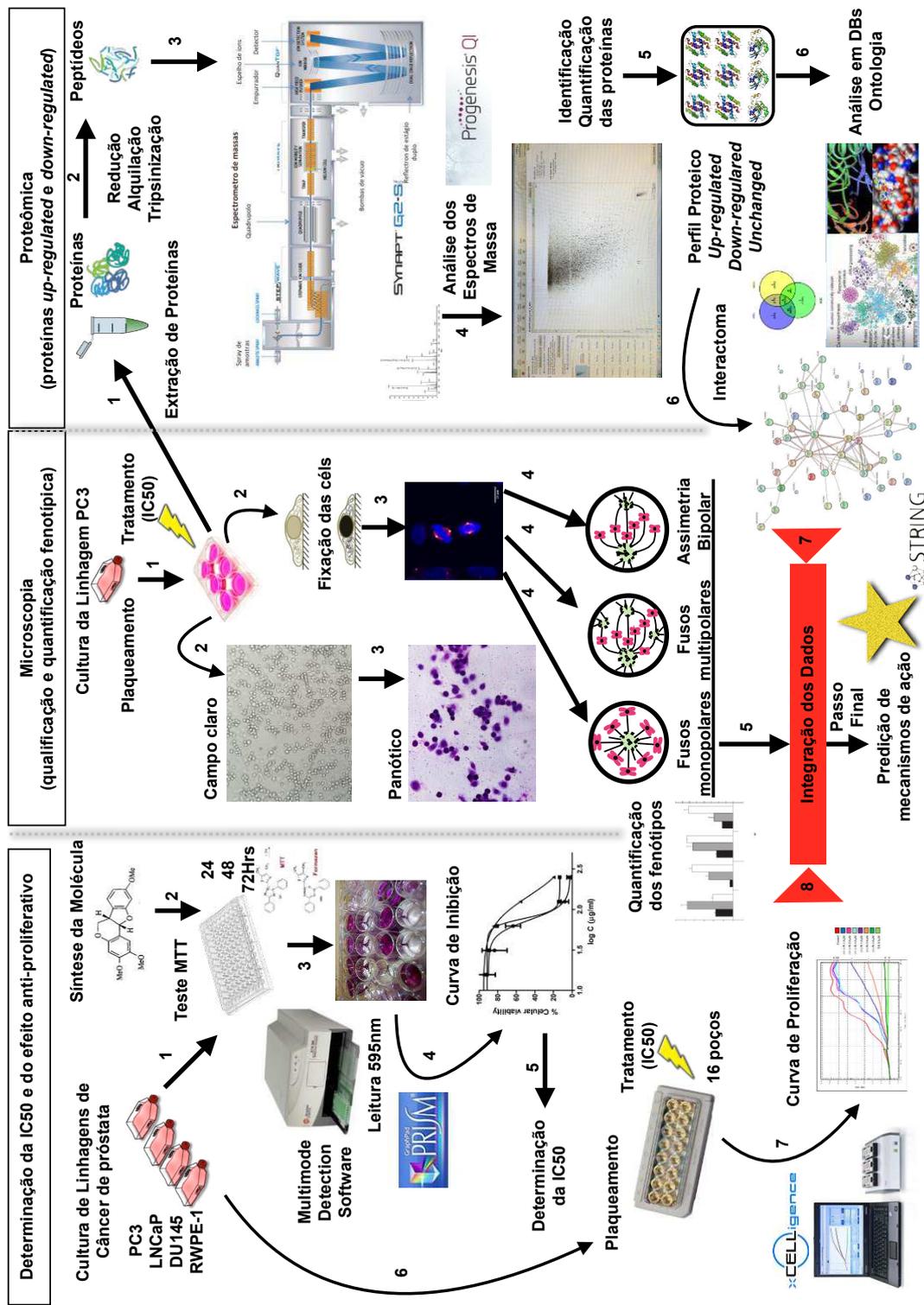
A descrição detalhada dos equipamentos, dos materiais e dos reagentes estão dispostos no ANEXO 1.

3.2 Desenho experimental

Levando-se em consideração às atividades citotóxicas já descritas (MEIRA, 2016) dos compostos acima mencionados e, utilizando o ensaio de MTT, o composto escolhido foi (+)-2,3,9-trimetoxipterocarpano. Para isso, diferentes técnicas foram utilizadas para determinar as principais atividades do PTC (+) nos fenótipos celulares e nos perfis proteicos gerados sob o tratamento linhagens de câncer de próstata. O composto acima mencionado foi utilizado nas linhagens PC3, LNCaP, DU-145, RWPE-1 nessa tese. As demais técnicas de biologia celular e proteômica foram realizadas em linhagem de PC3 somente, uma vez que esta é independente de hormônio e considerada com características, alto poder de invasividade, e comportamento tumoral similar ao que ocorre nos tumores em humanos após ao tratamento de deprivação hormonal. Todas as etapas (Figura 9) consistiram basicamente em três fases:

- a) Determinação da IC₅₀ e ensaios anti-proliferativos
 - a. Cultivo celular, ensaio MTT, XCelligence (curva de proliferação);
- b) 2) Microscopia (qualificação e quantificação fenotípica)
 - a. Análise celular por microscopia confocal, campo claro e coloração por panótico;
- c) 3) Análise Proteômica
 - a. Extração e preparação das proteínas para a análise por espectrometria de massas (*shotgun*), com identificação das proteínas diferencialmente expressas, bem como análises *in silico* para dados em ontologia e interação proteína-proteína.

Figura 9 – Delineamento experimental contendo as principais etapas metodológicas utilizadas neste trabalho. Cada passo é enumerado (número em setas)

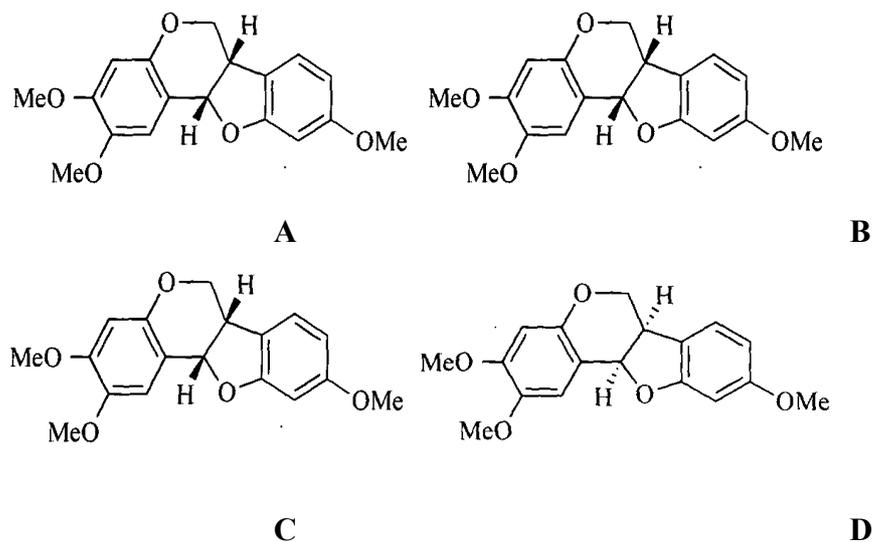


Fonte: elaborado pelo autor

3.3 Obtenção da amostra

As moléculas de pterocarpano – (+/-)-2,3,9-trimetoxipterocarpano PTC (+/-) (Figura 10 B), (+)-2,3,9-trimetoxipterocarpano PTC (+) (Figura 10 C) e (-)-2,3,9-trimetoxipterocarpano PTC (-) (Figura 10 D) foram sintetizadas pela equipe do Prof. Dr. Martin Banwell, da *Australian National University* (ANU), tomando como base o composto, 2,3,9-trimetoxipterocarpano (Figura 10 A), isolado de *Platymiscium floribundum*, pela equipe do Prof. Dr. Ediberto Rocha Silveira do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará. O método de extração e a síntese, bem como a atividade biológica investigada, foram patenteados e o número do depósito é PI 1103116-6.

Figura 10 –Estruturas dos pterocarpanos



(A) PTC isolado de *Platymiscium floribundum*; (B) Composto rancêmico sintetizado, (+/-)-PTC; (C) (+)-PTC molécula dextrógiro isolada (molécula utilizada para os testes nesta tese); (D) (-)-PTC componente levógiro isolado

Fonte: elaborado pelo autor

3.4 Cultivo e manutenção das linhagens celulares

As linhagens utilizadas nesse trabalho foram cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (*United States - National Cancer Institute*, US-NCI), ou obtidas através do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). A linhagem epitelial prostática humana não tumoral RWPE-1 foi obtida da ATCC® CRL-11609™. As linhagens celulares foram manuseadas em ambiente estéril de câmara de fluxo laminar vertical (VECO, modelo Biosafe

12, classe II) e mantidas em incubadora de CO₂ a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ (NUAIRE, modelo TS Autoflow).

As linhagens tumorais foram cultivadas em garrafas de cultura de células de 25 cm² com volume de 50 mL, ou de 75 cm² com volume de 250 mL em meio. Para as linhagens de DU145 e LNCaP, o cultivo foi realizado em meio RPMI 1640 (Gibco) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) e 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina). Para o cultivo da linhagem PC3, o meio F12K foi suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) e 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina). Finalmente, para a linhagem RWPE-1, foi utilizado meio de queratinócito livre de soro (*Keratinocyte Serum Free Medium* - K-SFM), suplementado com extrato pituitário bovino (*bovine pituitary extract* - BPE) e fator de crescimento epidérmico recombinante humano (*human recombinant epidermal growth factor* - EGF) (Life Technologies). A manutenção foi feita antes que as células atingissem total confluência, na presença de espaço entre elas, a fim de mantê-las na fase log de crescimento, o qual foi acompanhado diariamente por microscópio invertido (ZEISS, modelo Axiovert 40C).

Para a manutenção de células aderidas, o meio foi retirado e a garrafa foi lavada 2x com PBS (*Phosphate Buffer Solution*) estéril. Em seguida, foi adicionada tripsina-EDTA 0,5% ou 0,05% de tripsina – 0,53 mM EDTA (Gibco) diluído 10X em solução tampão PBS, a fim de suspender as células. Depois de suspensas, a ação da tripsina foi inibida pela adição de meio suplementado com SBF. Parte das células foi removida da garrafa e o volume foi preenchido com meio novo.

3.5 Avaliação da atividade antiproliferativa *in vitro* – ensaio de MTT

O ensaio do MTT é um método colorimétrico que tem como objetivo quantificar a atividade mitocondrial por meio da redução do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenilbrometo de tetrazólico (MTT) solúvel em água, de cor amarela, resultando na formação de cristais insolúveis de formazan, de cor púrpura, em células metabolicamente ativas. Os metabólitos primários envolvidos no ciclo de Krebs, NADH₂, NADPH e Succinato são os principais envolvidos nesta reação, em que a atividade metabólica é dependente do número de células viáveis e está diretamente relacionada com a quantidade de MTT metabolizada, sendo a quantificação realizada por absorvância em espectrofotômetro (Mosmann, 1983).

As células foram incubadas em placas de 96 poços, sendo a concentração de plaquemanto determinada de acordo com o que é preconizado pelo *National Institutes of Health*

(NIH). As linhagens testadas são descritas na Tabela 1. Após 24 horas de incubação em estufa a 37°C e 5% de CO₂, 100 µL de amostras testes (1 mg/ml; 10 mg/mL; 50 mg/mL) foram diluídos em meio completo, adicionados em novas placas e novamente incubados por 24, 48 e 72 horas em estufa sob condições de cultivo padrão. As placas foram centrifugadas a 1.500 rpm por 5 minutos e, em seguida, o sobrenadante foi retirado. Foi adicionado em cada poço 150 µL de solução de MTT (0,5 mg/mL), diluído em meio de cultura correspondente a cada linhagem, e as placas colocadas na incubadora por 3 horas. Após o período de incubação, as placas foram novamente centrifugadas a 3.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante retirado. Para realização da leitura em espectrofotômetro de placa (Beckman Coulter Inc., modelo DTX-880) com absorvância de 595 nm, o formazan foi ressuspensão em 150 µL de Dimetilsulfóxido (DMSO) adicionado em cada poço. Para leitura foi utilizado o programa *Multimode Detection Software* (Beckman Coulter Inc.).

Tabela 1 – Linhagens utilizadas com suas respectivas origens e concentrações de plaqueamento

Linhagem Celular	Doença	Organismo	Concentração de Plaqueamento (cél./mL)
PC3	Adenocarcinoma de Próstata	Humano	1,0 x 10 ⁵
LNCaP	Adenocarcinoma de Próstata	Humano	1,0 x 10 ⁵
DU-145	Adenocarcinoma de Próstata	Humano	1,0 x 10 ⁵
RWPE-1	Céls. epiteliais não-malignas da Próstata	Humano	2,5 x 10 ⁵

Fonte: elaborado pelo autor

Para a análise dos dados, foi utilizado o programa GraphPad Prism versão 6.0. Os valores das absorvâncias, resultantes dos testes das frações em concentração única, foram transformados em porcentagem de inibição, sendo comparado ao controle negativo. Estes dados foram analisados com base na média ± erro padrão da média da triplicata de no mínimo três experimentos. Quando testadas em diluição seriada, foi feita a determinação da concentração inibitória média (CI₅₀) com os respectivos intervalos de confiança (IC 95%), obtidos por regressão não linear.

3.6 Análise morfológica – Coloração diferencial por Panótico rápido

Para uma investigação e sugestão de alterações celulares causadas pela substância testada, foram analisados padrões morfológicos das células após serem coradas com o kit panótico rápido (Laborclin®). Essa coloração permite a visualização de características morfológicas por meio da marcação diferenciada do citoplasma e do núcleo.

A marcação baseia-se na capacidade que um dos corantes tem de marcar o núcleo em cor azulada devido ao seu caráter alcalino. Já ao citoplasma é conferida uma cor avermelhada devido ao caráter ácido do segundo corante presente no kit.

Procedimento Experimental

As células PC3 foram plaqueadas em lamínulas circulares de 13 mm em placas de 48 poços na concentração de 40.000 células/mL e incubadas por 24h e 48h com PTC (+), Monastrol, Taxol e Nocodazol nas concentrações de 7,95 μ M, 50 μ M (MEIRA, 2016), 0,1 μ M (Dong *et al.*, 2013) e 0,25 μ M (Choi; Zhu, 2012), respectivamente. A doxorubicina foi utilizada como controle do experimento na concentração de 0,22 μ M, e o controle negativo foi tratado apenas com o veículo (DMSO). Decorrido o período de incubação, o meio de cultivo foi removido e as células lavadas com PBS estéril. Em seguida, as lamínulas foram fixadas com solução de triarilmetano a 0,1%, coradas com solução a 0,1% de xantenos e com solução de 0,1% de tiazinas (Laborclin®). O tempo de imersão em cada solução foi de aproximadamente 30 segundos. As lâminas foram lavadas com água destilada para remover o excesso de corante. Depois de secas, a montagem se deu com Entellan®.

Análise de Dados

A análise morfológica do núcleo e do citoplasma celular ocorreu com o auxílio de um microscópio óptico (ZEISS) com aumento de 200X. O registro das alterações foi feito por fotografia (AxioVert). As imagens escolhidas para exposição representavam o que se mostrava mais constante nas lâminas.

3.7 Monitoramento dinâmico da proliferação e viabilidade celular em tempo real- *XCelligence System*

O uso de ensaios *in vitro* com células é crucial para o entendimento da eficácia, especificidade, permeabilidade, solubilidade, estabilidade e mecanismo de ação da interação entre uma substância e seus alvos celulares, porém, a maioria desses ensaios apresentam várias limitações. Entre elas estão passos que envolvam a lise ou fixação celular, levando a uma possível diminuição do controle da viabilidade celular antes e depois do tratamento. Outro fator importante é que alguns desses ensaios podem prover uma informação limitada sobre o mecanismo de interação do fármaco com seus alvos celulares.

O *XCELLigence System RTCA DP (Dual Plate)* permite uma monitoração dinâmica e livre da proliferação e viabilidade celular em tempo real. Esse equipamento é capaz de quantificar a proliferação e viabilidade de células aderidas em tempo real utilizando um sistema eletrônico de leitura, denominado impedância. As células são plaqueadas em placas de 16 poços que contêm sensores microeletrônicos. A interação das células com esses biosensores eletrônicos geram uma resposta de impedância que não apenas indica o status de viabilidade celular como também correlaciona com o número de células no poço.

A medição da impedância não é um processo invasivo, fazendo com que as células permaneçam em seu mais normal estado fisiológico durante o ensaio de proliferação e citotoxicidade. Resumidamente, a técnica permite a avaliação da proliferação, viabilidade, morte e mudanças morfológicas nas células.

Procedimento experimental

Seguindo as sugestões do fabricante, foi realizada uma curva de concentração de células para a escolha do número de células ideal para o experimento com *XCELLigence System RTCA DP (Dual Plate)*. Para tal, as células PC3 foram plaqueadas nas *E-plates* de 16 poços em concentrações que variaram de 4×10^5 a $0,625 \times 10^5$ células/mL. A aderência, a disposição e proliferação das células foram monitoradas a cada 30 minutos utilizando o *RT-DP system*. A proliferação celular foi monitorada desde a adição dos compostos até 78 horas. Após o final dessa etapa, o número de células por poço foi escolhido baseado no Index celular máximo encontrado, chegando a concentração ótima de 5.000 células/poço.

O número de células/poço selecionado foi plaqueado em 190 µL de meio na placa. A aderência, disposição e proliferação das células foi monitorada a cada 30 minutos pelo sistema RT-DP. Aproximadamente 24 horas depois do plaqueamento, quando as células estavam em sua fase de crescimento logarítmica, as células foram tratadas com 10 µL dos compostos dissolvidos em meio de cultura. As células do controle foram tratadas com DMSO, o qual serviu de veículo para a substância. A concentração final de DMSO não excedeu 0,2% em nenhum tratamento, mas para o Monastrol, houve um discreto excesso de DMSO devido à alta concentração de droga administrada (50 µM). O Monastrol (50 µM), o Taxol (0,1 µM) e o Nocodazol (0,25 µM) foram utilizados como controles positivos. A concentração do PTC (+) foi de 7,95 µM.

Análise de dados

O resultado de impedância celular foi expresso como uma unidade arbitrária chamada de Índice Celular (do inglês, *Cell Index*). O índice celular de cada ponto foi definido como $(R_n - R_b) / 15$, onde R_n é a impedância do poço com célula e R_b é a impedância do poço apenas com o meio. As curvas de crescimento foram comparadas para uma possível elucidação do mecanismo de citotoxicidade.

3.8 Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo é uma ferramenta que possibilita um meio de mensuração de atributos físicos e químicos das células de forma rápida e com alta acurácia. Trata-se de um experimento utilizado comumente para a análise de ciclo celular, através da mensuração do conteúdo de DNA; integridade de membrana, além da medição de outras marcações com fluorocromos específicos (Darzynkiewicz; Zhao, 2014).

O princípio básico da citometria resume-se à passagem individual de células que são conduzidas em um canal de corrente fluída e na utilização de uma radiação laser direcionada. O feixe de luz produzido pelo laser excita substâncias fluorescentes (fluorocromos) presentes nas células, emitindo uma luz que possui um comprimento de onda característico. Os sistemas ópticos e eletrônicos coletam essa luz excitada e as converte em parâmetros de dispersão de luz e fluorescência emitida. Dentre os parâmetros estão o *Forward Scatter* (FSC) captado pelo detector frontal ao feixe, responsável pela mensuração do tamanho

relativo da célula, e o *Side Scatter* (SSC) captado pelos espelhos laterais, responsável por medir a granulosidade e complexidade celular. Quando analisados conjuntamente esses parâmetros levam a uma idéia da morfologia celular. Além disso, a detecção da fluorescência emitida pelos diversos marcadores classifica cada célula como um evento (Shapiro, 2003; Ferraz, 2000; Bacal; Faulhaber, 2003).

Procedimento experimental

Para os experimentos realizados no citômetro de fluxo, as células PC3 foram plaqueadas em placas de 24 poços na concentração de 1×10^5 células/mL. O tratamento do PTC (+) foi de 7,95 μM . O Nocodazol (0,25 μM) foi utilizado como controle positivo a fim de evidenciar a parada do ciclo em G2/M. Todos os tratamentos duraram 24 horas. As células do controle negativo receberam a mesma concentração do veículo que a maior concentração da substância testada. Após transcorridas 24h de tratamento, as células foram transferidas para tubos eppendorfs e centrifugadas a 2.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante resultante foi descartado e o pellet foi ressuspendido em 1 mL de PBS.

As células foram analisadas utilizando o citômetro BD FACSVerse[®]. Para todos os parâmetros avaliados, um total de 10.000 eventos foram levados em consideração por cada replicata de cada amostra. Os debris foram omitidos das análises. Cada experimento foi realizado por pelo menos duas vezes em triplicata.

Análise dos dados

Os dados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (E.P.M). Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por teste de Tukey, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

3.9 Microscopia confocal

A microscopia confocal utiliza fluorescência para aquisição das imagens. A imagem criada por um microscópio confocal tem um maior contraste e resolução que a de um microscópio óptico convencional, devido à exclusão da luz emitida por outros pontos que não estão no plano focal. Esse tipo de microscópio apresenta um conjunto de lentes capazes de focar

um cone de luz em uma profundidade predeterminada da amostra a ser estudada. Mudando-se o ponto focal e, mantida a profundidade, é possível iluminar todo o plano em estudo, ponto a ponto e, assim, construir imagens tridimensionais (Samwogerere; Weeks, 2005; Metz, 2004).

O princípio de fluorescência é baseado no uso de compostos químicos chamados de fluoróforos. Os fluoróforos geralmente são específicos e são utilizados com o intuito de localizar uma área predeterminada da amostra (como uma proteína, por exemplo) ou para responder a um estímulo específico. A fluorescência acontece por um fenômeno onde os elétrons do fluoróforo absorvem os fótons de energia provindos da fonte do microscópio, que por sua vez capta o fóton emitido pelo elétron ativado e com ele gera uma imagem (metz, 2004).

Procedimento experimental

As células PC3 foram cultivadas em lamínulas em 6 poços após incubação a 37°C durante 24 horas e tratadas com PTC (+) com 2,5 µM e 7,95 µM. Para os controles positivos, o monastrol (50 µM) e nocodazol (0,25 µM). Para a imunofluorescência, as células foram fixadas em metanol a 100% durante 30 minutos a -20°C e depois permeabilizadas bloqueadas durante 30 minutos em tampão de bloqueio contendo 2% de albumina de soro bovino, 0,1% de Triton X-100 (Sigma-Aldrich) em PBS ou fixadas e permeabilizado em solução de formaldeído a 3,7% (Sigma-Aldrich, F1635) contendo 0,2% de Triton X-100 em solução salina tamponada com fosfato (PBS) 1x à temperatura ambiente durante 20 min. Para a fixação do formaldeído, as amostras foram mergulhadas em solução com 7,5 mg/mL de glicina, logo após, o processo de reidratação com PBS à temperatura ambiente durante 5 min. e bloqueadas em tampão de bloqueio contendo BSA a 3%, Triton X-100 a 0,5%, em PBS1x à temperatura ambiente durante 30 min. As células foram incubadas durante 1 h à temperatura ambiente com anticorpos primários diluídos em tampão de bloqueio: TUB*Brabbit* (abcam - ab15568, diluição 1:500); TUB*Arabbit* (Santa Cruz - sc-8035; diluição 1:500); AUR*A*mouse (abcam - ab13824, diluição 1:200); PCNT (abcam - ab28144, diluição 1:250); CNTROB*mouse* (abcam - ab 70448, diluição 1:200); TUBG*goat* (Santa Cruz - sc-7396 1:500 diluição); Eg5*mouse* (Santa Cruz - sc-365681, diluição 1:200); Lamin *Arabbit* (Santa Cruz - sc-20680, diluição 1:500).

Os anticorpos primários foram removidos por lavagem com PBST-AT e revelados usando anticorpos secundários relacionados aos anticorpos secundários diluídos em PBS-AT: *anti-mouse chicken* Alexa Fluor 488 (A21200); *chicken anti-goat* Alexa Fluor 488 (A21467); *donkey anti-rabbit* Alexa Fluor 546 (A10040); *chicken anti-mouse* Alexa Fluor 647 (A21463);

*donkey anti-goat*Alexa Fluor 546 (A11056); *chicken anti-rabbit* Alexa Fluor 488 (A21441) (todos da Life Technologies) foram incubados durante 40 min. As células foram coradas com Hoescht 33258 para visualizar núcleos e marcação para actina - *FITC-phalloidin* (Sigma). Depois de lavar em PBS 1x, as células foram mantidas em meios de montagem ProLong Gold (Life Technologies) e seguidas para a microscopia confocal.

Análises das imagens

A partir das lamínulas, uma série de imagens em *Z-stack* de células interfásicas/prófase/prometáfase/metáfase foram capturadas a partir de secções de 0,7 μm de espessura utilizando o microscópio confocal Carl Zeiss LSM 780, equipado com objetiva Plan-Apochromat 100x/1,40 Oil DIC M27. Os valores de P foram gerados por teste t não pareado utilizando Prism 6 (GraphPad). * P <0,05 foi considerado como estatisticamente significativo.

Ainda para a análise das imagens, o programa de processamento de imagem Java de código aberto inspirado pelo *NIH Image* foi utilizado. O ImageJ FIJI tem uma base de usuários forte e bem estabelecida, com milhares de *plug-ins* para executar uma grande variedade de tarefas (Schindelin, 2012); no contexto deste trabalho, o *software* foi essencial no aprimoramento de imagens, visualizações, cálculo de áreas e de volumes de subunidades estruturais celulares importantes para elucidação de potenciais alterações na atividade anti-tumoral contidas nesta tese.

3.10 Ensaios proteômicos

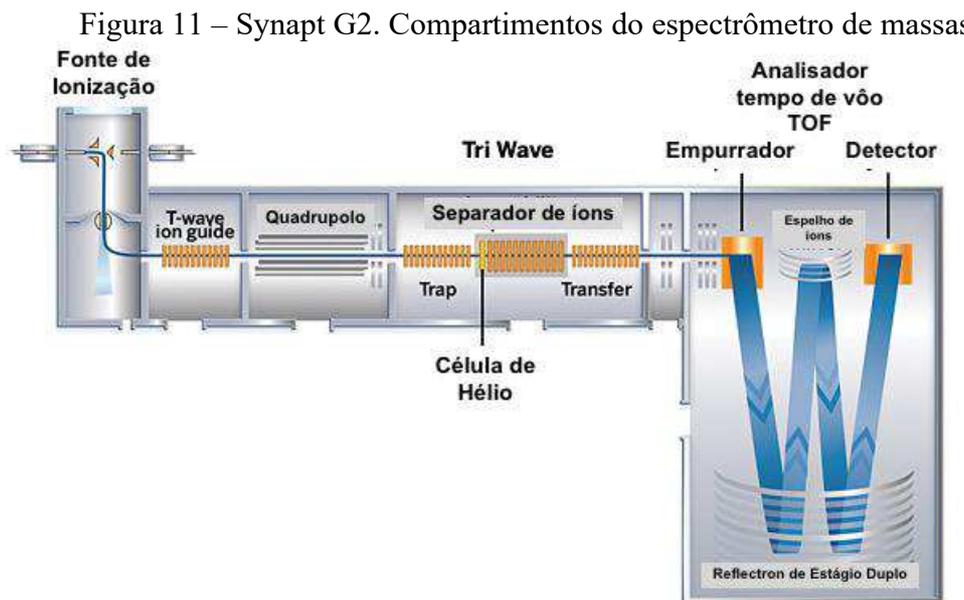
3.10.1 Tratamentos das células

Com base nos resultados de MTT ($\text{IC}_{50} = 7,95 \mu\text{M}$), as células foram tratadas em dois tempos diferentes (24h e 48h). Os grupos controle receberam apenas meios sem qualquer tratamento. Após o tratamento, as células receberam tripsina-EDTA 0,5% ou 0,05% de tripsina – 0,53 mM EDTA (Gibco) diluída 10X em solução tampão PBS, durante 10 min., e os lisados transferidos para tubos cônicos de 15 mL. Adicionou-se o tampão de lise (uréia 8M, NaCl 75 mM, Tris 50 mM, pH 8,2) e um comprimido de inibidor de coquetel de protease (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, EUA) por 25 mL de tampão (VILLÉN; GYGI, 2008). As células foram submetidas a ultra-sons 3 x 60s a 4°C com 2 min. de repouso. Em seguida, as células

foram centrifugadas a 2.500 g durante 10 min a 4°C para eliminar restos celulares e o sobrenadante foi transferido para novos tubos. A concentração de proteína foi medida através do sistema Qubit®.

3.10.2 Espectrometria de Massas

O espectrômetro de massas (MS) usado para os ensaios proteômicos foi o Synapt G2 Si (Waters Corp., Milford, EUA), figura 11, equipado com uma fonte de ionização do tipo eletrospray (*electrospray ionization* - ESI). O Synapt é um aparelho do tipo Q-TOF, ou seja, possui dois tipos de analisadores híbridos, um quadrupolo (Q) seguido de um analisador do tipo tempo de voo (*time of flight* - TOF). Esse MS também possui uma cela de mobilidade iônica (IM) do tipo *travelling wave ion mobility* - TWIM.



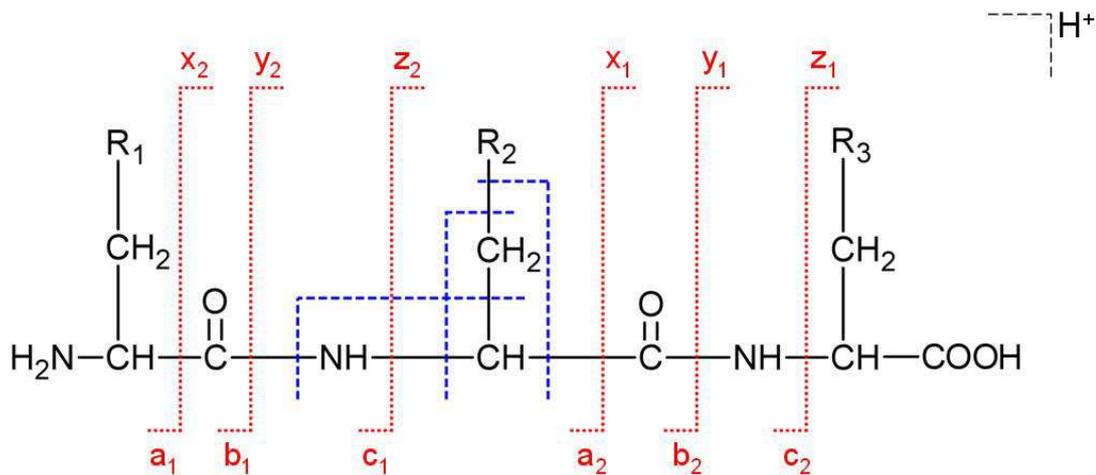
Fonte: Waters Corporation

Com esse equipamento foi possível realizar os experimentos do tipo análise independente de dados (*data-independent analysis*-DIA), o qual consiste em espectrometria de massas de forma sequencial (MSe, ou tandem MS), envolvendo a fragmentação dos peptídeos e, logo em seguida, de posterior análise de sua sequência de aminoácidos. O processo de fragmentação mais utilizado é MSe, sendo esta uma técnica de dissociação induzida por colisão (*collision induced dissociation*-CID); acontece quando os peptídeos são selecionados no primeiro analisador, nesse caso o quadrupolo, e acelerados em uma região do espectrômetro de

massas com um gás inerte (hélio, argônio ou nitrogênio), o que leva colisão entre os íons e as moléculas desse gás, fazendo com que a energia dessa colisão seja transferida para as ligações presentes nos íons, os quais são fragmentados (Levin *et al.*, 2011).

Essas fragmentações podem ser classificadas em tipos específicos: 1) se a carga no íon se concentrar no N-terminal, a fragmentação pode ser dos tipos a, b e c, dependendo em que ligação ocorre a fragmentação desse íon, 2) se a carga do íon se encontra na região do C-terminal, é classificada como x,y e z, também dependendo do local de fragmentação, sendo os pares de fragmentação x/a, y/z e c/z. Os locais de fragmentação e o tipo de classificação podem ser visualizados na figura 12. Como a ligação peptídica é a ligação mais lábil nessas moléculas, espera-se que haja uma maior formação do par de fragmentos do tipo –b/-y em procedimentos do tipo CID (Roepstorff; Fohlman, 1984).

Figura 12 –Esquema dos tipos de fragmentação por dissociação induzida por colisão (CID)



Fonte: Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Naturwissenschaftliche Fakultät I – Biowissenschaften. (<http://pharmtech.pharmazie.uni-halle.de/english/ag-biopharm/elastin-methoden.htm>)

Para a análise, foram considerados os seguintes parâmetros: mínimo de 4 peptídeos contados para cada proteína; *confidence score* < 3; *p value* < 0,05; *Infinity & Fold change* < 2 e taxa de falso descoberta (FDR) inferior a 1%. Para critérios de super-expressão, sub-expressão e não diferencialmente expressas, o valor para FoldLog2 baseou-se da seguinte maneira: proteínas superexpressas (*up-regulated*) valor de FoldLog2 > 1; proteínas subexpressas (*down-regulated*) valor de FoldLog2 < -1 e proteínas sem expressão diferencial (*unchanged*) valor de FoldLog2 no intervalo -1 < FoldLog2 < 1.

3.10.3 Preparação das amostras proteicas

As amostras controle foram constituídas por células não tratadas com o composto (PTC), mas somente com o veículo DMSO. Na condição de tratado: PTC (+) com 7,95 μM . Para os controles positivos, o monastrol (50 μM) e nocodazol (0,25 μM). Essas amostras foram preparadas e analisadas em paralelo com as amostras de células tratadas. A troca de tampão em bicarbonato de amônio 50 mM foi realizada utilizando colunas de rotação (Millipore, EUA) com um *cutt-off* de 5 kDa a fim de quebrar as ligações dissulfureto das proteínas. As amostras foram reduzidas usando ditioneitol 100 mM (Sigma, UK) durante 30 minutos a 60°C. As amostras, ainda, foram alquiladas com iodo-acetamida 200 mM (Sigma), no escuro, à temperatura ambiente, durante 30 min. As proteínas foram digeridas enzimaticamente utilizando tripsina porcina (Promega, EUA) na proporção de 1:50 (p/p tripsina/proteína) durante 17h a 37°C. As reações foram interrompidas por adição de HCl 8,8M (proporção = 1:60) para cada amostra e as amostras foram armazenadas a -80°C. Os peptídeos extraídos foram ressuspensos em solução aquosa de ácido fórmico (FA) a 0,1%. O perfil LC-MS^E foi realizado no modo de expressão utilizando um espectrômetro de massa Waters quadripolo de tempo de voo (QToF) Premier (Waters, UK), como descrito anteriormente (Levin *et al.*, 2010).

3.10.4 Identificação e quantificação por LC-MS/MS

Análises proteômicas qualitativas e quantitativas foram realizadas em uma plataforma bidimensional *nanoUPLC tandem nanoESI-MSE* por experimentos multiplexados de aquisição independente de dados (*data-independent acquisitions* -DIA). Os peptídeos (1 μg) foram injetados em um Sistema *2D-RP/RP Acquity UPLC M-Class* (Waters Corporation, Milford, MA) acoplado a um espectrômetro de massa Synapt G2-Si (Waters Corporation, Milford, MA). As amostras foram fracionadas em cromatografia de primeira dimensão com uma Coluna *XBridge Peptide BEH C18 NanoEase* (130 Å, 3,5 μm , 300 μm X 50 mm, Waters Corporation, Milford, MA). As eluições dos peptídeos foram realizadas utilizando passos descontínuos de acetonitrila (11%, 14%, 17%, 20% e 50% de acetonitrila) durante 10 minutos, a uma taxa de 2.000 nL/min. Após cada passo, os peptídios carregados eletricamente foram separados na segunda dimensão numa coluna de *nanoACQUIDADE ACQUITY UPLC HSS T3* (100 , 1,8 μm , 75 μm X 150 mm, Waters Corporation, Milford, MA). Para as eluições de

peptídeos foi utilizado um gradiente de acetonitrila de 7% a 40% (v/v) durante 54 minutos a uma taxa de 500 nL/min. diretamente no Synapt G2-Si.

Para cada medição, o espectrômetro de massa foi operado em modo de resolução com um poder de resolução m/z de cerca de 35.000 FWHM, utilizando mobilidade iônica com uma potência de resolução de secção transversal de pelo menos $40\Omega/\Delta\Omega$. A resolução eficaz obtida com a mobilidade iônica conjunta foi de 1.800.000 FWHM. As análises de MS/MS foram realizadas por ionização por nano-eletropulverização em modo de íon positivo nanoESI (+) e uma fonte de ionização NanoLock Spray (Waters, Manchester, UK). O canal de massa de bloqueio foi testado a cada 30 segundos. O espectrômetro de massa foi calibrado com um espectro MS/MS de solução humana de [Glu1]-Fibrinopeptídeo B (Glu-Fib) que foi fornecida através do pulverizador de referência da fonte *NanoLock Spray*.

3.10.5 Análises In Silico – biologia de sistemas (Banco de Dados, Ontologia e Interação proteína-proteína)

As proteínas foram identificadas e os dados quantitativos foram processados utilizando algoritmos dedicados e pesquisando contra a base de dados proteica humana UniProt/Swiss-Prot/TrEMBL³ (552.884 entradas), com os padrões para contabilidade e quantificação de íons (LI *et al.*, 2009). As bases de dados utilizadas foram invertidas "on the fly" durante as consultas ao banco de dados e anexadas ao banco de dados original para avaliar a taxa de identificação falso-positiva. Para processamento de espectros de forma adequada e respeitado as condições de pesquisa de banco de dados, usamos o pacote de *software* Progenesis® QI versão 4.0 com Apex3D, peptídeo 3D e de contabilidade iônica (Waters) e a avaliação estatística foi realizada com o teste t pareado. Este software carregou os dados de LC-MS, então realizou o alinhamento e a detecção dos picos, criando uma lista de íons peptídicos (peptídeos) os quais foram explorados dentro *Peptide Ion Stats* por métodos estatísticos multivariados. O passo final foi a identidade proteica e a estatística proteica. No passo final foi realizada a identidade e a estatística proteica.

Os seguintes parâmetros foram considerados na identificação de peptídeos: 1) Digestão por tripsina com no máximo uma clivagem perdida; 2) modificações variáveis por

³Banco de dados proteicos que consiste em duas seções, uma o Swiss-Prot, que é manualmente anotado e revisado; e o TrEMBL que é anotado automaticamente e não é revisado (APWEILER *et al.*, 2004).

oxidação (M), fosforilação (STY) e modificação fixa pelo carbamidometilo (C); 3) taxa de descoberta falso (FDR) inferior a 1%; e 4) peptídeos/proteínas (N) iguais a 3 na quantificação de proteínas pelo método de quantificação relativa com HI-N. Identificações que não satisfaziam esses critérios foram rejeitadas.

Para a caracterização ontológica, foi utilizada a plataforma AmiGO 2 (<http://amigo.geneontology.org/amigo>), definido como conjunto de ferramentas baseadas na web para pesquisar e navegar no banco de dados de ontologia gênica (GO), o qual consiste de um vocabulário controlado de termos que cobrem conceitos biológicos, e um grande número de genes ou produtos gênicos cujos atributos foram anotados utilizando termos GO (Carbon *et al.*, 2009). Além disso, foi utilizado o banco de dados PANTHER (*Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships*, <http://pantherdb.org>), versão 11, onde contém informações abrangentes sobre a evolução e função dos genes codificadores de proteínas de 104 genomas completamente sequenciados. As ferramentas de *software* PANTHER permitem classificações de novas sequências de proteínas e análise de listas de genes obtidas em experimentos de genômica/proteômica em larga escala (MI *et al.*, 2016).

As redes de proteínas e vias as canônicas associadas a proteínas diferencialmente expressas foram identificadas pelo STRING, versão 10.0, *European Molecular Biology Laboratory* - EMBL, (<http://string-db.org/>). O STRING é um banco de dados de interações proteína-proteína conhecidas e previstas. As interações incluem associações diretas (físicas) e indiretas (funcionais); elas derivam da previsão computacional, da transferência de conhecimento entre organismos e de interações agregadas de outras bases de dados (primárias). Este programa é baseado em um algoritmo que utiliza informações de conectividade de predições em contexto genômico, de experimentos de laboratório em *high-throughput*, de experimentos de co-expressão e de conhecimento prévio em banco de dados para determinar a rede de interações entre as proteínas diferencialmente expressas e caminhos canônicos em que eles estão envolvidos (Szklarczyk *et al.*, 2014). A base de dados do STRING abrange atualmente 9.643.763 proteínas de 2.031 organismos (janeiro de 2017).

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação da inibição da proliferação pelo MTT

A avaliação da atividade de inibição do crescimento foi realizada contra três linhagens de células tumorais e uma não tumoral de próstata humana através do ensaio de MTT, após 24, 48 e 72 horas de incubação com o composto PTC (+). Os valores em $\mu\text{g/mL}$ e μM estão apresentados na Tabela 2 e os gráficos na Figura 13. O controle negativo recebeu a mesma concentração de veículo (DMSO), utilizado para diluição da amostra, que os tratamentos.

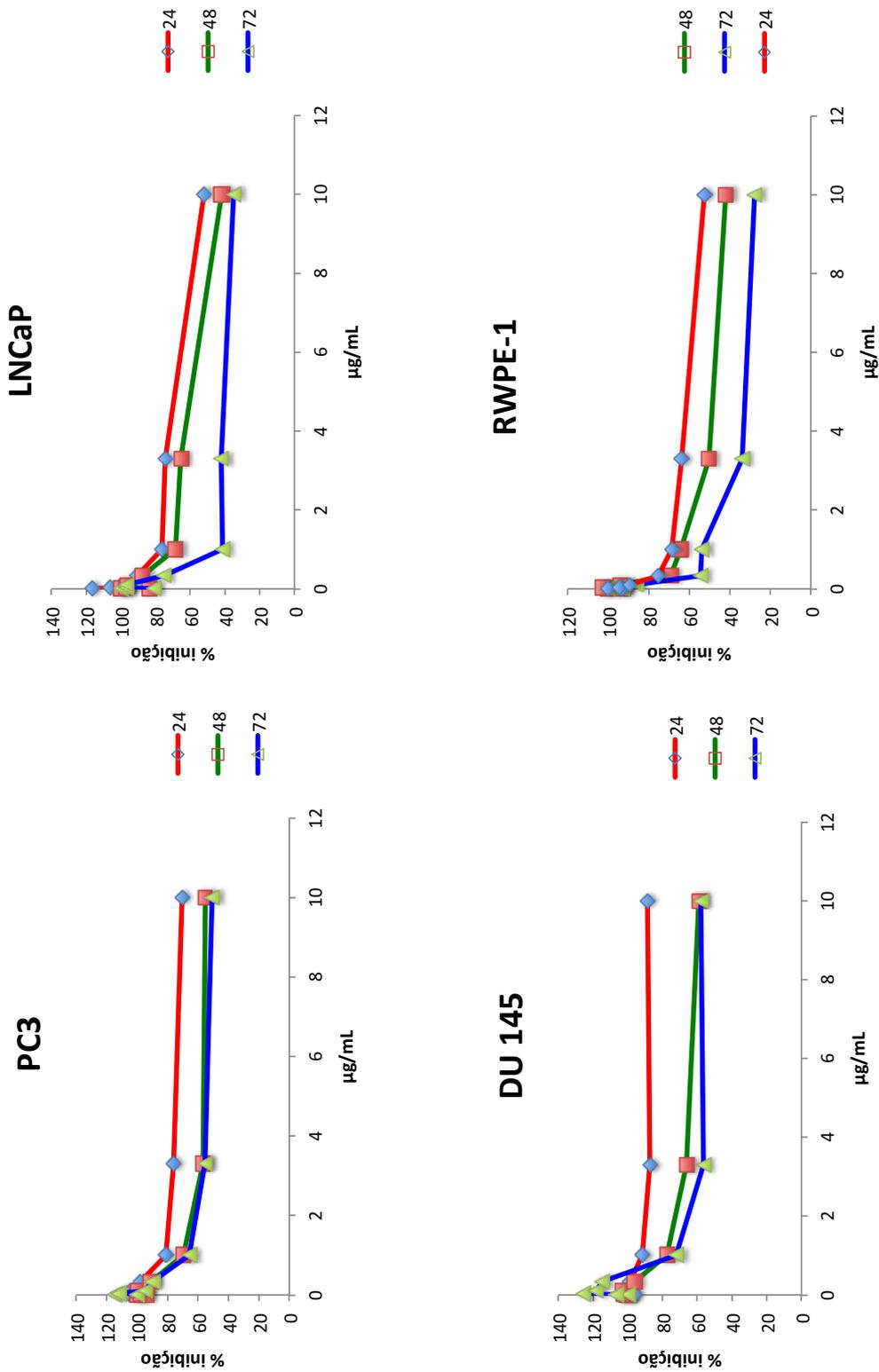
Tabela 2 – Avaliação de inibição da proliferação in vitro do PTC (+) em linhagens tumorais de próstata humana após 24, 48 e 72 horas de incubação^a

Linhagem	Origem	Tempo (h)	PTC(+) IC ₅₀	
			$\mu\text{g/mL}$	μM
PC-3	Adenocarcinoma da Próstata	24	- ^b	> 50
		48	10,9 ± 0,6	34,6
		72	2,5 ± 0,04	8,0
LNCaP	Adenocarcinoma da Próstata	24	12,1 ± 0,6	38,6
		48	6,4 ± 0,4	20,4
		72	1,8 ± 0,3	5,6
DU-145	Adenocarcinoma da Próstata	24	- ^b	> 50
		48	- ^b	> 50
		72	10,2 ± 0,3	32,5
RWPE-1	Céls epiteliais não-malignas da Próstata	24	11,3 ± 0,4	30,0
		48	3,7 ± 0,2	11,8
		72	1,1 ± 0,2	3,6

^aOs dados estão apresentados em valores de IC₅₀ (concentração capaz de inibir 50% do crescimento celular) ($\mu\text{g/mL}$ [μM]) e o intervalo de confiança de 95% (IC 95%) de três experimentos independentes realizados em triplicata pelo método do MTT após 24, 48 e 72 horas de incubação. Os valores foram calculados a partir de regressão não linear, utilizando o programa *GraphPad Prism* versão 6.0. ^bNão determinado.

Fonte: elaborado pelo autor

Figura 13 – Inibição da proliferação de linhagens de PC3, LNCaP, DU-145 e RWPE-1 pelo PTC, composto dextrógiro (+), após 24, 48 e 72 horas de incubação



Fonte: elaborado pelo autor

A análise dos resultados revelou que o enantiômero dextrógiro possui atividade citotóxica superior à mistura racêmica, como descrito por MEIRA (2016). Esse enantiômero, o positivo, é o componente da mistura responsável pelo efeito da inibição da proliferação em ensaios anteriormente realizados. Tendo em vista que a linhagem PC3 corresponde, em relação às outras linhagens, células que crescem independentes de hormônio, com alto poder invasivo e não expressam o gene *p53*, logo, essa linhagem foi escolhida como modelo para dar continuidade do estudo.

Para os demais estudos, as substâncias controle (Monastrol, Taxol e Nocodazol) não foram testadas em PC3 no MTT uma vez a literatura já fornece os valores de concentração em μM para esta linhagem. Para tal, as amostras de PC3, nos experimentos seguintes, receberam as seguintes concentrações: 50 μM para Monastrol (estudos prévios realizados por MEIRA (2016)), 0,1 μM para Taxol (Dong *et al.*, 2013) e 0,25 μM para Nocodazol (Choi; Zhu, 2012).

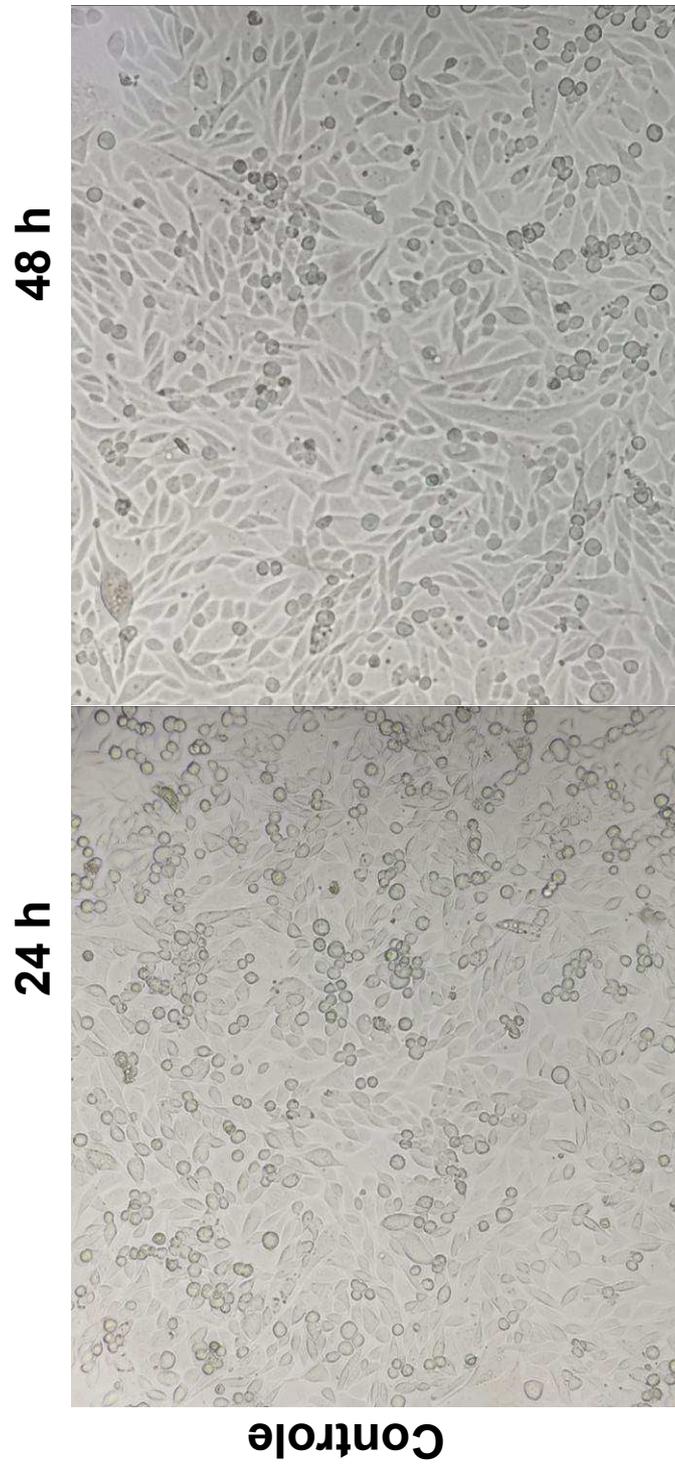
4.2 Avaliação da morfologia celular em cultura e pela coloração com panótico rápido

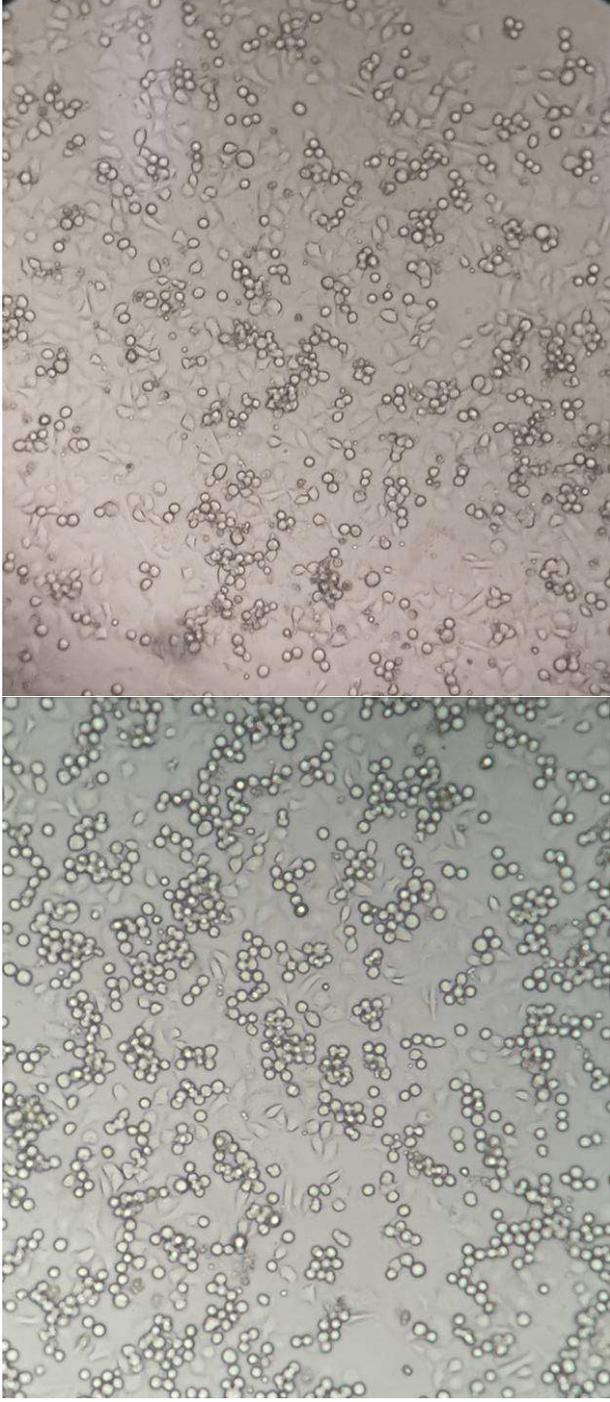
A coloração por kit panótico rápido é um método que permite analisar as características morfológicas das células e sugerir potenciais fenótipos celulares após exposição a compostos.

A avaliação dos aspectos morfológicos das células PC3 foi realizada através da coloração utilizando o kit Panótico rápido e microscópio óptico de luz (Figura 14). Os grupos analisados foram: controle negativo, PTC (+) (7,95 μM), Monastrol (50 μM), Taxol (100 nM) e Nocodazol (250 nM), após 24 e 48 horas de incubação. As células do controle receberam a mesma concentração de veículo (DMSO) que as células tratadas. Nas figuras 14, as células no tratamento de 24 horas, tanto para o PTC (+), quanto para as substâncias controle, aparecem, sua maioria, paradas na divisão celular (células arredondadas) quando comparada à condição das células controle (DMSO). As células controle apresentaram, em maior proporção, células aderidas (*flat*) e com poucas células em processo de divisão (Figura 14). No tratamento de 48 horas, havia ainda células em processo de divisão presentes, mas muitas da população entraram em processo de morte, o que pode ser visualizado nas células fragmentadas, na presença de grande quantidade de debris celulares e grande rarefação celular (redução do número de células totais). Por outro lado, no grupo controle (DMSO), esses achados não foram observados de forma aparente. Na Figura 15, as células no tratamento de 24 horas, tanto para o PTC (+), quanto

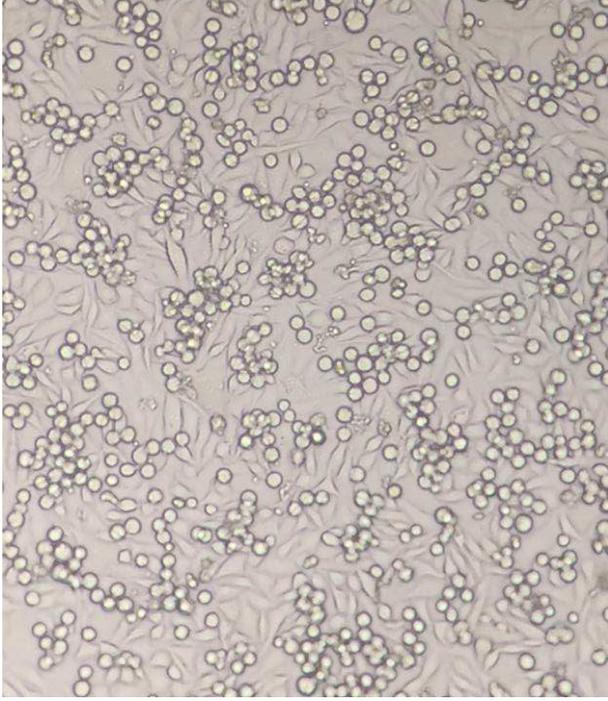
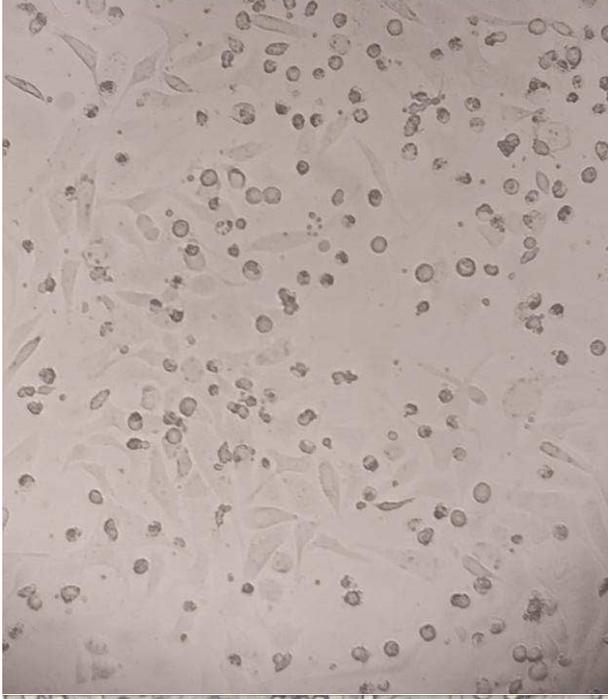
para as substâncias controle, aparecem, em sua maioria, também, paradas na divisão celular (células fortemente coradas e arredondadas – setas em preto), porém em maior quantidade no fármaco testado PTC (+) e nos controles positivos. É importante destacar que os fármacos controle (monastrol, taxol e nocodazol) causam esse efeito cistostático nas células de PC3 durante 24 horas, efeito esse que será mostrado em outros experimentos descritos nesta tese.

Figura 14 – Visualização por microscopia óptica.

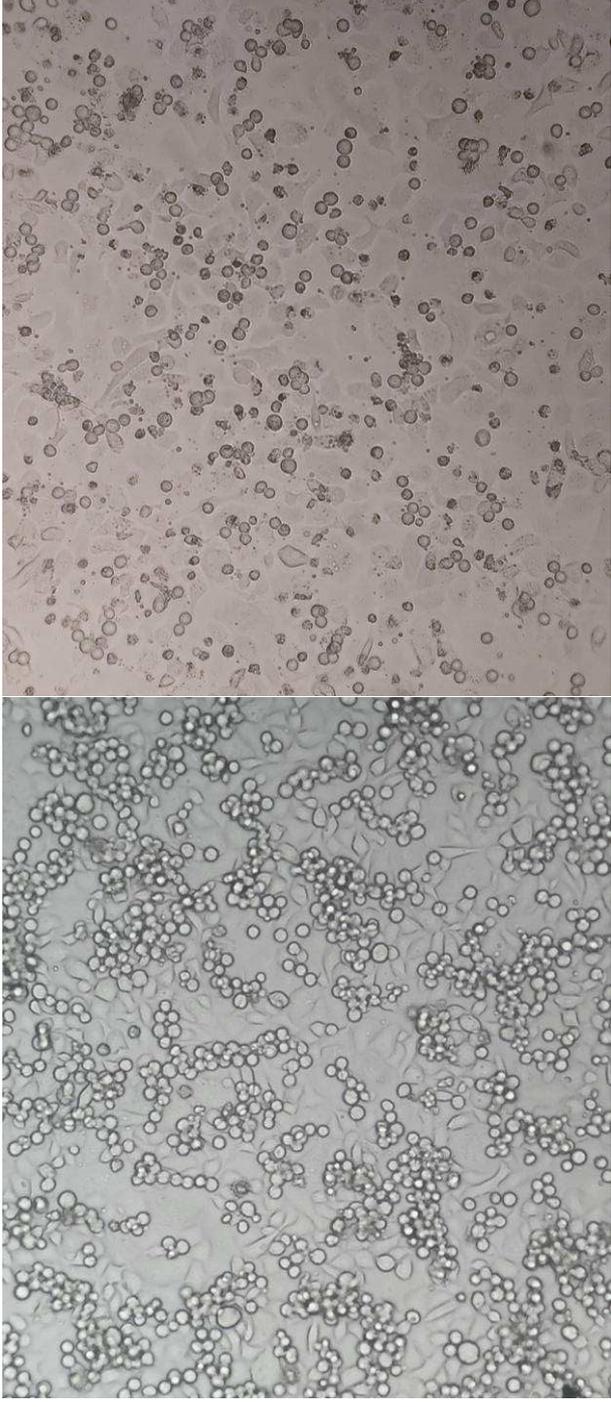




**PTC (+)
7,95 μ M**

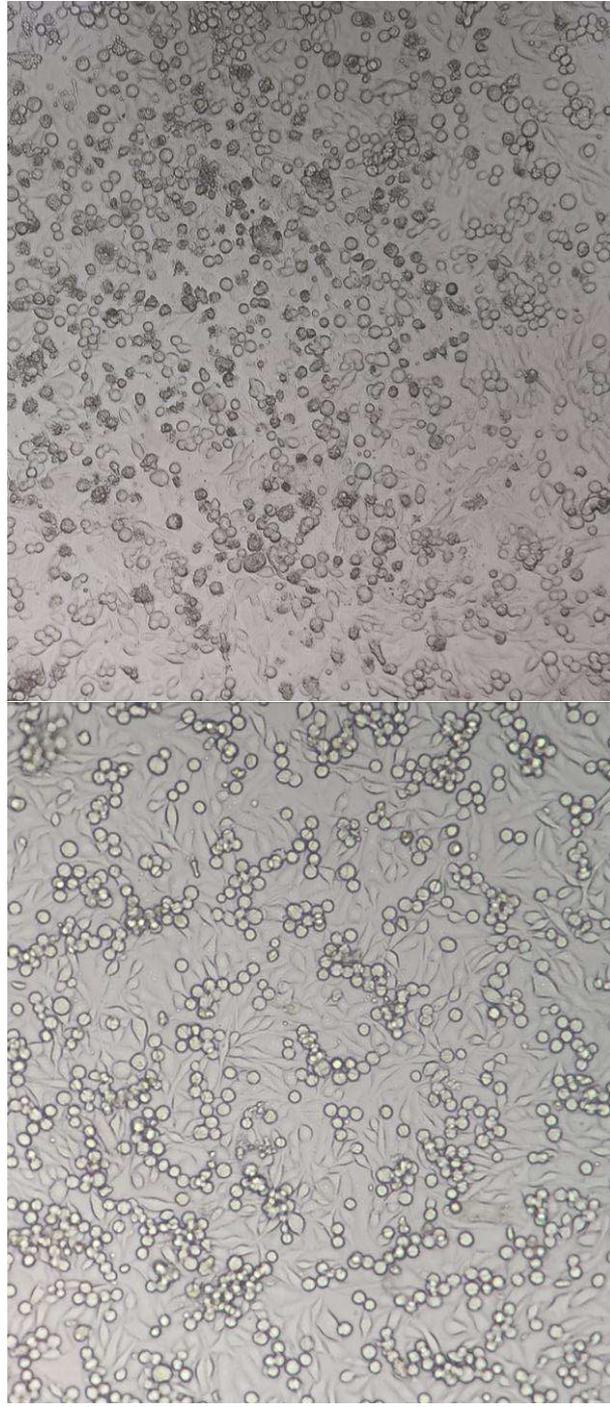


Monastrol
50 μ M



Taxol
0,1 μ M

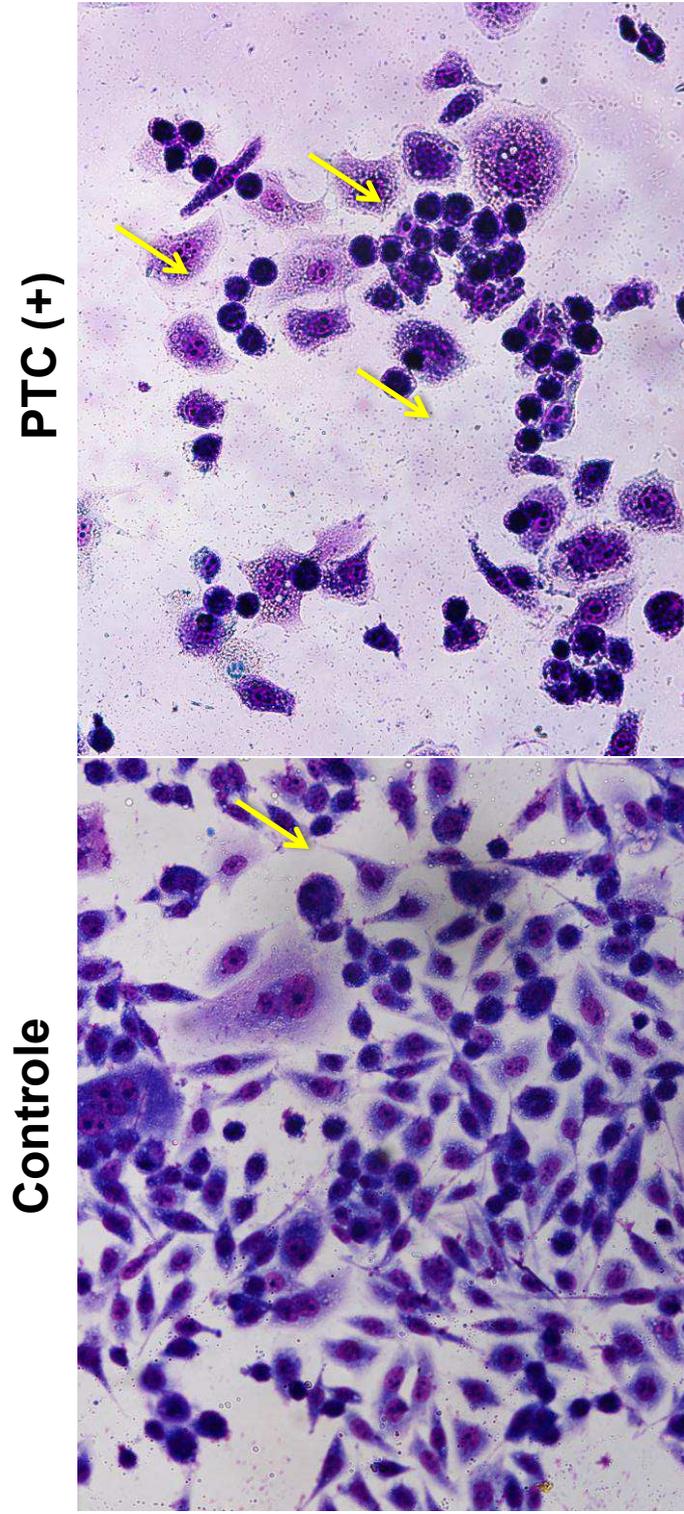
Nocodazol 0,25 μ M



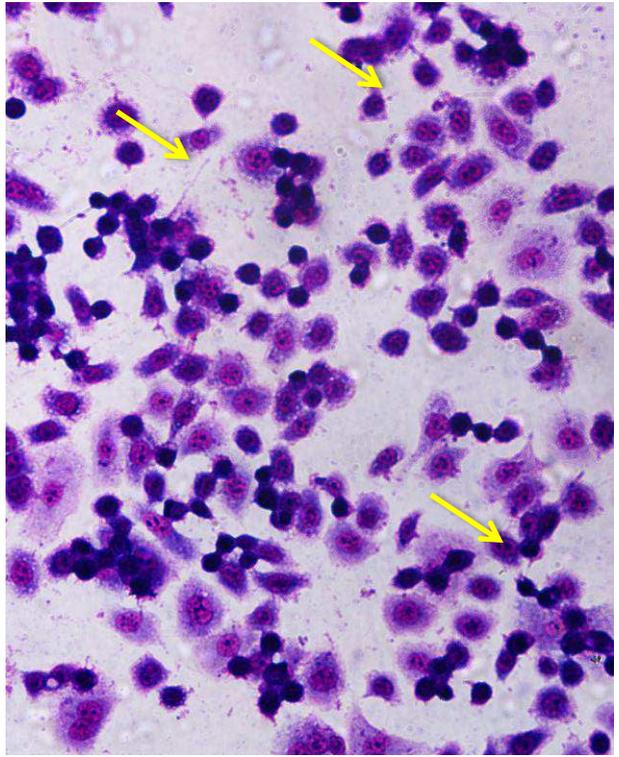
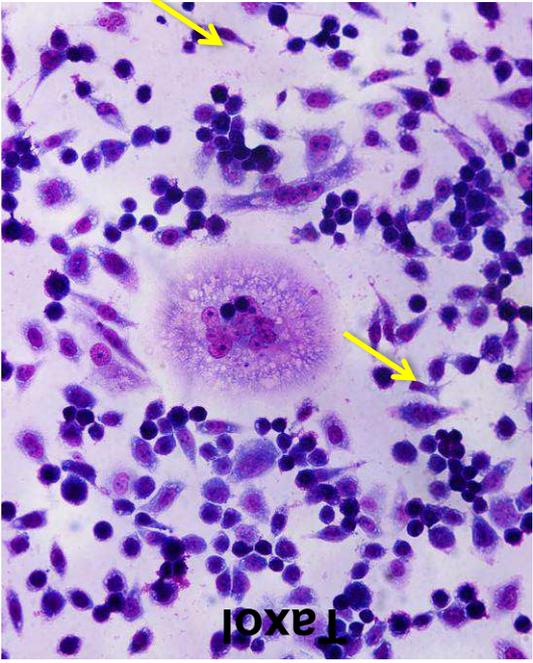
As células de PC3 foram tratadas com PTC (+) (7,95 μ M), Monastrol (50 μ M), Taxol (100 nM) e Nocodazol (250nM). A: 24H e B: 48H. Em 24 horas, tanto para PTC quanto para os controles positivos, uma grande população de células em divisão celular (arredondadas) estão fortemente presentes quando comparado com o grupo controle negativo (DMSO). Em 48 horas, além de ser evidente a presença de células em divisão celular, há a presença de muitas células em processo de morte, presença de grande quantidade de debris celulares e rarefação na população de células. O controle negativo recebeu a mesma quantidade de veículo utilizado para diluir a amostra testada. As células foram analisadas por microscopia óptica (aumento x100).

Fonte: elaborado pelo autor

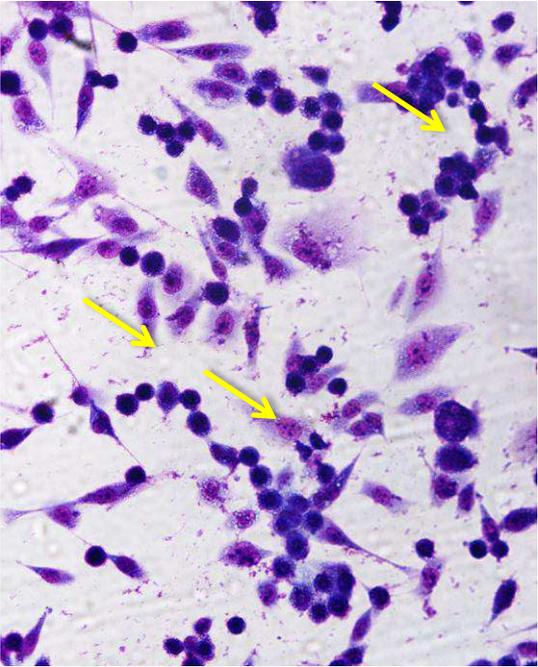
Figura 15 – Visualização por coloração de panótico.



As células de PC3 foram tratadas com PTC (+) (7,95 μM), Monastrol (50 μM), Taxol (100 nM) e Nocodazol (250 nM), durante 24 horas. Presença de grande população de células em divisão celular (fortemente coradas e arredondadas - setas amarelas). O controle negativo recebeu a mesma quantidade de veículo utilizado para diluir a amostra testada. As células foram analisadas por microscopia óptica (x400)



Nocodazol



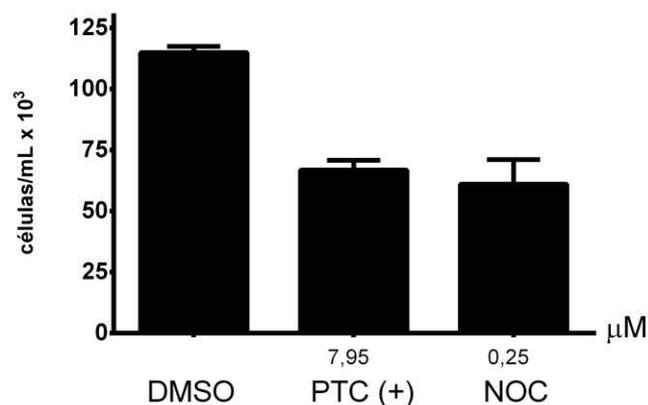
Monastrol

4.3 Avaliação do efeito do PTC (+) sobre o número de células viáveis, na integridade de membrana e no perfil no ciclo celular de PC3 após tratamento de 24 horas

A análise de citometria de fluxo objetivou avaliar a integridade de membrana celular, a densidade de células e o ciclo celular após 24 horas de tratamento. O experimento de citometria de fluxo é muito mais sensível e apresenta uma maior acurácia, quando comparado a outros testes como o azul de tripan, pois está relacionado à entrada ou não do corante iodeto de propídeo nas células, dependendo da integridade da membrana das mesmas. Por se tratar de um corante hidrofílico, as células com a membrana rompida permitem a entrada de iodeto de propídeo, tornando-se coradas pelo corante. Para a avaliação do ciclo celular, o corante iodeto de propídeo penetrou através das células com a utilização de reagentes a base de detergentes. Nesse caso, o Triton X foi utilizado neste experimento.

Após 24 horas de incubação, todos os tratamentos não foram capazes de reduzir o número de células totais quando comparados ao controle negativo (Figura 16). Como observado na figura 16, o tratamento do PTC (+) (7,95 μM) não mostrou diferenças significativas ($p > 0,05$), indicando que provavelmente sua ação é citostática. O nocodazol (0,25 μM) também não mostrou diferença significativa quando comparada com o controle e o tratamento com o PTC (+).

Figura 16 – Efeito do PTC (+) (7,95 μM) sobre a proliferação das células PC3 após 24 horas de incubação, avaliado pela densidade de células, determinado por citometria de fluxo



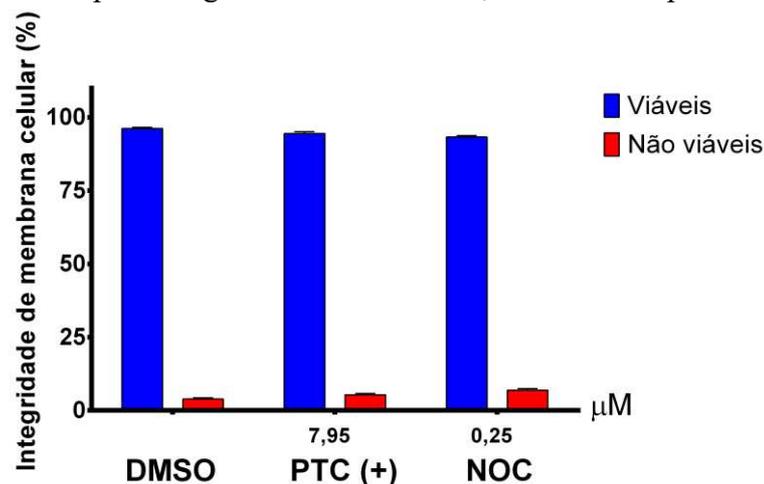
Fonte: elaborado pelo autor

As células do controle negativo (DMSO) foram tratadas com o veículo da substância não ultrapassando 0,075%. O nocodazol (0,25 μM) foi utilizado como controle

positivo. Os dados estão apresentados como valores de média \pm E.P.M obtidos de três experimentos independentes realizados em quadruplicata. $*p < 0,05$ quando comparado ao controle, análise por one-way e two-way ANOVA, respectivamente, seguido pelo teste de Tukey. Um total de 10.000 eventos foi adquirido em cada experimento.

Outro parâmetro analisado na citometria de fluxo foi a integridade de membrana das células após 24 horas de incubação com os diferentes tratamentos (Figura 17). A figura 17 permite observar que, apesar da redução do número de células supramencionado, o tratamento de 7,95 μ M do PTC (+) não reduziu significativamente a fração de células viáveis, assim como, não aumentou a fração de células não viáveis quando comparados ao controle negativo ($p < 0,05$). O controle utilizado, nocodazol (0,25 μ M) agiu de forma bem semelhante quando o parâmetro analisado foi integridade de membrana.

Figura 17 – Efeito do PTC (+) (7,95 μ M) sobre a proliferação das células PC3 após 24 horas de incubação, avaliado pela integridade de membrana, determinado por citometria de fluxo



Fonte: elaborado pelo autor

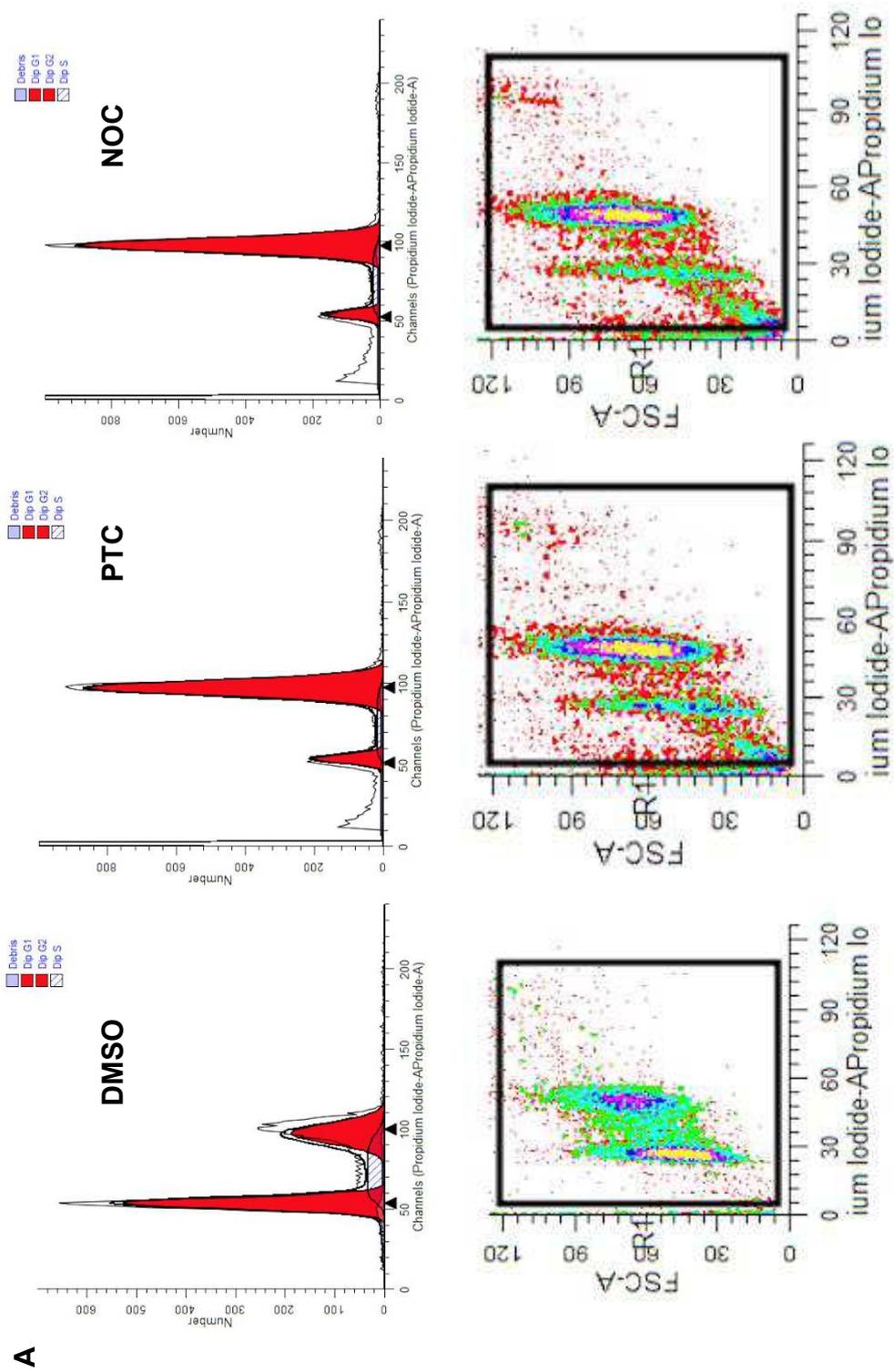
As células do controle negativo (DMSO) foram tratadas com o veículo da substância não ultrapassando 0,075%. O nocodazol (0,25 μ M) foi utilizado como controle positivo. Os dados estão apresentados como valores de média \pm E.P.M obtidos de três experimentos independentes realizados em quadruplicata. $*p > 0,05$ quando comparado ao controle, análise por one-way e two-way ANOVA, respectivamente, seguido pelo teste de Bonferroni. Um total de 10.000 eventos foi adquirido em cada experimento.

Para a análise do ciclo celular, o conteúdo de DNA de uma célula é o reflexo de qual fase aquela célula se encontra. A mensuração do conteúdo de DNA foi realizada a partir

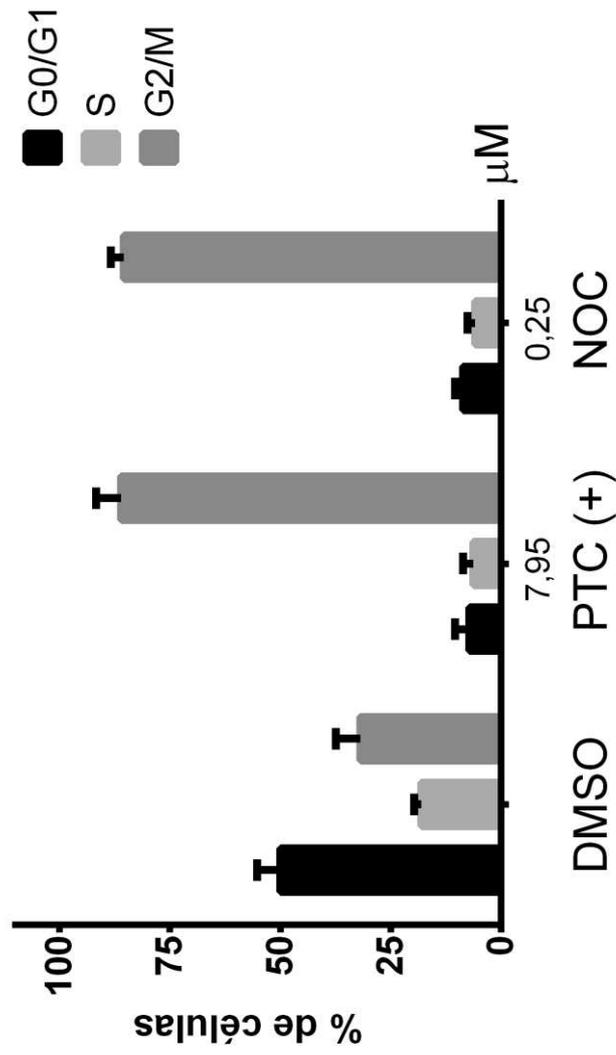
de citometria de fluxo utilizando o agente fluorogênico, iodeto de propídeo. Este composto liga-se a molécula de DNA, logo quanto mais DNA presente em uma célula, maior será a marcação.

A avaliação do conteúdo de DNA (figura 18) das células PC3 tratadas com PTC (+) após 24 horas de incubação causou uma parada do ciclo na fase de mitose (G_2/M) para a concentração de $7,95 \mu M$ quando comparado ao controle negativo ($p < 0,0001$). O ciclo das células do controle negativo foi caracterizado por 54% das células em G_0/G_1 , 16% das células na fase S e 30% das células em fase G_2/M . Foi observado que, no tratamento com PTC (+) na concentração de $7,95 \mu M$, em média 85% das células encontravam-se na fase G_2/M e para o nocodazol esse percentual foi em média de 84%.

Figura 18 – Efeito do PTC (+) (7,95 μ M) sobre as fases do ciclo celular em células PC3 após 24 horas de incubação, determinado por citometria de fluxo, utilizando iodeto de propídeo, Triton X-100 e citrato



B



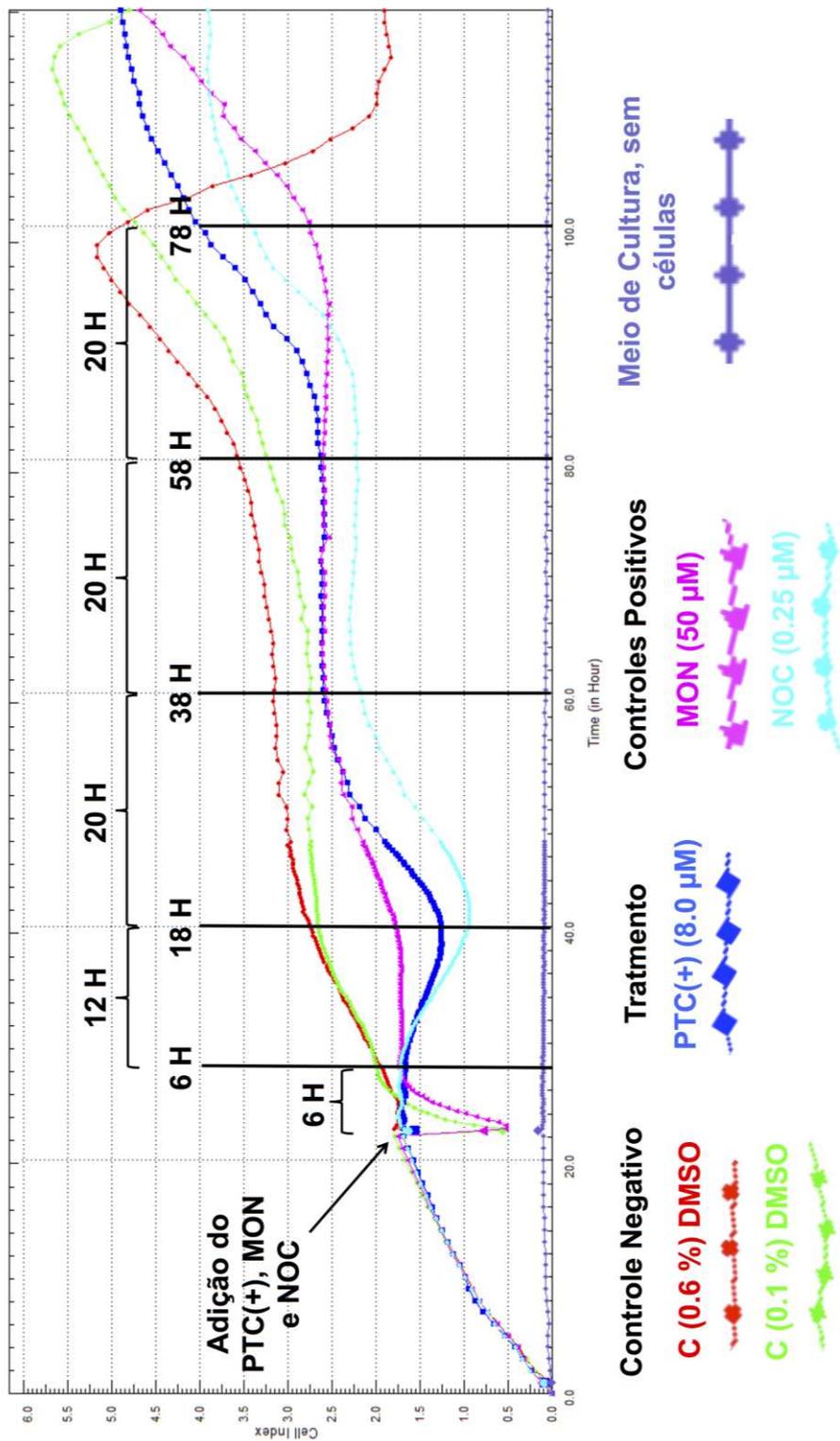
(A) Histogramas representativos. (B) Gráfico. As células do controle negativo (DMSO) foram tratadas com o veículo da substância não ultrapassando 0,075%. O nocodazol NOC (0,25 μM) foi utilizado como controle positivo. Os dados estão apresentados como valores de média \pm SEM obtidos de três experimentos independentes realizados em quadruplicata. * $p < 0,05$ quando comparado ao controle. Análise por two-way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni (GraphPad Prism versão 6.0). Um total de 10.000 eventos foi adquirido em cada experimento. Dados analisados com ModFit LT 4.1 Software (Verity software house).

Fonte: elaborado pelo autor

4.4 Avaliação do efeito do PTC (+) no crescimento celular utilizando o sistema *xCELLigence*

Para analisar o comportamento das células durante a ação dos compostos, foram realizadas curvas de crescimento com o auxílio do equipamento *xCELLigence* (ACEA Biosciences, USA). Através desta metodologia é possível acompanhar o crescimento e proliferação celular em tempo real, baseado em medidas de impedância elétrica provocada pelo contato que as células fazem com a superfície da placa de cultivo. Objetivando verificar os efeitos das diversas concentrações no crescimento celular, foi adicionada mais uma concentração do composto, correspondendo a 7,95 μM . Para esse experimento, além do nocodazol (0,25 μM), utilizou-se também o monastrol (50 μM), ambas os fármacos responsáveis por causar efeitos citostáticos. Ao analisar qualitativamente as curvas geradas pelo equipamento (Figura 19), é possível verificar semelhança das curvas correspondentes aos tratamentos do PTC (+) com os fármacos controles Nocodazol e Monastrol. As respectivas curvas mostraram-se bem semelhantes no que se refere ao comportamento do crescimento celular, com uma queda na proliferação durante as primeiras 24 horas, ou seja, provavelmente, durante esse tempo as respectivas substâncias causaram morte e forte inibição do crescimento. Além disso, houve uma parada da proliferação celular significativa, entre o período de 32 horas e 62 horas aproximadamente, para PTC (+) e nocodazol e, 74 horas, para monastrol; fato que pode ser explicado pela permanência do “Cell Index” durante todos os intervalos de tempo, perdurando um tempo total de 40 horas.

Figura 19 – Avaliação do efeito PTC (+), à 7,95 µM, em células PC3 quando analisadas em tempo real pelo software Xcellingence system

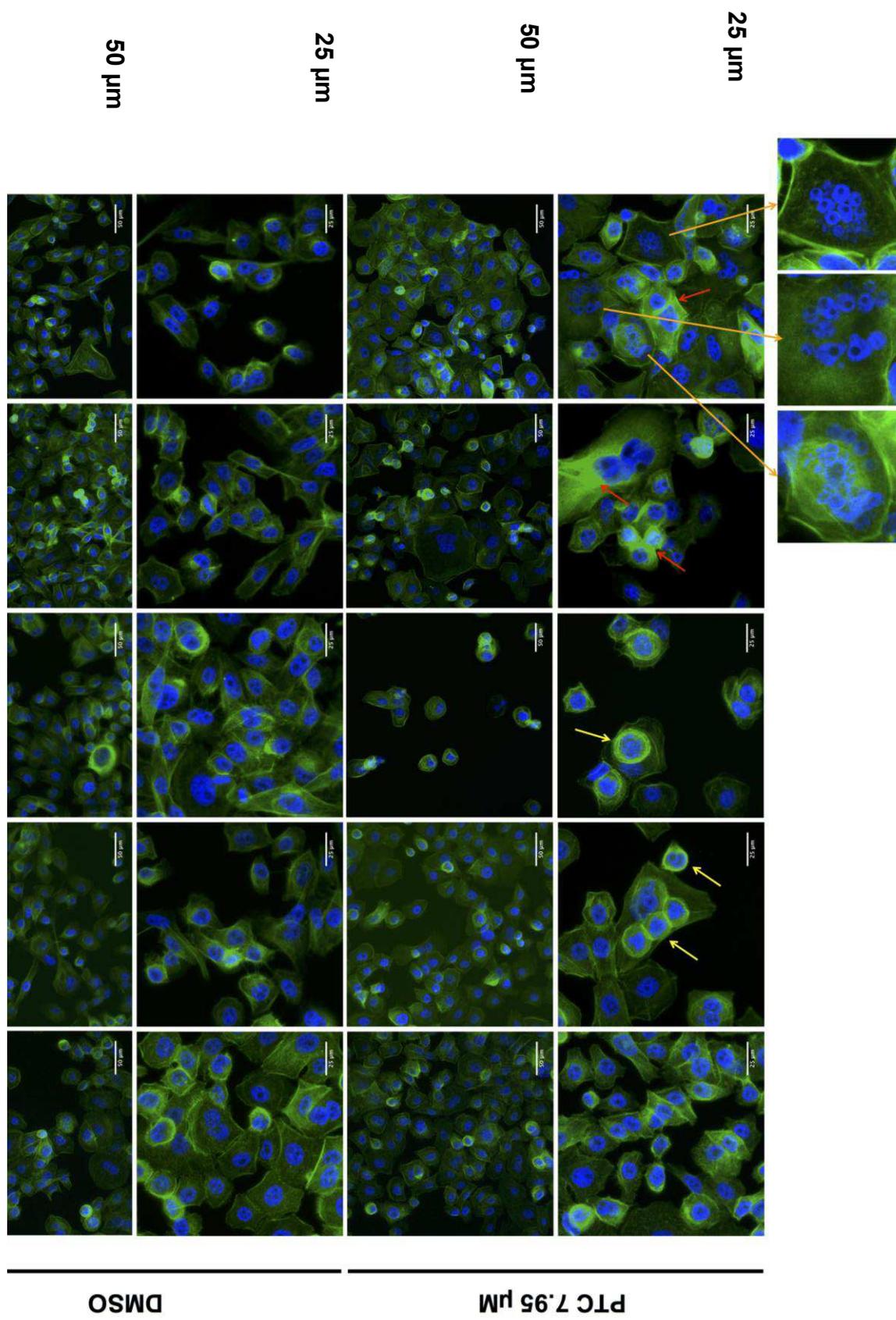


Fonte: elaborado pelo autor

Foram utilizadas 5.000 células para o experimento. Os poços dos controles receberam a mesma concentração de solvente que a amostra na sua maior concentração. O nocodazol (NOC, 0,25 μM) e o monastrol (MON 50 μM) foram utilizados como controles citostáticos. Em destaque o número de horas após a exposição às substâncias (6, 16, 36, 56 e 74 horas), com respectivos intervalos de tempo (6, 10, 20, 20, 18 horas) entre os mesmos.

Para investigar o efeito no tratamento com PTC (+) em células de PC3 e avaliar como as células estão morfológicamente, nos diferentes tempos de tratamentos supracitados, as marcações para actina (*FITC-phalloidin*) e DNA (Hoechst 33258), por imunofluorescência foram realizadas (Figura 20). Para este experimento, as células foram tratadas no tempo zero e, no decorrer dos tempos de 6, 18, 38, 58 e 78 horas. Após a exposição ao PTC (+), as células foram fixadas, marcadas e levadas ao microscópio confocal Carl Zeiss LSM 780 para avaliação morfológica. Nesse experimento, as células analisadas foram comparadas em relação ao grupo controle nos respectivos tempos. Após 6 h de exposição ao PTC (+), não houve mudança significativa na população, nem na morfologia das células PC3. Porém, a partir de 18 h de exposição, é possível notar a presença de células em divisão celular. Após 38 h, a população celular, visivelmente, está diminuída em relação ao controle, apresentando, ainda células em divisão. Após 58 h de exposição, é visível não somente o aumento da população celular, mas também do tamanho celular com a presença de células multinucleadas, por vezes de tamanhos variados, e forte polarização de actina. Esse achado nos dois últimos tempos (58 e 78 h) justifica o aumento da impedância (*cell index*) mostrada na Figura 20.

Figura 20 – Avaliação do efeito do PTC (+) 7,95 μM nos diferentes tempos após a exposição à substância. As células foram comparadas com o grupo controle negativo (DMSO) para os respectivos tempos (6, 18, 38, 58 e 78 h). Após 6 h de exposição não houve mudança significativa na morfologia das células PC3



DMSO

PTC 7.95 μM 50 μm 25 μm 50 μm 25 μm

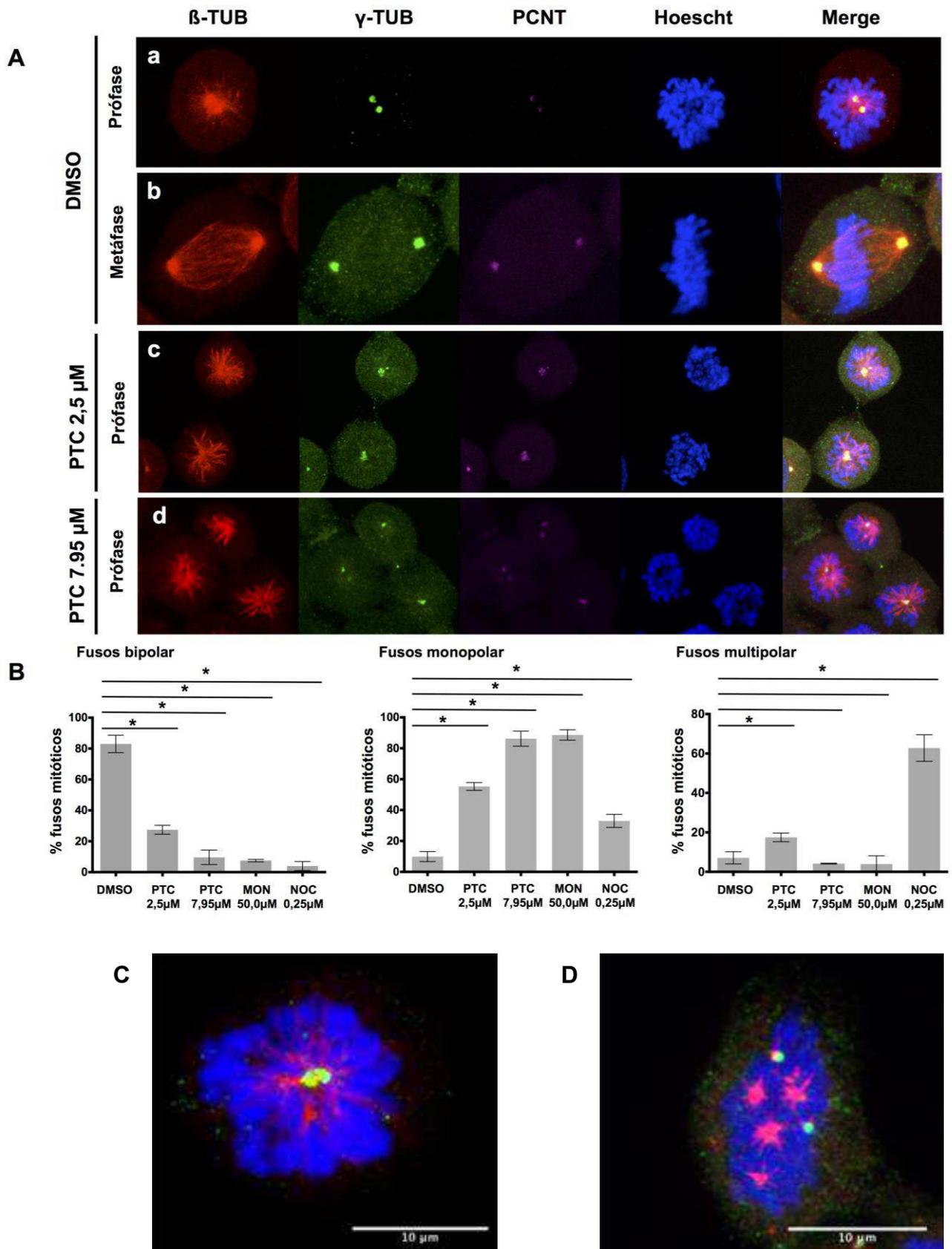
A análise fenotípica das células de PC3 na microscopia confocal foi essencial para caracterizar e prever os possíveis mecanismos de ação da substância em estudo. O microscópio confocal foi utilizado para extrair imagens com maior riqueza de detalhes, devido à possibilidade da captação de planos focais de forma individual, o que oferece mais contraste e melhor qualidade.

4.5 Pterocarpano induziu, em células PC3, a disposição de fusos mitóticos em monopólios

Após o tratamento de 24 h, o PTC (+) induziu a formação de monopólios em células PC3. Para isso foram utilizados anticorpos anti- β -tubulina, anti- γ -tubulina, pericentrina (PCNT) e Hoechst 33258 (DNA) (Figura 21 A). A quantificação dos fenótipos foi realizada pela contagem manual de células, de forma aleatória, utilizando o microscópio confocal Carl Zeiss LSM 780, equipado com objetiva Plan-Apochromat 100x/1,40 Oil DIC M27. Cerca de 150 células por grupo foram analisadas em três experimentos independentes. Em triplicata para o grupo controle e para os tratamentos com PTC (+) 2,5 μ M e 7,95 μ M. Em duplicata para os controles positivos (monastrol – 50 μ M e nocodazol – 0,25 μ M). Os fenótipos para a disposição dos pólos mitóticos foram classificados em bi-pólo, mono-pólo e multi-pólo.

O grupo controle (DMSO) apresentou uma média percentual de bi-pólos 83%, mono-pólos 9% e multi-pólos 7%. Para os tratamentos com PTC (+) de 2,5 μ M e 7,95 μ M, os valores percentuais médios para bi-pólo, mono-pólo e multi-pólo foram, respectivamente, 26%, 10% e 55% e 85%, 17% e 4%, respectivamente. Para os controles positivos, monastrol 50 μ M e nocodazol 0,25 μ M, os valores percentuais médios para bi-pólo, mono-pólo e multi-pólo foram, respectivamente, 7%, 3% e 88% e 32%, 4% e 63% (Figura 21 B).

Figura 21 – Pterocarpano (+) induz a formação de fusos monopolares em células PC3

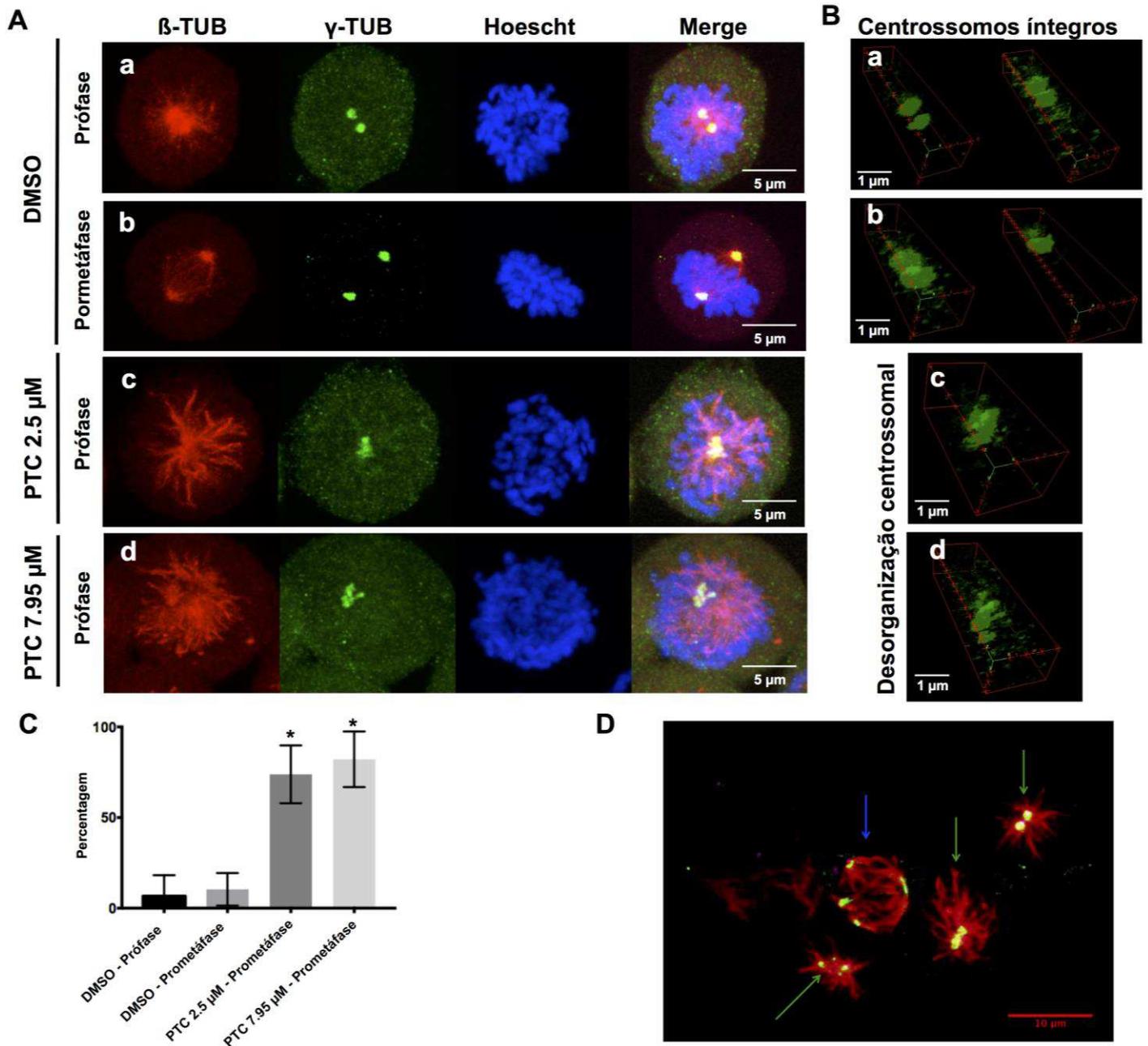


A. As células do grupo controle foram cultivadas com o veículo (DMSO) numa concentração abaixo de 1% e, após 24 h, as células em prófase (A`a) com fuso normal e cromossomos na placa metafásica (A`b), fuso bipolar normal. Fusos monoastrais foram observados em células de PC3 sob tratamento de PTC (+) 2,5 μ M (A`c); sob PTC (+) 7,95 μ M (A`d) após 24 h. Após os tratamentos, as células foram marcadas com anticorpos contra β -tubulina (vermelho), γ -tubulina (verde), pericentrina (magenta), DNA (azul) Hoechst 33258 e sobreposição (*merge*). B. Frequências de células com fusos bipólo, mono-pólo e multi-pólo. Mais de 100 células foram examinadas e contadas por grupo em todos experimentos. Para o controle (DMSO), PTC (+) 2,5 μ M e PTC (+) 7,95 μ M foram realizados três experimentos independentes. Para os controles positivos Monastrol 50 μ M and Nocodazol 0,25 μ M foram realizados dois experimentos independentes. O número de fusos analisados são mostrados em colunas. Os dados são expressos como média \pm SEM e os * com traços indicam diferença estatisticamente significativa. As barras representam o erro padrão. A diferença é significativa ($p < 0,05$). As imagens foram coletadas em Z stacks e convertidas em projeções de intensidade máxima. Todas as células foram analisadas e caracterizadas com o mesmo limite (*threshold*). C. Configuração em monoáster para o tratamento com monastrol (50 μ M). D. Configuração em multipópos para o tratamento com nocodazol (0,25 μ M)
 Fonte: elaborado pelo autor

4.7 Pterocarpano induziu, em células PC3, desorganização do centrôssomo

Após o tratamento de 24 h com PTC (+), os centrôssomos foram observados por imunofluorescência através da marcação com anticorpo anti- γ -tubulina durante a prófase e prometáfase (Figura 22). A presença da desorganização do centrôssomo foi evidente nos tratamentos com a substância (Figura 22 B). O controle negativo (DMSO) apresentou uma pequena percentagem média (de 5%), mas não estatisticamente significativa para células em prófase. Para células em prometáfase, a integridade do centrôssomo comprometida foi 13%. Em contrapartida, o percentual médio para as condições no tratamento com PTC (+) de 2,5 μ M e 7,95 μ M em células com a disposição de fusos monoastrais foi, respectivamente, 72% e 77% (Figura 22 C). Para esse experimento, cerca de 150 células por grupo foram analisadas para morfologia e integridade do centrôssomo em três experimentos independentes. É importante destacar também para este ensaio a perda da fluorescência e a dispersão do material centrôssomal (Figura 22 B`c`d; Figura 22 D), onde a matrix do centrôssomo (amarelo) está disperso e com morfologia comprometida, com presença de células com fusos multi-pólos e mono-pólos. Por outro lado, o controle negativo (DMSO) permanece com os centrôssomos íntegros e bem organizados (Figura 22 B`a`b). Estes achados mostram que o Pterocarpano (+) induziu não somente o fenótipo de mono-pólos, mas também desorganização da matriz do centrôssomo, interferindo diretamente na formação do bipólo durante a divisão celular.

Figura 22 - O tratamento com PTC (+) causa desorganização do centrôssomo em células de PC3.

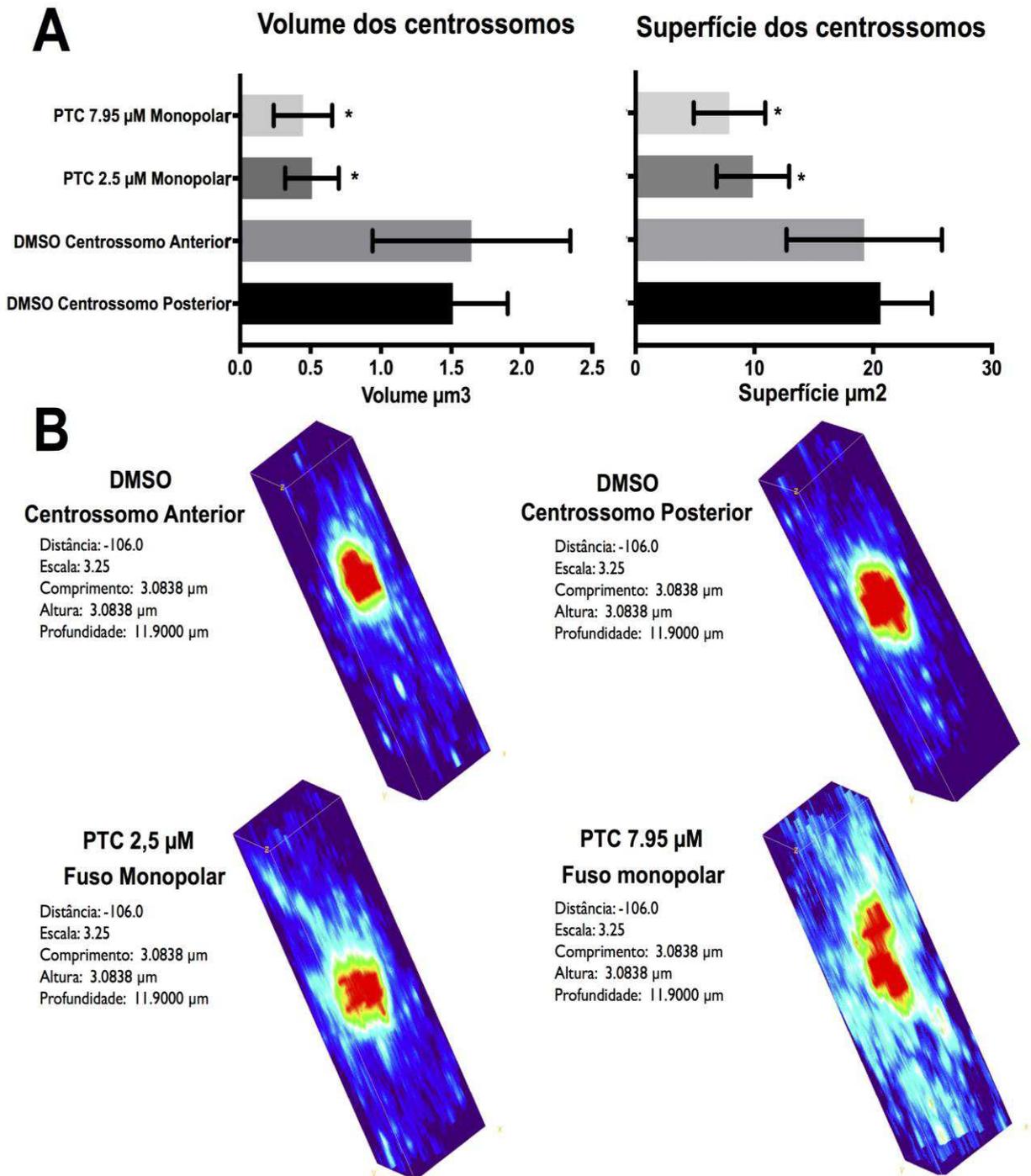


A. As células do controle negativo (DMSO) e células tratadas com PTC (+) (2,5 μ M e 7,95 μ M) foram cultivadas durante 24 h. Células em prófase (A'a) com fuso normal bipolar, e em prometáfase (A'b), visualizadas por imunofluorescência com anticorpos β -tubulina (vermelho), γ -tubulina (verde) e DNA (azul) Hoechst 33258 e sobreposição (*merge*). B. Integridade do centrôssomo nas células controle (B'a/B'b) e células com desorganização do centrôssomos sob o tratamento com PTC 2,5 μ M (B'c) e PTC 7,95 μ M (B'd). C. Frequências do número de centrôssomos por célula não tratadas (colunas da esquerda) e células tratadas com PTC (2,5 μ M e 7,95 μ M) (colunas da direita). D. Disposição do material centrôssomal desorganizado (amarelo) e de tubulina (vermelho). Presença de células em multi-pólo (seta azul) e mono-pólos (setas verdes). Os dados são expressos como média \pm SEM e os * indicam diferença estatisticamente significativa. As barras representam o erro padrão. A diferença é significativa ($p < 0,05$). As imagens foram coletadas em Z stacks e convertidas em projeções de intensidade máxima. (---10 μ m). Todas as células foram analisadas e caracterizadas com o mesmo limite (*threshold*).

Fonte: elaborado pelo autor

Para investigar e melhor caracterizar a perda do material centrossomol, novas imagens de centrossomos foram adquiridas com *z-stacks* de 0,1 μm de espessura e convertidas em projeções de intensidade máxima. Posteriormente foram analisadas para caracterização de perda de integridade e quantificadas (volume e superfície) para as condições do controle negativo (DMSO) e tratamentos com PTC (+) 2,5 μM e 7,95 μM . Para esse experimento, foram utilizados os *plug-in* do Image J FIJI *3D Objects Counter* (BOLTE; CORDELIÈRES, 2006), para os cálculos de volume e superfície dos centrossomos, e o *plug-in Volume Viewer* (escrito por Kai Uwe Barthel, htw-berlin.de, *Internationale Medieninformatik, Berlin, Germany*; <https://imagej.nih.gov/ij/plugins/volume-viewer.html>) para visualização e disposição dos centrossomos (Figura 23).

Figura 23 - O tratamento com PTC (+) causa perda de volume e de superfície do centróssomo.



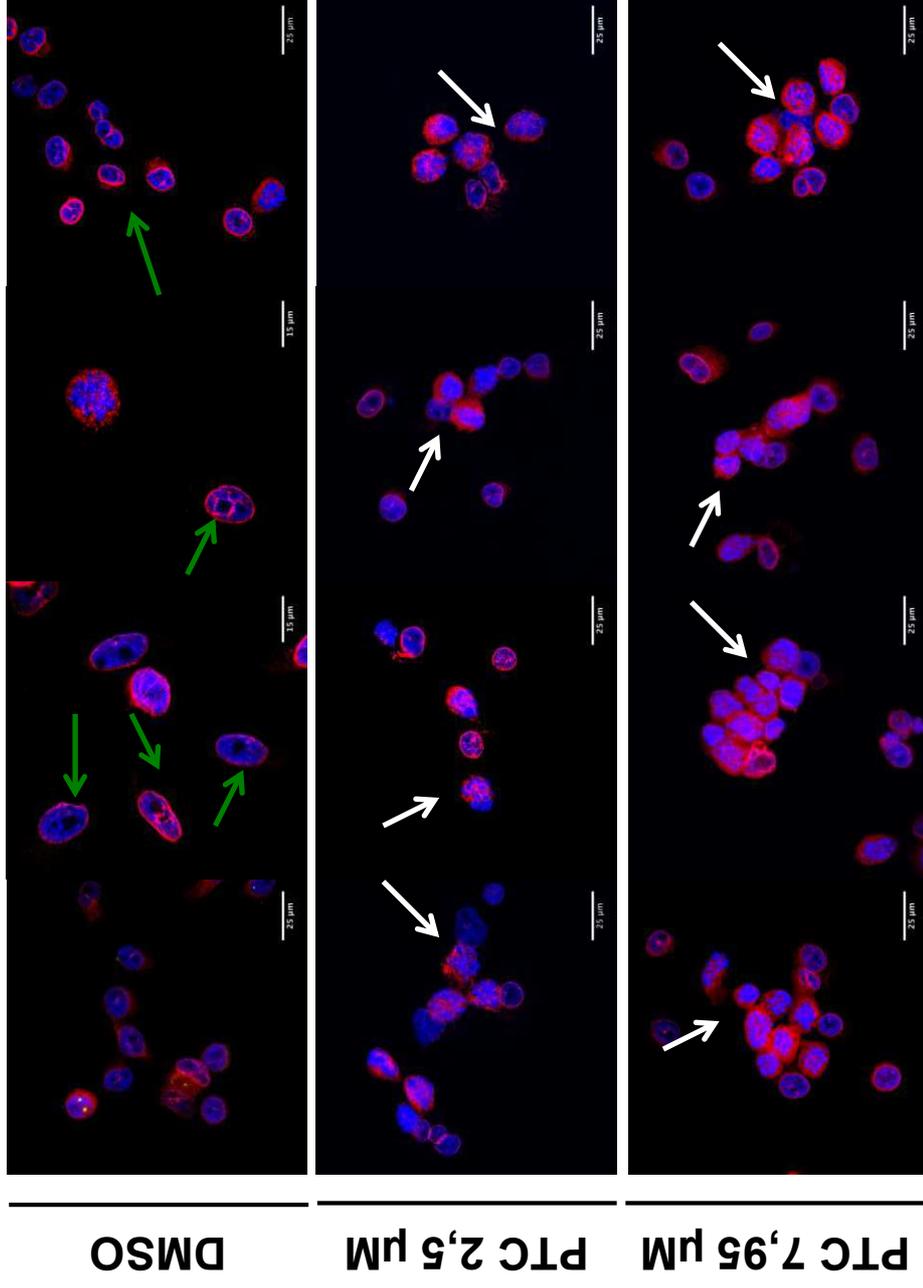
A. Representação gráfica de volume e superfície do centróssomo utilizando o plug-in *3D Objects Counter*, onde todas as células foram analisadas e caracterizadas com o mesmo limite (*threshold*). O tratamento com PTC (+) causou perda de volume e de superfície após 24 h. B. Representação tridimensional dos centróssomos anterior e posteriores (DMSO) e fusos monopolares (PTC (+) 2.5 μM e 7.95 μM) com intensidade de imunofluorescência em Thermal LUT em máxima projeção, uma opção disponível no *software Image J Fiji*. PTC (+) causou perda de volume e de superfície após 24 h. Nos controles negativos, os centróssomos anterior e posterior são resolvidos. Nas células tratadas com PTC (+) com monoásteres, a integridade do centróssoma e a resolução dos componentes anterior e posterior estão comprometidas.

Fonte: elaborado pelo autor

Os dados são expressos como média \pm SEM e os * indicam diferença estatisticamente significativa. As barras representam o erro padrão. A diferença é significativa ($p < 0,05$). As imagens foram coletadas em *Z stacks* 0,1 μm e convertidas em projeções de intensidade máxima. Um *n* de 30 células foram utilizadas.

A fim de caracterizar em qual fase da mitose encontram-se as células submetidas ao tratamento com PTC (+), as marcações com anticorpo anti-lamina-A e Hoechst 33258 (DNA) para imunofluorescência foram realizadas. O controle negativo (DMSO) apresentou células em intérfase com marcação evidente para lamina-A, enquanto que, para os tratamentos com PTC (+) 2,5 μM e 7,95 μM , apresentaram uma grande população de células em mitose (prometáfase), com fraca marcação para lamina-A (Figura 24). A ausência da lamina-A representa a transição da fase de prófase para a fase de prometáfase.

Figura 24 - O tratamento com PTC (+) causou parada do ciclo celular em prometáfase.



O controle negativo apresentou células em interfase com marcação para lamina-A (vermelho) evidente (setas verdes). Os tratamentos com PTC (+) 2,5 µM e 7,95 µM apresentaram uma alta população de células em mitose em relação ao controle, em prometáfase, sem marcação evidente para lamina-A (setas brancas). O núcleo foi marcado com Hoechst 33258 (azul).

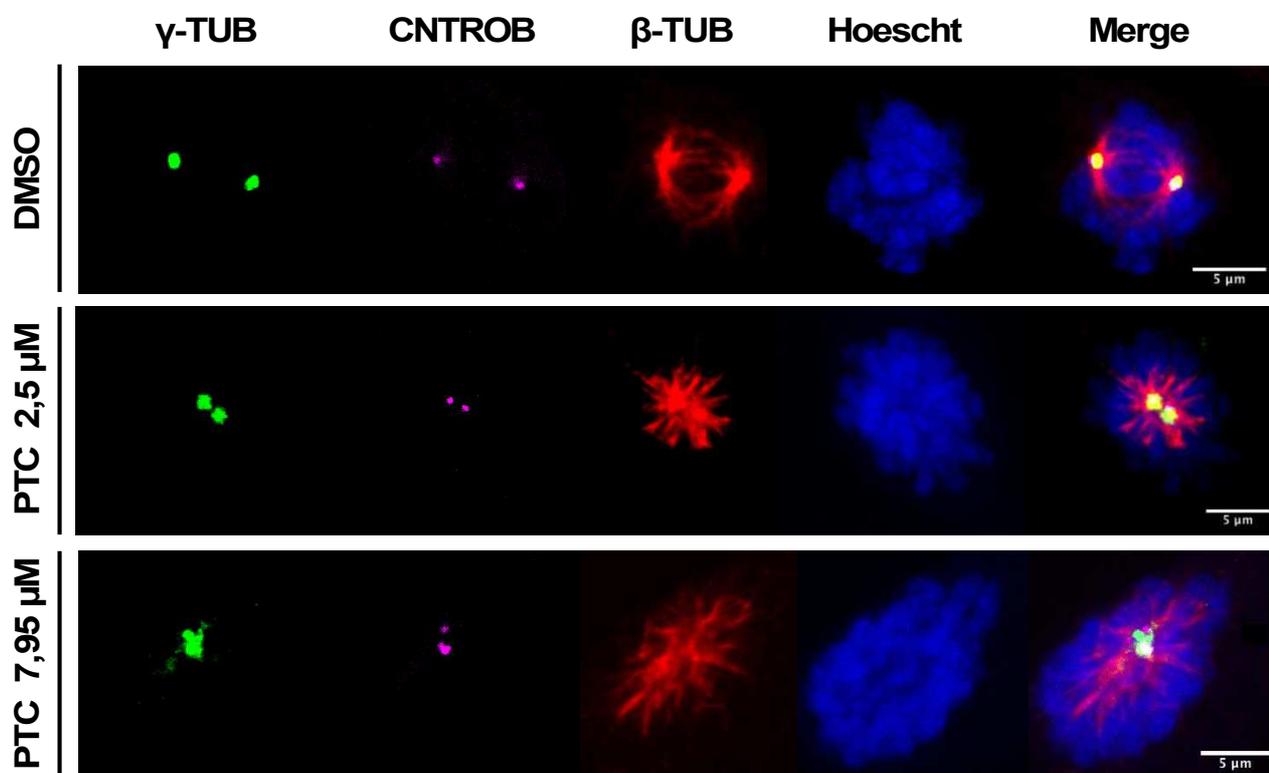
Fonte: elaborado pelo autor

As imagens foram coletadas em *Z stacks* e convertidas em projeções de intensidade máxima. ($-25 \mu\text{m}$). Todas as células foram analisadas e caracterizadas com o mesmo limite (*threshold*).

4.7 Pterocarpano não impede a divisão de centríolos durante a divisão celular

Para avaliar a disposição dos centríolos no tratamento com PTC (+), a marcação com CNTROB (*centrobin*), γ -tubulina, β -tubulina e DNA (Hoescht 33258) para imunofluorescência foi realizada (Figura 25). Para as células do controle negativo (DMSO), a marcação para centríolos-filho mostrou que os centríolos se dividem durante o processo de mitose, o mesmo acontece para as condições de tratamento com PTC (+) $2,5 \mu\text{M}$ e $7,95 \mu\text{M}$, dispondo células com microtúbulos em mono-pólos. É importante destacar que, a marcação para CNTROB é exclusivamente para centríolos-filho, não contemplando a marcação para centríolo-mãe, mas é possível afirmar que, se houve marcação de centríolos-filho para cada centrossomo, é preditivo dizer que houve também a duplicação do centríolo-mãe.

Figura 25 - O tratamento com PTC (+) não interfere na duplicação dos centríolos



O controle negativo e os tratamentos com PTC (+) $2,5 \mu\text{M}$ e $7,95 \mu\text{M}$ apresentaram células em prometáfase com marcação para γ -tubulina (verde), CNTROB (*centrobin*) (magenta), β -tubulina (vermelho), DNA (azul) (Hoescht

33258) e sobreposição (*merge*). Para os tratamentos com PTC (+) 2,5 μ M e 7,95 μ M as células estavam dispostas em mono-pólos (β -tubulina - vermelho).

Fonte: elaborado pelo autor

As imagens foram coletadas em *Z stacks* e convertidas em projeções de intensidade máxima. (—5 μ m). Todas as células foram analisadas e caracterizadas com o mesmo limite (*threshold*).

4.8 Caracterização do perfil proteico no tratamento com PTC (+), Monastrol e Nocodazol – *Shotgun*

Um total de 5.114 peptídeos foram identificados, correspondendo a um total de 1.004 proteínas observadas nos tratamentos com as substâncias. Para todas as condições de tratamento com PTC (+), Monastrol e Nocodazol, um total de 137 proteínas foram quantificadas como diferencialmente expressas. Para o tratamento com PTC (+), durante 24 horas, das 137 proteínas quantificadas, 24 foram superexpressas, 28 subexpressas e 85 não foram diferencialmente expressas (Tabela suplementar 1). Para o tratamento com PTC (+), durante 48 horas, das 137 proteínas, 05 foram superexpressas, 13 subexpressas e 119 não foram diferencialmente expressas (Tabela suplementar 2).

Para o tratamento controle com Monastrol, em 24 horas, do grupo de proteínas quantificadas, 13 foram superexpressas, 16 subexpressas e 108 não foram diferencialmente expressas (Tabela suplementar 3), e para 48 horas, do total de proteínas quantificadas, 06 foram superexpressas, 15 subexpressas e 116 não foram diferencialmente expressas (Tabela suplementar 4).

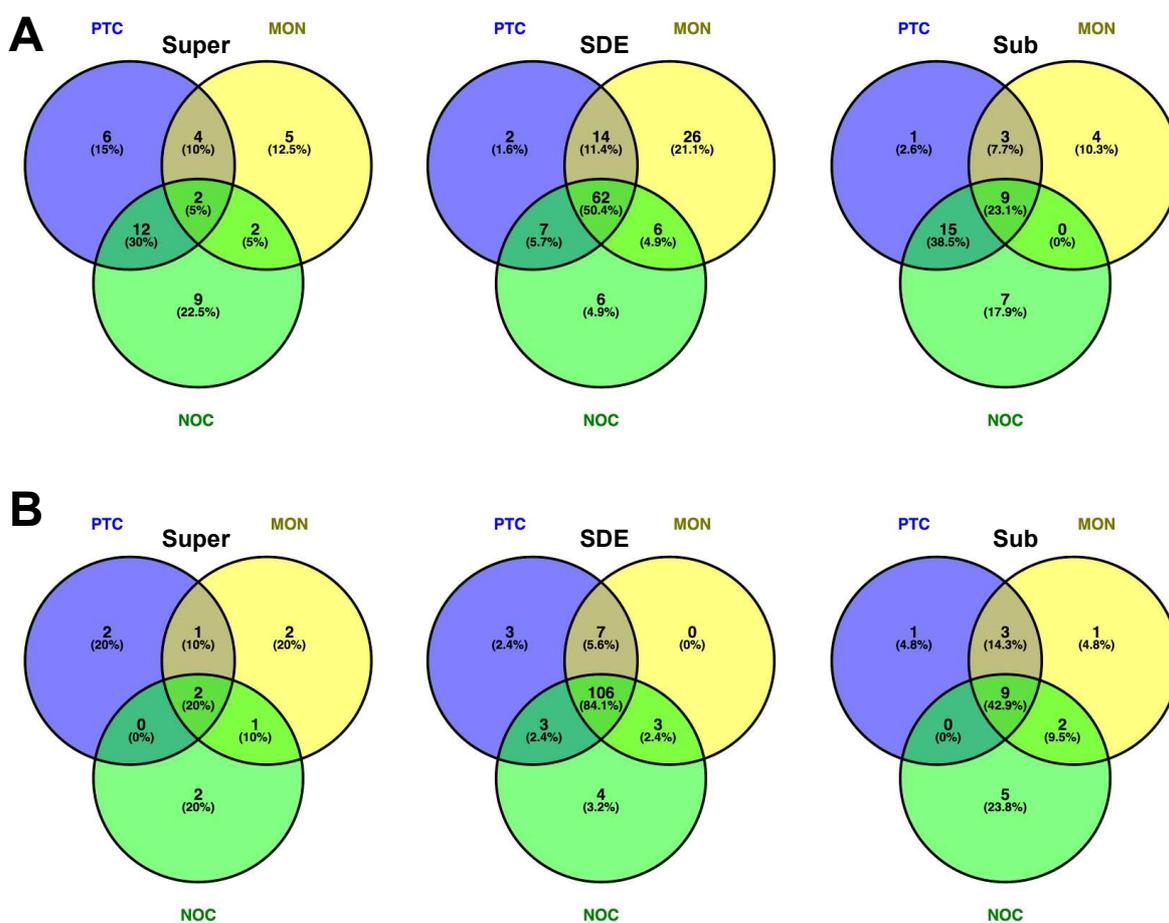
Para o tratamento controle com Nocodazol em 24 horas, das 137 proteínas quantificadas, 25 foram superexpressas, 31 subexpressas e 81 não foram diferencialmente expressas (Tabela suplementar 5), para 48 horas, do total de proteínas quantificadas, 05 foram superexpressas, 16 subexpressas e 116 não foram diferencialmente expressas (Tabela suplementar 6).

Para melhor caracterizar e predizer as correlações do perfil proteico com os achados já expostos, as proteínas diferencialmente expressas no tratamento com PTC(+) serão mais exploradas nos tópicos sobre a ontologia e interações proteína-proteína (interatoma). As proteínas diferencialmente expressas no tratamento com PTC (+) durante 24 horas foram mais significativas quando comparadas com o tratamento com PTC (+) durante 48 horas.

Analisando o diagrama de Venn construído com base no número de proteínas identificadas e quantificadas (superexpressas – Super; subexpressas – Sub; e sem diferença de

expressão - SDE) (Figura 26), é possível notar que, para 24 horas de tratamento, poucas foram as proteínas exclusivamente expressas (para o *status* de Super/Sub) e comumente distribuídas no *status* SDE, nas diferentes condições. Para o tempo de 48 horas, esse número reduziu ainda mais (para o *status* de Super/Sub). No entanto, o número de proteínas comumente expressas para o *status* SDE aumentou. Esse achado também é resultado do tempo prolongado à exposição às drogas.

Figura 26 - Diagramas de Venn para proteínas identificadas e quantificadas por LC-MS^E



(superexpressas, sem diferença de expressão e subexpressas) obtidas nos tratamentos com PTC, Monastrol (MON) e Nocodazol (NOC) durante 24 horas (A) e 48 horas (B).

PTC (ptero-carpano); MON (Monastrol); NOC (Nocodazol); Super (superexpressas); SDE (sem diferença de expressão); Sub (subexpressas).

Fonte: elaborado pelo autor

Considerando, a partir daqui, as proteínas diferencialmente expressas, ou seja, as proteínas superexpressas e subexpressas, no tratamento com PTC (+) durante 24 horas, a busca em caracterizar o grupo de proteínas com os demais perfis dos tratamentos com Monastrol e Nocodazol foi realizada (Tabela 3). Para esse *subset* de proteínas, a classificação para componente celular, função molecular, processo biológico, classe proteica e vias de atuação foi empregada, na determinação dos conceitos ontológicos também foi avaliada (Figura 27). Para tal, foi utilizado a plataforma PANTHER (*Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships*, <http://pantherdb.org>) para dados em larga escala.

Tabela 1 - Proteínas diferencialmente expressas em diferentes condições de tratamento PTC (+), Monastrol e Nocodazol, após 24 h de exposição. PTC: PTC (+); MON: Monastrol e NOC: Nocodazol.

		PTC			MON			NOC		
Composto (24 h after exposure)										
Proteína	Gene	FoldLog2	Status	FoldLog2	Status	FoldLog2	Status	FoldLog2	Status	Status
Actin, alpha skeletal muscle	ACTA1	-2,544923672	DOWN	-2,940982252	DOWN	-2,460592771	DOWN	-2,460592771	DOWN	DOWN
Actin, cytoplasmic 2	ACTG1	1,886262895	UP	1,472439346	UP	1,327748026	UP	1,327748026	UP	UP
Acyl-CoA dehydrogenase family member 11	ACAD11	-1,564333212	DOWN	-1,217841931	DOWN	1,39520913	DOWN	1,39520913	DOWN	UP
Annexin	ANXA2	1,085162037	UP	1,428025227	UP	-	UP	-	UP	-
Annexin A1	ANXA1	-2,269844811	DOWN	-2,974719723	DOWN	-	DOWN	-	DOWN	-
Annexin A5	ANXA5	-1,124754785	DOWN	-2,125150382	DOWN	-2,043095987	DOWN	-2,043095987	DOWN	DOWN
Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 3	CHD3	-2,594642612	DOWN	-	DOWN	-	-	-	-	-
Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 8	CHD8	1,113884475	UP	-	UP	-	-	-	-	-
Cofilin-1	CFL1	-1,645437563	DOWN	-2,470500213	DOWN	-1,531274001	DOWN	-1,531274001	DOWN	DOWN
Disks large homolog 5	DLG5	-2,842740835	DOWN	-	DOWN	-1,922185981	-	-1,922185981	DOWN	DOWN
DNA-dependent protein kinase catalytic subunit	PRKDC	-2,000963991	DOWN	-	DOWN	-2,638846291	-	-2,638846291	DOWN	DOWN
Dynein heavy chain 12, axonemal	DNAH12	-2,500503855	DOWN	-3,087658321	DOWN	-1,886535828	DOWN	-1,886535828	DOWN	DOWN
Dynein heavy chain 9, axonemal	DNAH9	-1,250672359	DOWN	-1,007205713	DOWN	-1,113925684	DOWN	-1,113925684	DOWN	DOWN
E3 ubiquitin-protein ligase HUWE1	HUWE1	1,102815357	UP	-	UP	1,580166177	-	1,580166177	UP	UP
E3 ubiquitin-protein ligase UBR5	UBR5	-2,101548068	DOWN	-	DOWN	-2,20411051	-	-2,20411051	DOWN	DOWN
Ezrin	EZR	-1,804523989	DOWN	1,320476825	UP	-1,878208815	UP	-1,878208815	DOWN	DOWN
GRIP and coiled-coil domain-containing protein 2	GCC2	-1,434985859	DOWN	-	DOWN	-1,212127118	-	-1,212127118	DOWN	DOWN
Heat shock 70 kDa protein 1A	HSPA1A	2,189103058	UP	2,014445103	UP	-	UP	-	UP	-
Heat shock 70 kDa protein 6	HSPA6	1,328698028	UP	-	UP	1,166528138	-	1,166528138	UP	UP
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3	HNRNPH3	2,238053764	UP	-	UP	-	-	-	-	-
Histone H3	H3F3B	1,083902146	UP	-	UP	-	-	-	-	-

Histone H3.2	HIST2H3A	1,500698517	UP	1,037670672	UP	1,366343665	UP
Hydrocephalus-inducing protein homolog	HYDIN	1,992576948	UP	-	-	2,130230886	UP
InaD-like protein	INADL	1,150571504	UP	-	-	-	-
Integrin beta-4	ITGB4	-1,858407706	DOWN	-	-	-1,717634842	DOWN
KIAA0423, isoform CRA_a	FAM179B	-1,35895189	DOWN	-	-	-1,121124003	DOWN
Kinectin	KTNI	1,542712481	UP	-	-	-	-
Kinesin-like protein KIF7	KIF7	1,235195578	UP	-	-	1,169139463	UP
Metabotropic glutamate receptor 2	GRM2	-1,451115195	DOWN	-	-	-1,886138479	DOWN
Moessin	MSN	1,687456399	UP	-	-	1,830281642	UP
Myosin-2	MYH2	-1,641306224	DOWN	-	-	-1,27988852	DOWN
Nesprin-2	SYNE2	-1,508233367	DOWN	-2,561468929	DOWN	-2,284385729	DOWN
Nucleoside diphosphate kinase	NME1-NME2	1,819020487	UP	-	-	2,015827193	UP
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	PPIA	-2,669493984	DOWN	-	-	-2,621413484	DOWN
Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit beta isoform	PIK3CB	-1,437763047	DOWN	-1,591706323	DOWN	-1,630678535	DOWN
Phosphoglycerate kinase 1	PGK1	-1,882148866	DOWN	-2,588920325	DOWN	-2,114576956	DOWN
Protein disulfide-isomerase	P4HB	1,228620612	UP	-	-	-1,669810098	DOWN
Protein unc-80 homolog	UNC80	1,262452478	UP	-	-	1,4050613	UP
Proteoglycan 4 (Lubricin)	PRG4	-2,242639346	DOWN	1,10475139	UP	-2,133762132	DOWN
Rho GTPase-activating protein 28	ARHGAP28	2,792152247	UP	2,540340358	UP	-	-
Serine-protein kinase ATM	ATM	1,093573286	UP	-	-	1,215669678	UP
Structural maintenance of chromosomes protein 4	SMC4	-1,011323927	DOWN	-	-	-1,09124397	DOWN
T-complex protein 1 subunit alpha	TCPI1	1,071702081	UP	-	-	1,050518077	UP
T-complex protein 1 subunit epsilon	CCT5	-3,176902694	DOWN	-	-	-2,933156022	DOWN
Thyroid receptor-interacting protein 11	TRIP11	-1,2902881	DOWN	-	-	-1,367492444	DOWN
Transcription intermediary factor 1-beta	TRIM28	2,025451863	UP	2,444390841	UP	-	-
Transforming acidic coiled-coil-containing protein 2	TACC2	-1,761285991	DOWN	-1,985478034	DOWN	-	-

Triple functional domain protein	TRIO	1,646362843	-	UP	-	1,922007867	UP
Tubulin beta-6 chain	TUBB6	1,774370473	-	UP	-	2,045525689	UP
Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 13	PTPNI3	-1,685528321	-	DOWN	-	-1,751957525	DOWN
U5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa helicase	SNRNP200	-2,534827851	-2,227153954	DOWN	DOWN	-2,130146023	DOWN
Zinc finger CCCH domain-containing protein 13	ZC3HI3	2,040943321	-	UP	-	1,115086084	UP

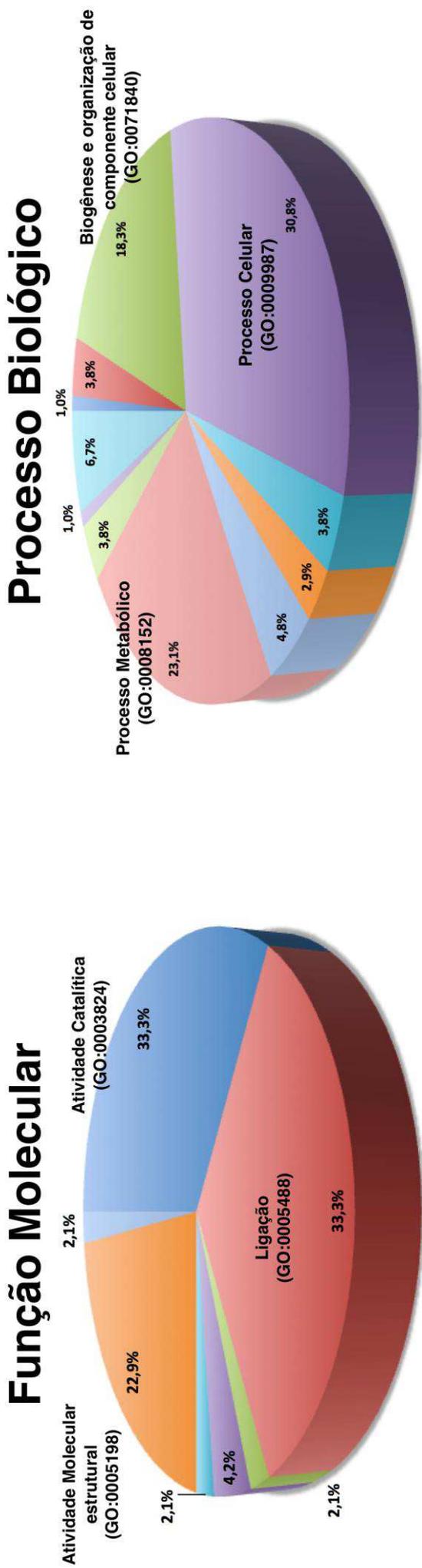
Os nomes de proteínas e os nomes de genes das proteínas expressas de forma diferente para cada condição são mostrados em ordem alfabética, seguidos de seus *foldLog2* e *status*.

Fonte: elaborado pelo autor

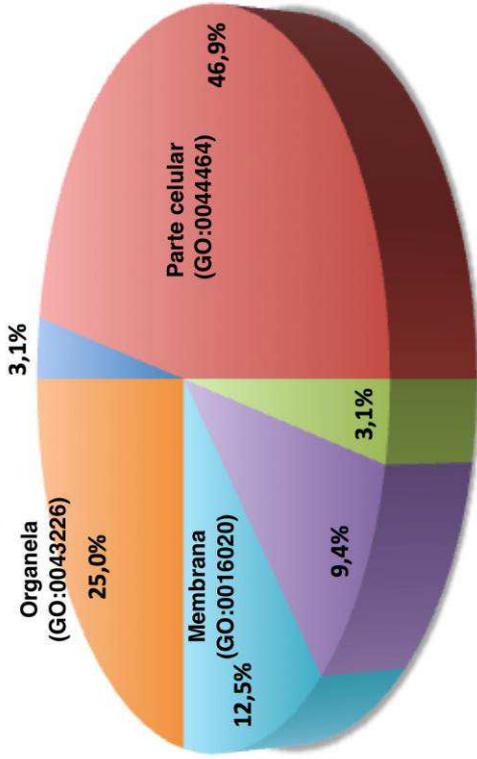
As proteínas diferencialmente expressas no tratamento com PTC em 24 horas são representadas na ontologia pela figura 27. Para função molecular, 33,30% das proteínas foram classificadas como de ligação, 33,30 e 22,00% para atividade catalítica e atividade molecular estrutural, respectivamente. Para processo biológico, 30,80% das proteínas foram classificadas como processo celular, 23,10 e 18,30% para processo metabólico e biogênese e organização de componente celular, respectivamente. Para componente celular, 46,90% das proteínas foram classificadas como parte de célula, 25,00 e 12,5% para organela e membrana, respectivamente. Para classe de proteínas, 22,4% das proteínas foram classificadas para ligação de ácidos nucléicos, 20,40% para proteínas do citoesqueleto e 10,20% para transferases. Para vias de atuação, 7,9% das proteínas foram classificadas para replicação do DNA e 7,90% para vias de regulação do citoesqueleto pela Rho GTPase, 6,30% para inflamação mediada por vias de sinalização quimiocinas e citocinas e 6,30% para via de sinalização de integrinas.

Para as proteínas no tratamento com o PTC (+) em 48 horas, as proteínas diferencialmente expressas não foram significativamente relevantes para estudos em ontologia.

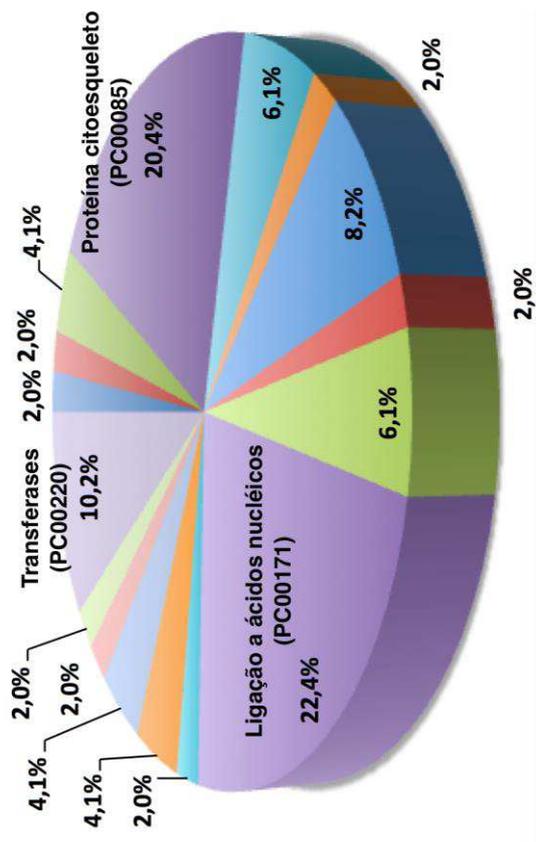
Figura 27 - Representação gráfica da classificação de proteínas superexpressas durante 24 horas classificadas de acordo com a função molecular, processo biológico, componente celular, classe proteica e vias.



Componente Celular



Classe de Proteínas



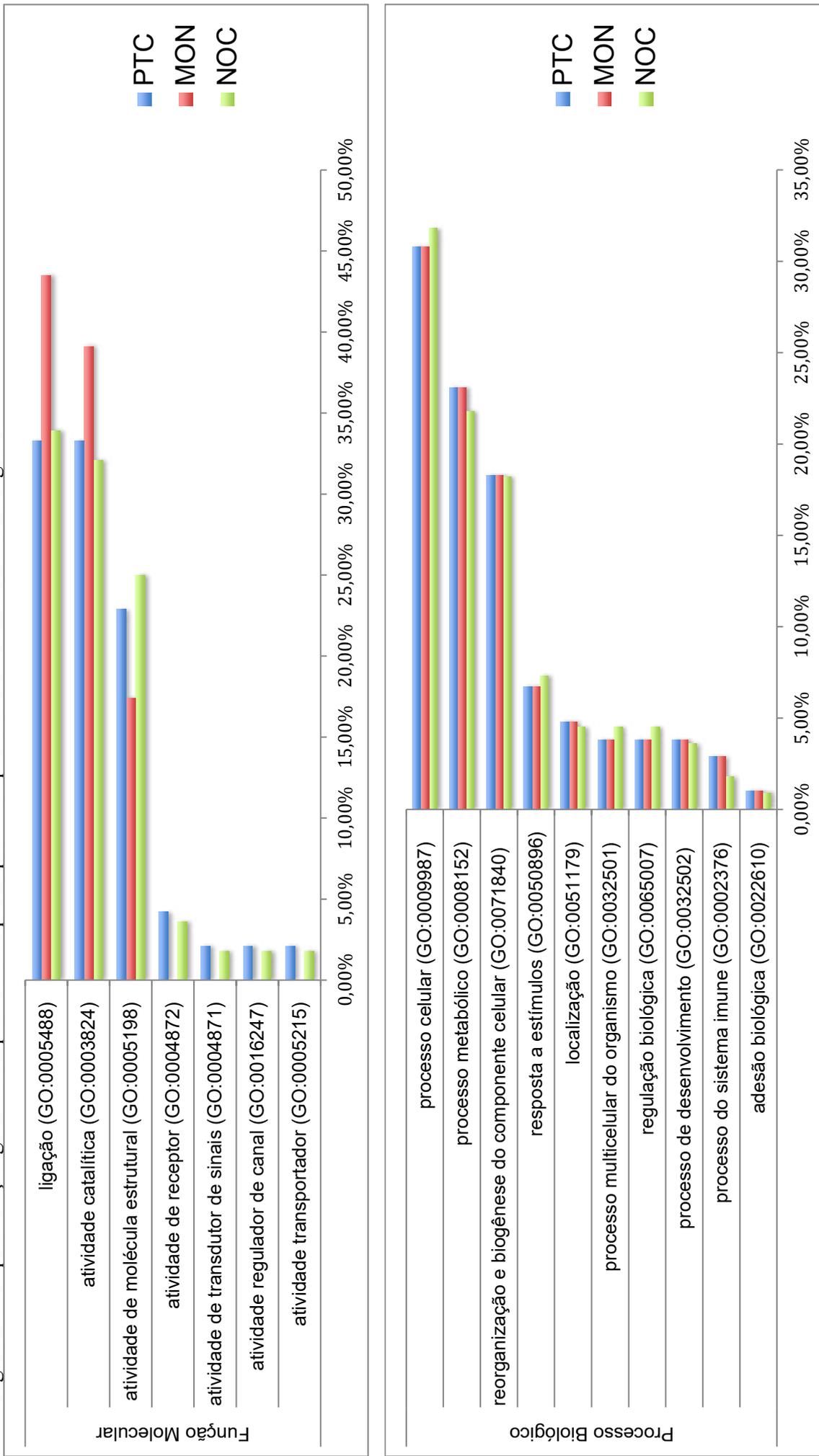
A fim de comparar a o perfil protéico do PTC (+) com aqueles obtidos para os controles positivos (Monastrol e Nocodazol), a Figura 28 mostra quantitativamente a comparação com os perfis das drogas de referência. Para função molecular, as funções mais representativas dos perfis, nas três condições (PTC, MON e NOC), foram para proteínas de ligação, para atividade catalítica e para atividade estrutural. Os percentuais de MON foram bem diferentes dos percentuais que o PTC e NOC apresentaram, chegando a ser 0 % para as demais funções.

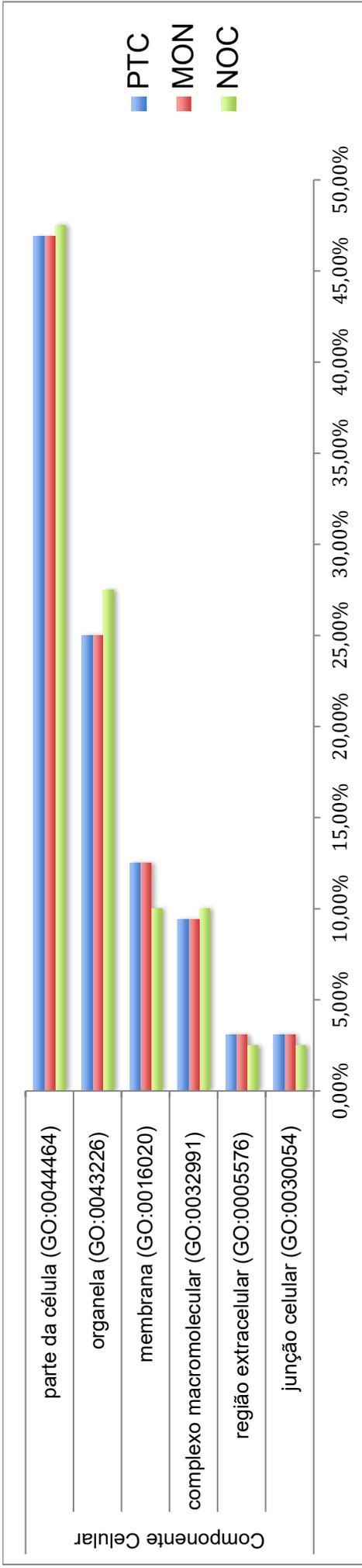
Para processo biológico, praticamente, os perfis das três condições foram idênticas, destacando, em sua maioria, processo celular, metabólico e reorganização e biogênese do componente celular. Para componente celular, os perfis também mostraram similaridade para localização dessas proteínas diferencialmente expressas.

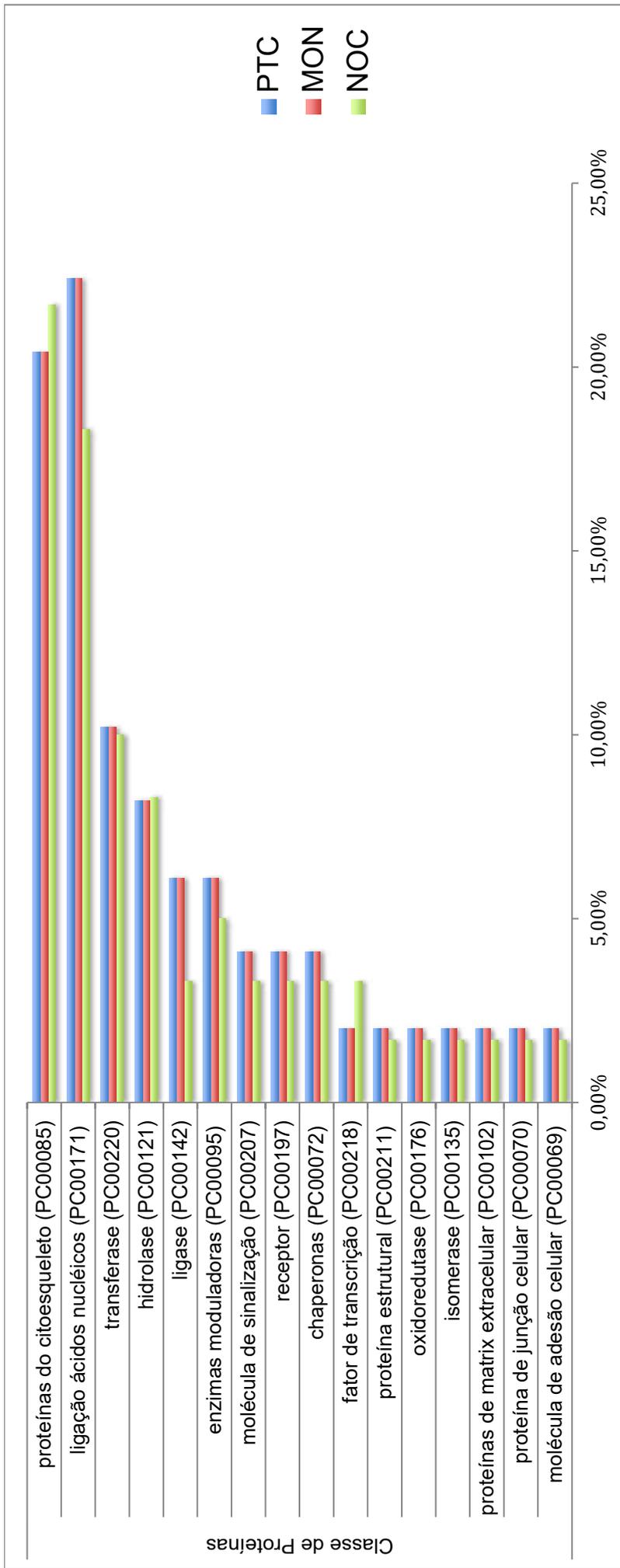
Para classificação de classe de proteínas, é importante destacar que a maioria das proteínas diferencialmente expressas nas três condições foram classificadas como proteínas envolvidas com citoesqueleto, sendo este o alvo importante no mecanismo de ação das substâncias controle (MON e NOC) e para a substância em estudo (PTC).

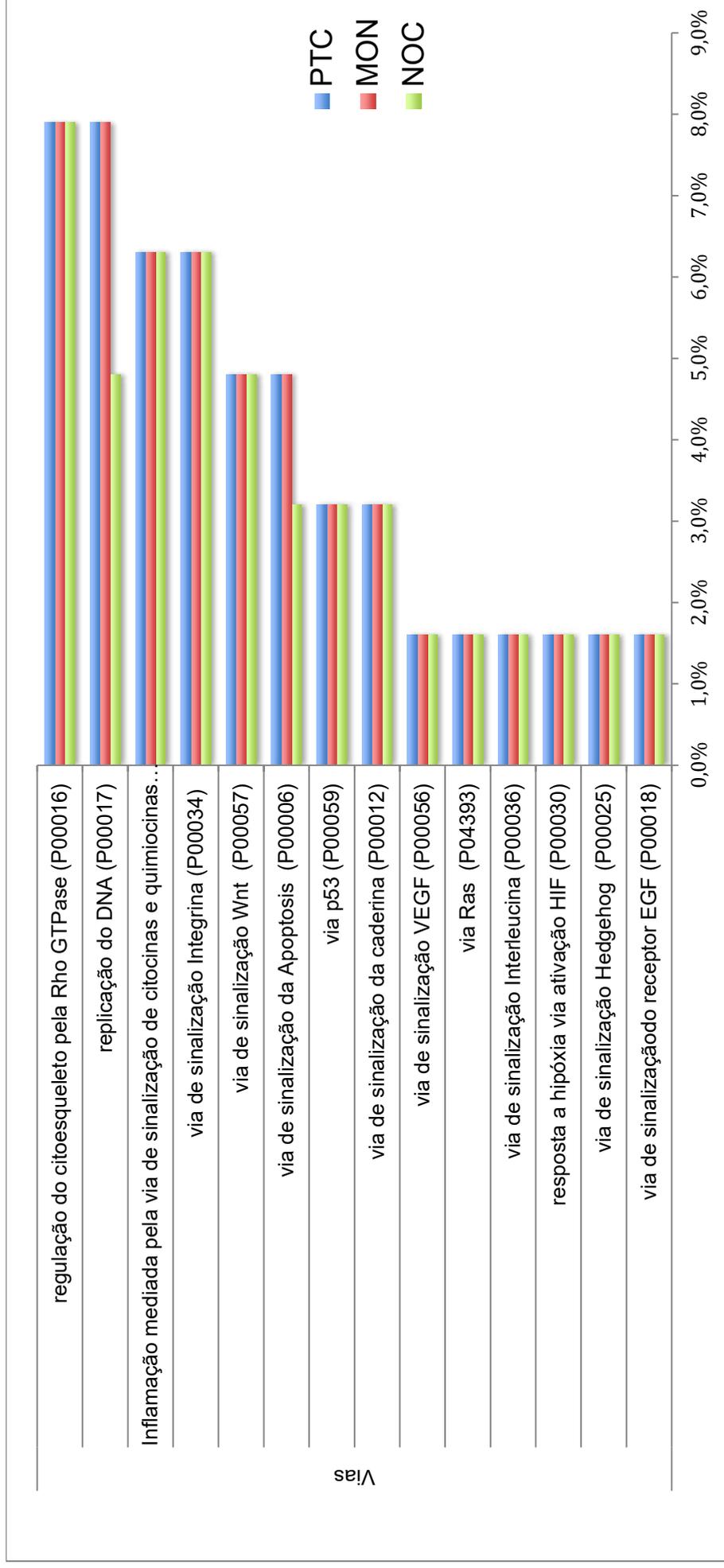
Interessantemente, os perfis proteicos foram muito similares ao que foi encontrado para as vias de sinalização, principalmente para vias de regulação do citoesqueleto pela Rho GTPase. Logo, conclui-se que o resultado do perfil proteico gerado após tratamento, corresponde ao esperado para substâncias anti-mitóticas - proteínas diferencialmente expressas envolvendo o citoesqueleto, como importante rede de componentes celulares responsáveis nos processos mitóticos e, conseqüentemente na patogênese do câncer.

Figura 28 - Representação gráfica comparativa dos perfis proteicos para as classes em termos ontológicos









(Função Molecular, Processo Biológico, Componente Celular, Classe de Proteínas e Vias) de proteínas diferencialmente expressas nas três condições de tratamento (Pterocarpano (+) - PTC, Monastrol - MON e Nocodazol - NOC) durante 24 horas em PC3. GO: IDs *Gene Ontology*. P: IDs *Panther*.

Fonte: elaborado pelo autor

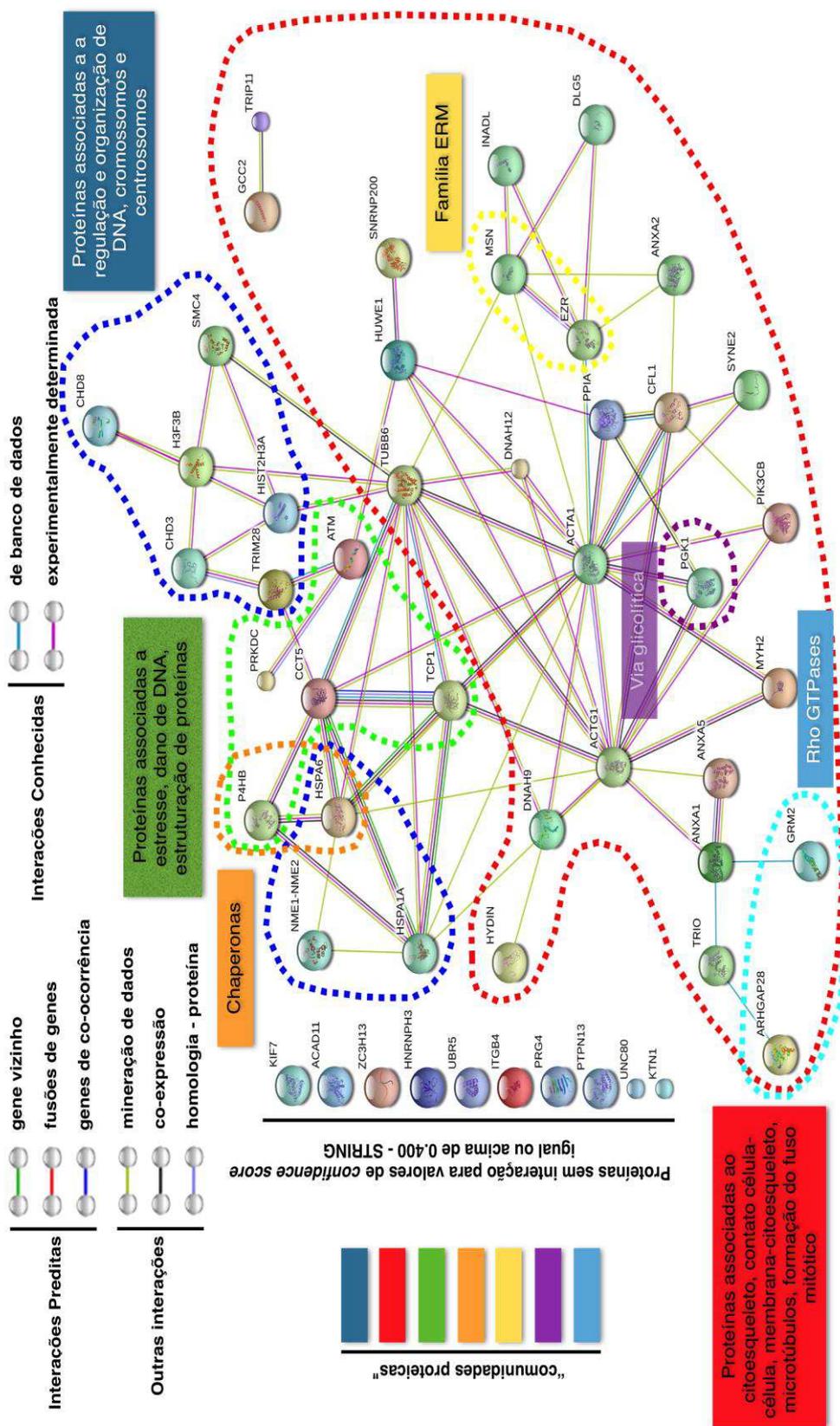
4.9 Interação proteína-proteína (Interatoma)

Uma vez listadas as proteínas que apresentaram diferenças de expressão no tratamento com PTC durante 24 horas, foi, então, construída uma rede interatômica (superexpressas e subexpressas Figura 29). Para a execução dessa atividade, foi utilizada a ferramenta STRING, a qual consiste em banco de dados que contêm interações previstas entre proteínas.

As interações foram estabelecidas utilizando-se diversos parâmetros, que incluem as associações diretas (físico) e indiretas (funcional), provenientes de quatro fontes: o contexto genômico, por experimentos, co-expressão e relatos da literatura acerca das proteínas.

Para melhor visualizar as interações e perfis proteicos, quando se analisa o interatoma, as “comunidades proteicas”, no tratamento com PTC durante 24 horas (superexpressas e subexpressas) foram representadas, respectivamente na figura 29. Essas representações são de grande interesse, uma vez que facilitam a correlação das ações proteicas com os putativos efeitos da droga avaliada nesta tese. Para representar a rede de interação das proteínas observadas nas células tratadas com PTC decorridas 24 horas, foram utilizadas proteínas diferencialmente expressas, cujo o *p-value* foi $3.75e^{-12}$, e com 50 nós nas interações observadas.

Figura 29 - Interatoma no tratamento com PTC (+) durante 24 horas em células PC3 para as proteínas diferencialmente expressas.



(Função Molecular, Processo Biológico, Componente Celular, Classe de Proteínas e Vias) de proteínas diferencialmente expressas nas três condições de tratamento (Pterocarpano (+) - PTC, Monastrol - MON e Nocodazol - NOC) durante 24 horas em PC3. GO: IDs *Gene Ontology*. P: IDs *Panther*.

Fonte: elaborado pelo autor

ARHGAP28: Proteína de atividade GTPase Rho; *HNRNPH3*: Ribonucleoproteína nuclear heterogênea H3; *HSPA1A*: Proteína *heat shock* 70 kDa 1; *ZC3H13*: Proteína 13 contendo domínio CCCH *Zinc finger*; *TRIM28*: Fator de transcrição intermediário 1-beta; *HYDIN*: Proteína homóloga *Hidrocephalus*; *ACTG1*: Actina citoplasmática (actina gama); *NME1-NME2*: Quinase difosfato nucleosídica; *TUBB6*: Tubulina beta 6; *MSN*: Moesina; *TRIO*: Proteína de domínio funcional triplo; *KTNI*: Receptor P4HB: Proteína disulfeto-isomerase Quinesina *Kinectin*; *HIST2H3A*: Histona H3.2; *HSPA6*: Proteína *heat shock* 70 kDa B'; *UNC80*: Proteína homóloga unc-80; *KIF7*: Proteína *Kinesin-like* KIF7; *P4HB*: Proteína disulfeto-isomerase; *INADL*: Proteína *InaD-like*; *CHD8*: Proteína 8 de ligação-Chromodomain-helicase-DNA; *HUWE1*: Proteína ligase ubiquitina E3; *ATM*: Proteína quinase; *ANXA2*: Anexina 2; *H3F3B*: Histona H3; *TCPI*: Proteína complexo-T subunidade alfa 1; *SMC4*: Proteína 4 de manutenção estrutural dos cromossomos; *ANXA5*: Anexina A5; *DNAH9*: Dineína cadeia pesada 9, axonemal; *TRIP11*: Proteína 11 de interação com receptor tireoidiano; *FAM179B*: Isoforma CRA_a; *GCC2*: Proteína 2 contendo o domínio coiled-coil e GRIP; *PIK3CB*: Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato 3-kinase; *GRM2*: Receptor 2 do glutamato *Metabotropic*; *SYNE2*: Nesprina 2; *ACAD11*: membro da família 11 desidrogenase acil-CoA; *MYH2*: Miosina 2 (cadeia pesada 2); *CFL1*: Cofilina 1; *PTPN13*: Proteína tirosina fosfatase; *TACC2*: Proteína 2 contendo domínio *coiled-coil* ácido transformante; *EZR*: Ezrina; *ITGB4*: Integrina beta-4; *PGK1*: Quinase fosfoglicerato 1; *PRKDC*: Proteína quinase dependente de DNA; *UBR5*: Proteína ligase ubiquitina E3; *PRG4*: Proteoglicano 4 (*Lubricin*); *ANXA1*: Anexina A1; *DNAH12*: Dineína de cadeia pesada 12, axonemal; *SNRNP200*: Pequena ribonucleoproteína U5; *ACTA1*: Actina de músculo esquelético sub, alfa 1; *CHD3*: Proteína 3 de ligação ao DNA *Chromodomain-helicase*; *PPIA*: Ciclofilina A; *DLG5*: Proteína homóloga 5; *CCT5*: Proteína 1 do complexo T.

5 DISCUSSÃO

O câncer é uma doença multifatorial, representando uma das principais causas de mortalidade no mundo. Apesar de existirem consideráveis esforços nas últimas décadas para melhorar as opções terapêuticas disponíveis, entretanto existe o pequeno número de agentes antineoplásicos e quimioterapêuticos identificados e utilizados com sucesso na prática clínica. Novas opções terapêuticas para tratar o câncer são prioridade para a maioria das empresas farmacêuticas e organizações de pesquisa independentes em todo o mundo. O que se busca é a identificação de moléculas mais promissoras com maior eficácia e menos efeitos colaterais tóxicos/adversos. No entanto, a maioria dos agentes anticâncer exibem janela terapêutica estreita, devido a falta de seletividade contra as células tumorais (Shengquan; Ngong, 2013; Kratz *et al.*, 2008).

O câncer de próstata é o segundo câncer mais comumente diagnosticado em homens e responsável por 250.000 mortes por ano. Apesar da terapia de privação de andrógenos provocando remissão rápida, os tumores inevitavelmente reincidem, como células tumorais mais resistente a castrações (*castrate-resistant prostate cancer* - CRPC), que, muitas vezes, permanece dependente de andrógeno e é essencialmente intratável. O desenvolvimento de novas terapêuticas é prejudicado em parte devido à alta heterogeneidade clínica, biológica e à falta de subtipos histológicos distintos. No entanto, com o advento das “ômicas”, os estudos da Genômica, Epigenômica e Proteômica, de forma integrada, estão impulsionando o aumento na probabilidade de classificar molecularmente os subtipos definidos. A correlação estrita com o resultado clínico permanece indescritível, os tumores podem agora ser classificados pelo número de cópias do seu genoma, perfis de genes de fusão, *landscapes* mutacionais ou até mesmo padrões de *splicing* de mRNA (Grasso *et al.*, 2012; Taylor *et al.*, 2010). Diante de toda essa variabilidade tumoral, as linhagens de câncer de próstata tornam-se os protagonistas do estudo desta tese, com enfoque na linhagem de PC3. Vale destacar que essa linhagem é independente de andrógeno (Peehl *et al.*, 2005), com alto poder invasivo e com comportamento similar ao que acomete os tumores em humanos após ao tratamento de deprivação hormonal.

Diante do exposto, há necessidade de desenvolver novos agentes quimioterápicos que sejam eficazes e seguros (Sporn; Liby, 2005). A abordagem prática para este problema é o uso de produtos naturais, particularmente as plantas terrestres como plataformas/bases para a inspiração ao desenvolvimento de novos fármacos.

Há atenção cada vez maior e mais poderosa para revisitar produtos naturais na descoberta de fármacos. Historicamente, os produtos naturais oriundos de plantas e animais

foram à fonte de origem de praticamente todos os medicamentos. Particularmente para os agentes anticâncer, podemos destacar que, os produtos naturais continuarão a ingressar em ensaios clínicos ou a fornecer pistas para compostos que entraram/entrarão naqueles ensaios (Dias; Urban, 2012; Harvey; Gericke, 2011). A maioria das novas drogas surge a partir de algum produto natural (metabólitos secundários) (Cragg; Newman, 2005), resultando na produção de substâncias fortemente bem-sucedidas (Zhou; Xie; Tang, 2008).

É importante destacar que os produtos farmacêuticos gerados a partir de plantas têm uma longa história de uso no tratamento do câncer. Uma revisão mostra um painel de plantas usadas contra o câncer e lista mais de 3.000 espécies (Kaur *et al.*, 2011). A descoberta de fármacos baseada em espécies vegetais resultou no desenvolvimento de muitos fármacos anticâncer atualmente em uso clínico. Além disso, essa fonte fornece plataforma para prospecção de novas moléculas e que sejam mais seguras por meio da compreensão adequada da complexa interação sinérgica dos vários constituintes existentes no microambiente tumoral.

A pesquisa desenvolvida no âmbito desse estudo foi primordialmente obtida a partir de fonte natural para obtenção do protótipo do composto avaliado nesta tese (PTC), da planta *Platymiscium floribundum*. O isolamento e a utilização da mistura racêmica foram inicialmente caracterizadas por estudos biológicos para atividades anti-proliferativas em diversas linhagens leucêmicas e em linhagens de tumores sólidos (Militão *et al.*, 2006; Militão *et al.*, 2007a; Militão *et al.*, 2007b; Militão *et al.*, 2014). Acrescentados aos estudos mais recentes realizados por Meira, 2016 nos quais tanto a mistura racêmica quanto com os compostos dextrógiro (+) e levógiro (-) foram utilizados e testados contra um painel de linhagens tumorais, cujo os resultados inspiraram a continuidade da pesquisa, onde, neste trabalho, a caracterização fenotípica e os perfis proteicos sob o tratamento para PC3 foram determinados, utilizando somente o composto dextrógiro, ou seja, o PTC (+).

O grupo químico dos pterocarpanos possui diferentes atividades biológicas, podendo ser destacado a sua importância para a atividade anticâncer, em linhagens leucêmicas e tumorais sólidas como o câncer de mama e de melanoma (Falcão *et al.*, 2005; Militão *et al.*, 2006; Militão *et al.*, 2007a; Militão *et al.*, 2007b; Militão *et al.*, 2014). A atividade citotóxica de quatro pterocarpanos (1-4) isolados da planta *Platymiscium floribundum* foi investigada contra células de leucemia promielocítica humana (HL-60) (Falcão *et al.*, 2005; Militão *et al.*, 2006). Estes estudos mostram que os pterocarpanos reduziram a viabilidade celular em 52,5-72,1% numa concentração de 12,5 µg/mL. Os resultados obtidos anteriormente, mostraram a inibição da síntese de DNA e a interrupção da integridade da membrana nas células HL-60.

Em outro estudo realizado por Militão *et al.*, 2007a foi investigado se o PTC (+/-) (1) apresentava atividade citotóxica em quatro linhagens celulares de leucemia (HL-60, Molt-4, Jurkat e K562). Foi possível identificar a atividade anti-proliferativa na célula K562 após 48 horas de incubação com $IC_{50} = 0,8 \mu\text{g/mL}$. Posteriormente, no estudo de Militão *et al.*, 2014 foi identificado que os pterocarpanos induziram parada no ciclo celular em prometáfase e bloquearam a segregação dos centrossomos nas linhagens de células de câncer de mama (MCF-7, T47d e HS578T). Os resultados com PTC (+/-), na concentração de $8 \mu\text{M}$, mostraram potência máxima, levando a formação de células multi-nucleadas, formação de células em monopólos e apoptose.

Neste trabalho, o estudo foi realizado usando o pterocarpano (+) contra as linhagens de próstata, o qual apresentou potencial efeito antiproliferativo e inibiu a proliferação celular em PC3 ($7,95 \mu\text{M}$), LNCaP ($5,6 \mu\text{M}$) e RWPE1 ($3,62 \mu\text{M}$). Por outro lado, foi observado fraca atividade contra as células DU145 ($32,51 \mu\text{M}$).

Nos trabalhos publicados utilizando substâncias do grupo dos pterocarpanos tais como a substância 3(S),4(S)-3'-methoxy-4'-hydroxy-7,8,-methylenedioxypterocarpan testada contra a linhagem de câncer de próstata (PC3) a IC_{50} foi de $3,5 \mu\text{M}$ (Niu *et al.*, 2013). Enquanto, no trabalho de Iranshahi *et al.*, 2012, onde as substâncias *phaseollin* e *phaseollidin*, extraídas da planta *Erythrina vespertilio*, mostraram efeito citostático contra PC3, com IC_{50} na concentração de $10 \mu\text{M}$ para ambas. Por outro lado, estudos utilizando a substância LQB-118 mostraram atividade contra PC3, na concentração de $1,7 \mu\text{g/mL}$ reduzindo o crescimento celular em 60%, 68% e 60%, nos intervalos de 24, 48 e 72 h incubação respectivamente, enquanto que na concentração de $5 \mu\text{g/mL}$ reduziu 78%, 88% e 93% o crescimento celular em 24, 48 e 72 h, respectivamente (Martino *et al.*, 2014). Além disso, o LQB-118 mostrou efeitos anti-proliferativos contra LNCaP e RWPE1, com valores de IC_{50} de $1,1 \mu\text{g/mL}$ e $2,5 \mu\text{g/mL}$, respectivamente.

O potencial antiproliferativo dos pterocarpanos pode ser reforçado por Yoon *et al.*, (2016) em que o composto *2,3-dehydrokievitone*, isolado das folhas de *Maackia fauriei*, mostrou atividade antiproliferativa contra as linhagens de PC3 e LNCaP, com IC_{50} de $11,06$ e $20,20 \mu\text{M}$, respectivamente, e induzindo apoptose somente em PC3. Além do pterocarpano *Maackiain* obtido de *Lonchocarpus* aff. *Fluvialis*, cuja IC_{50} foi de $37 \mu\text{M}$ para a linhagem de LNCaP também foi evidenciado (Blatt *et al.*, 2002) Esse dados, são reforçados por outro pterocarpano conhecido, como Cajanol isolada de raízes de *Pigeonpea* [*Cajanus cajan*] e

testada contra PC3, apresentando valores de IC₅₀ de 30,11; 26,08 e 21, 29 µM em 24, 48 e 72 h, respectivamente, levando as células à apoptose (Liang *et al.*, 2013).

Em relação a outras linhagens tumorais, Kuete *et al.*, (2014) avaliaram dois pterocarpanos (*Sophorapterocarpin A* e *6α-hydroxyphaseollidin*), isolados da planta *Erythrina sigmoidea*, contra linhagem de leucemia sensível a drogas (CCRF-CEM), observou que induzia apoptose, com IC₅₀ de 3,73 e 3,36 µM, respectivamente. Já no trabalho de Salaustiano *et al.*, (2010) quatro pterocarpanos sintéticos (*pentacyclic naphthoquinones*, 1, 2, 3, 4) foram testados contra duas linhagens leucêmicas (K562 e Lucena-1) com IC₅₀ de (1) 4,63: 5,47µM; (2) 2,18; 2,57µM; (3) 4,50; 4,49µM; (4) 3,46; 3,64 µM, respectivamente. O trifolirizin, pterocarpano, isolado das raízes de *Sophora flavescens* mostrou efeitos antiproliferativos, quando testados nas linhagens A2780, carcinoma de ovário, e H23, carcinoma de pulmão, em concentração superior a 100 µM (Zhou *et al.*, 2009).

No trabalho de NETTO *et al.*, (2010) a substância sintética *pterocarpanquinone* foi analisada contra quatro linhagens leucêmicas (Lucena-1 2,75 µM; Raji 3,32 µM; Jurkat 3,10 µM; Daudi 3,10 µM) e contra três linhagens de câncer de pulmão (A549 11,21 µM; H460 12,86 µM; GLC-4 5,17 µM), inibindo a proliferação nessas linhagens. Ainda, Nestal *et al.*, (2014) trabalharam também com a substância sintética *pterocarpanquinone*, testando contra a linhagem K562 e apresentando IC₅₀ de 6,0 µM.

Netto *et al.*, (2009) avaliaram um pterocarpano isolado de *Petalostemon purpureus* (R¹=OH, R²=H, R³=R⁴=OCH₂O) contra cinco linhagens leucêmicas (K562 3,0 µM; Lucena-1 3,7 µM; HL-60 2,1 µM; Jurkat 7,6 µM; Daudi 2,8 µM), inibindo a proliferação nessas linhagens. No estudo de Buarque *et al.*, (2011) a substância sintética *pterocarpanquinone* foi estudada também contra outras linhagens tumorais (HL-60 1,3 µM; K562 1,67 µM; HCT-8 2,6 µM; SF-295 3,6 µM; MDA-MB435 2,3 µM), inibindo a atividade neoplásica em células de leucemia (HL-60 e K562), de cólon (HCT-8), de glioblastoma (SF-295) e de melanoma (MDA-MB 435). Buarque *et al.*, (2014) publicaram resultados com a substância sintética *Aza-deoxi-pterocarpan*, onde foi testada contra a linhagem leucêmica K562 (2,90 µM) e contra duas linhagens leucêmicas resistentes a multi-drogas (Lucena-1 2,49 µM; FEPS 2,12 µM), inibindo a duplicação do DNA e com parada do ciclo celular em G₂/M.

Outros trabalhos como o de Harinantenaina *et al.* (2010) estudaram três pterocarpanos (16, 17, 18) isolados de *Pongamiopsis pervilleana*. A inibição da proliferação contra linhagem tumoral de ovário (A2780) foi evidente, apresentando IC₅₀ de 16: 26,5 µM, 17: 23,2 µM e 18: >54,4 µM. Já BASSET *et al.*, (2012) avaliaram a substância *Spirotropin A* isolada

de planta *Spirotropis longifolia* Baill contra células de câncer cervical, inibindo a proliferação celular em 56 % com IC₅₀ de 10⁻⁵ M.

SAKURAI *et al.*, (2006) analisaram dois pterocarpanos (Rautandiol A e Rautandiol B) isolados da planta *Neorautanenia mitis*. Esses compostos apresentaram atividade contra linhagens de células tumorais de mama e de pulmão (IC₅₀ > 5 µg/mL).

LI *et al.*, (2008) isolaram *Tonkinensines* B da leguminosa *Sophora tonkinensis*, que inibiu de forma moderada a atividade na proliferação celular em HeLa (24,3 µM) e de mama MDA-MB-231 (48,9 µM).

A recente pesquisa do *indigocarpan* isolado da planta *Indigofera aspalathoides* inibiu a proliferação das linhagens A549 (carcinoma de pulmão), MCF-7 (câncer de mama), MIAPaCa-2 (carcinoma pancreático) e LS174T (adenocarcinoma de cólon humano) com valores de IC₅₀ de 250, 250, 210 e 180 µM, respectivamente (Mahajan *et al.*, 2016).

Erybraedin C e *bitucarpin* A, dois pterocarpanos purificados de *Bituminaria bituminosa*, induziram apoptose em linhagem de adenocarcinoma de cólon (LoVo e HT29), fornecendo forte evidência de que a *erybraedin* C pode atuar como um composto inibidor de crescimento (Maurich *et al.*, 2006).

Levando-se em consideração a forte atividade citotóxica e cistostática apresentadas pelos compostos, como já referenciado na literatura, a parada no ciclo celular é outro resultado importante observado nas pesquisas, quando se quer determinar em qual fase do ciclo a droga age. Ensaios de citometria de fluxo reforçam esses achados. Aqui, o pterocarpano (+) foi testado contra a linhagem tumoral PC3 durante 24 horas, causando parada do ciclo em G₂/M (85% das células).

Resultados similares foram encontrados na análise do ciclo celular realizado no estudo de Militão *et al.*, (2014) utilizando a mistura racêmica, ou seja, o PTC (+/-). No tratamento durante 24 horas, a concentração de 8 µM foi utilizada contra a linhagem tumoral de mama (MCF-7), revelando aumentos nas frequências em G₂/M (32%), corroborando com os achados morfológicos contidos no estudo. Porém, utilizando o composto dextrógiro – PTC (+), aqui, em PC3, o aumento na frequência de G₂/M foi mais significativo.

Análises do ciclo celular da substância LQB-118, um pterocarpano, contra a linhagem de próstata PC3 por 48 horas mostrou que, para as concentrações de 1,7 e 5 µg/mL, o número de células nas fases G₁ foi reduzido em 19% e 42%, respectivamente. Foi observado também aumento de células na fase S em 40% e 126%, respectivamente, e, em 53%, para ambas

concentrações na fase G₂/M (MARTINO *et al.*, 2014). Esses achados sugerem parada na proliferação celular na fase S e G₂/M, levando a crer potenciais efeitos anti-proliferativos.

Ainda, no trabalho da substância Cajanol, o ciclo celular das células de PC3 foi analisado após tratamento de 48 horas. Após o tratamento, o Cajanol teve efeito significativo na distribuição do ciclo celular. As concentrações 20 µM e 30 µM aumentaram significativamente as células na fase G₂/M (49,61% e 67,61%, respectivamente) e diminuíram a percentagem de células na fase G₁ (36,78% e 11,11%, respectivamente), mas não alteraram significativamente a percentagem de células na fase S (13,61% e 21,28%, respectivamente). Isso mostra que o Cajanol pode induzir a apoptose em células PC3 (Liang *et al.*, 2013).

No mesmo trabalho de BUARQUE *et al.*, (2014) a substância sintética *Aza-deoxy-pterocarpan* foi testada para quantificação de células em cada fase do ciclo contra linhagens de K562, Lucena-1 e FEPS durante 24 horas. Os valores percentuais variaram em relação a cada linhagem tumoral. Para a linhagem de K562, o percentual foi de 31,24% de células em G₂/M, para a linhagem de Lucena-1, o percentual de células foi maior na fase em G₂/M (44,02%) e, na linhagem FEPS, predominaram as células em fase G₀/G₁ (29,06%). Por outro lado, em 48 horas, a linhagem FEPS apresentou maior percentagem em G₂/M (33,89%). Esses achados se devem ao maior tempo de ciclo celular da linhagem FEPS e também pela maior fragmentação do DNA encontrado no experimento (maior percentual de células em apoptose). Estudos realizados por Marcus *et al.*, (2005) mostraram forte ação na parada do ciclo celular em linhagem derivada de tumor ovariano resistente ao Taxol (PTX10), onde a substância A1 (1µM) inibidora de Eg5, no intervalo de 16 horas até 24 horas, causou expressivo aumento na população de células em G₂/M.

A substância *indigocarpan* isolada da planta *Indigofera aspalathoides* foi analisada para o ciclo celular em células de adenocarcinoma de cólon humano - LS174T. As células foram tratadas nas concentrações 180 µM e 300 µM durante 24 horas. Os resultados mostraram predominância das células em fase G₁ e sub-G₀ (apoptose), confirmado o achado após a realização de microscopia de fluorescência para avaliação da integridade da cromatina, evidenciando fragmentação (Mahajan *et al.*, 2016).

A quantificação por meio da curva de crescimento celular, através de metodologia não invasiva, e que permitisse coletar o máximo de informações temporais possíveis, foi essencial para caracterizar o comportamento e proliferação celular. Ademais, permitiu avaliar a disposição e fenótipos das células submetidas ao tratamento com PTC (+). O método escolhido para este fim é baseado em sensor de impedância para substratos-celulares e realizado

com o auxílio da plataforma *xCELLigence* (Giaever; Keese, 1993). O resultado do ensaio realizado com a molécula PTC (+) foi consistente com aquilo encontrado na literatura (Meira, 2016; Militão *et al.*, 2006). Aqui, o pterocarpano dextrógiro foi testado na concentração de 7,95 μM na linhagem de PC3 por mais de 78 horas. A inibição do crescimento foi similar ao que foi descrito por Meira, (2016) onde foi testado o mesmo pterocarpano PTC (+) nas concentrações 1, 2 e 4 μM durante 24 horas em duas linhagens tumorais OVCAR-8 (carcinoma de ovário) e SF295 (glioblastoma), na qual, a inibição do crescimento foi semelhante ao paclitaxel, na concentração de 0,5 μM . Aqui o PTC (+), em 7,95 μM , inibiu o crescimento celular em PC3 com atividade similar ao que foi encontrado no tratamento com Monastrol (50 μM) e Nocodazol (0,25 μM). Interessantemente, a fim de esclarecer o aumento da impedância que se inicia a partir do intervalo de 58 e 78 horas, a marcação para actina (*FITC-phalloidin*) e DNA (Hoechst 33258), por imunofluorescência foi realizada. Sob análise, as células apresentaram multinucleação, com núcleos, por vezes, de tamanhos variados e tamanho celular aumentado, com forte polarização de actina. No trabalho de Militão *et al.*, (2014) a multinucleação e aumento o tamanho celular também foram revelados no tratamento com PTC (+/-) em linhagem de mama. Esses resultados se devem ao fato do corpo celular poder se estender em tamanho, causando aumento na impedância e, conseqüentemente, o aumento no índice celular (*cell index*). Resultados similares para a relação entre o aumento do *cell index* e o tamanho celular foram encontrados por Moodley *et al.*, (2011) onde o sistema *xCELLigence* foi utilizado, para confirmação de diferenciação da linhagem de neuroblastoma (SH-SY5Y).

Com auxílio da plataforma *xCELLigence*, no trabalho de Iranshahi *et al.*, 2012, onde as substâncias *phaseollin* (10 μM) e *phaseollidin* (10 μM), ambas extraídas da planta *Erythrina vespertilio*, foram testadas contra a linhagem de PC3 e, ambas, apresentaram significativa atividade anti-proliferativa, onde o composto *phaseollidin* (10 μM) apresentou atividade semelhante à atividade do taxol (0,6 μM) e, mais tardiamente

Posteriormente foram realizados estudos para a caracterização de fenótipos celulares utilizando o pterocarpano. Os resultados preliminares foram realizados por Militão *et al.*, (2014) ,onde o PTC (+/-) (8 μM) testado durante 24 horas contra a linhagem tumoral de mama (T47D) para a caracterização dos possíveis efeitos no citoesqueleto. Foi observado a distribuição dos cromossomos em forma de anel ao redor de um único pólo central, por vezes de forma assimétrica, com distribuição dos microtúbulos irradiando do centro em direção ao córtex celular. Essa configuração é característica em monopólos ou em fuso monopolar (*monopolar*

spindles), porém sem alterar o arcabouço de actina. Foi visto, bloqueio na separação de centrossomos duplicados, o que é um passo crucial na biogênese de fusos mitóticos normais, levando a falhas neste processo. Isso pode conduzir à morte celular ou ao aumento das frequências de células multinucleadas e aneuplóides (Musacchio; Salmon, 2007), causando ativação do SAC (*spindle assembly checkpoint*) e, conseqüente parada do ciclo celular com ativação do processo de catástrofe mitótica (Tillemont *et al.*, 2009).

Em conseqüência nas análises realizadas, utilizando dextrógiro PTC (+) (7,95 μM) contra a linhagem tumoral prostática (PC3) durante 24 horas, foi observada a mesma configuração na distribuição de cromossomos e microtúbulos, corroborando com os achados de Militão *et al.*, (2014). Entretanto, a polarização de actina, ou seja, a desorganização do arcabouço de actina foi visível após 56 horas de tratamento com PTC (+) em células de PC3, o que não foi mostrado nos resultados de Militão *et al.*, (2014). Esse achado pode ser explicado pelo tempo de tratamento, ou até mesmo, por ser o composto isolado mais potente do que quando comparado com a mistura racêmica PTC (+/-) utilizada por Militão *et al.*, (2014). Além disso, o PTC (+) (7,95 μM), em PC3, induziu parada na divisão celular em prometáfase, o mesmo achado de Militão *et al.*, (2014) em linhagem de mama. Em contrapartida, estudos realizados por Meira, (2016) demonstraram a disposição de microtúbulos utilizando PTC (+) (5 μM) contra a PC3 em multipólos. Esse estudo compara as imagens com tratamento do monastrol, mostrando a diferença na disposição dos microtúbulos não se equivalendo ao que foi encontrado com o PTC (+). Contudo, o estudo realizado por Meira, (2016) não quantificou os fenótipos encontrados, o que pode ter sido o processo crucial para caracterizar de forma mais minuciosa os achados encontrados. Entretanto, nos experimentos aqui realizados, os fenótipos quantificados observados no controle (DMSO), nos tratamentos com PTC(+) (7,95 μM) e Monastrol (50 μM), os quais mostram a mesma configuração (fusos monopolares) foram os fenótipos mais aparentes. Um pequeno percentual de células com disposição em multipólos também foi encontrada no controle e nos tratamentos com PTC (+) e Monastrol, configuração fenotípica não esperada para esses grupos, porém menos aparentes. Para o Nocodazol (0,25 μM) as células com disposição em multipólos foram identificadas, como esperado. Ainda, é importante destacar a vantagem na potência do PTC (+) em relação ao Monastrol, uma vez que o PTC (+), para o mesmo efeito fenotípico em PC3, além de efeitos antiproliferativos, a concentração é de apenas 7,95 μM , já o Monastrol 50 μM . Em termos de concentração mais baixas afim de obtenção de atividade efetiva, ou seja, antiproliferativa, menos serão os custos na produção do potencial fármaco (fatores econômicos); em ensaios *in vivo*, as possibilidades de

aparecimento de efeitos colaterais e adversos são diminuídos (testes pré-clínicos e clínicos), bem como geração de efeitos em toxicidades neurológicas, renais e hepáticas (Julien, 2013).

Muitos estudos mostram a possibilidade das linhagens tumorais, normalmente, formarem fusos mono ou multipólos. Muitos desses achados são explicados pela presença de múltiplos centrossomos, levando a uma divisão celular errônea e incorreta, com distribuição desigual de cromossomos (Boveri, 1902; Ganem; Storchova; Pellman, 2007; Meraldi; Honda; Nigg, 2002; Storchova; Pellman, 2004), rompendo a divisão celular de forma assimétrica e alterando a diferenciação celular normal, aumentando, assim, a proporção na proliferação de células progenitoras que perpetuam essa condição (Basto *et al.*, 2008). Agora, o porquê dessas células manterem centrossomos extras, ainda, é um mistério (Godinho; Kwon; Pellman, 2009). A hipótese de Boveri, (1902) mostra que os tumores podem se originar de precursores pré-malignos e que a aneuploidia resultante de divisões multipolar em células portadoras de centrossomos supernumerários tem um papel causal na tumorigênese (Boveri, 1929), principalmente no tumor ser mais ou menos agressivo. Muitos estudos mostram essa correlação (Giehl *et al.*, 2005; Levine *et al.*, 1991; Lingle *et al.*, 1998; Pihan *et al.*, 2003; Pihan, 2013). A presença de células com disposição em monopólos e multipólos no controle também deve-se a desregulação de muitos genes implicados nos cânceres humanos, os quais levam à amplificação do centrossomo. Por exemplo, a duplicação de centrossomo pode resultar da mutação do supressor de tumor *p53*, uma alteração genética associada a mais da metade dos tumores humanos (Fukasawa, 2007). Estratégias para a descoberta de compostos que inibam a amplificação/clusterização de centrossomos estão em fase de desenvolvimento (Raab *et al.*, 2012; Rebacz *et al.*, 2007).

Muitos fármacos quimioterápicos são alvo-dirigidos para o fuso mitótico. Por exemplo, compostos que tem como alvos os microtúbulos, como taxanos e alcalóides da vinca, são amplamente utilizados e são eficazes em ampla variedade de cânceres (Jordan; Wilson, 2004). Apesar da sua eficácia, o direcionamento para os microtúbulos, como agentes terapêuticos, afeta não apenas células cancerosas, mas também células de divisão normais, conduzindo a efeitos secundários tóxicos, por exemplo, mielossupressão (supressão de glóbulos brancos e vermelhos) ou toxicidade gastrointestinal. Além disso, esses compostos causam toxicidade em células em intérfase, como neurônios, levando a neuropatia (dano no nervo periférico). Embora a mielossupressão possa, até certo ponto, ser controlada, a neuropatia resultante da inibição da dinâmica de microtúbulos é irreversível e intratável (Mcguire *et al.*, 1989; Rowinsky *et al.*, 1993).

Essas pequenas moléculas que rapidamente ativam e inativam a função desses alvos podem ser úteis como modelos para estudar a dinâmica celular (Mitchison, 1994). Por exemplo, a molécula da colchicina levou a descoberta da tubulina (Borisy; Taylor, 1967; Shelanski; Taylor, 1967) e tem sido utilizada como molécula essencial para controle da polimerização de células em divisão (Inoue; Salmon, 1995). Moléculas como o nocodazol, colcemide e taxol também tem como alvos a tubulina, sendo utilizadas como substâncias que irão perturbar a dinâmica dos microtúbulos. Essas moléculas também fornecem *insights* para monitorar a progressão do ciclo celular (Rieder; Palazzo, 1992; Waters *et al.*, 1998). O nocodazol aqui foi utilizado como controle para parada do ciclo celular, gerando o fenótipo de multipólos em células de PC3.

Além desse, outro alvo de drogas atualmente estudada é a enzima quinesina (*Kinesin*). A quinesina é uma enzima mecânico-química que usa ATP para gerar força e também é utilizada com alvo de drogas como proteína importante para formação do fuso mitótico. Muitas quinesinas são essenciais para a divisão celular e emergiram recentemente como uma classe alvo promissora "druggable" (Wood; Cornwell; Jackson, 2001). Os inibidores da quinesina-5 (Eg5) são alguns dos primeiros inibidores mitóticos avaliados na clínica. A Eg5 é uma quinesina essencial e necessária para a montagem do fuso bipolar (Slangy *et al.*, 1995). Mayer *et al.*, (1999) identificaram o monastrol, inibidor específico da Eg5. Muitos estudos da estrutura e dos mecanismos enzimáticos motores de quinesina forneceram a base para o desenvolvimento de inibidores químicos específicos (Bergnes; Brejc; Belmont, 2005). De fato, novos inibidores de Eg5 estão atualmente sendo testados como potenciais agentes quimioterapêuticos e, embora pareçam ter pouca toxicidade nos doentes, ainda é desconhecido, se eles serão eficazes ou não na inibição da progressão tumoral (Lee *et al.*, 2008; Tang *et al.*, 2008). Aqui, o monastrol foi utilizado como controle positivo para a parada do ciclo celular, gerando o fenótipo de monopólos em células PC3. Os mecanismos de ativação do *spindle assembly checkpoint* para a formação do fuso monoastral no qual, a organização do microtúbulo é perturbada, tanto para a dinâmica ou nucleação de microtúbulos, ainda são obscuros (Kapoor *et al.*, 2000).

Russowsky *et al.* (2006) relataram atividade antiproliferativa de monastrol, oxo-monastrol e seus derivados **27** contra sete linhagens celulares de câncer humanas, como UACC62 (melanoma), MCF-7 (mama), OVCAR3 (ovariano), PC3 (próstata), HT-29 (cólon), 786-0 (renal) e NCI-ADR (linhagem de mama com expressão de fenótipo com resistência multi-drogas). Outros compostos inibidores específicos de Eg5 e seus derivados já são descritos

na literatura, como: *Ispinesib* (Talapatra; Schüttelkopf; Kozielski, 2012), *EMD534085* **7** (Hollebecque *et al.*, 2013), *MK-0731* **8** (Holen *et al.*, 2012), *S-trityl-L-cysteine* (STLC) (Abualhasan *et al.*, 2012), *HR22C16* **16** (Sarli; Giannis, 2006), além do *Terpendol* **25** e *Gossypol* **26** (El-Nassan, 2013). Muitos destes apresentam a mesma conformação fenotípica (monoásteres) e com valores de IC₅₀ em escala nanomolar.

Novos inibidores foram identificados contra as quinases mitóticas - PLKs e Auroras, onde estão, atualmente, em ensaios clínicos (Jackson *et al.*, 2007; Keen; Taylor, 2004; Strebhardt; Ullrich, 2006). Se esses novos inibidores mitóticos melhorarem as terapias anti-câncer quando comparados com os compostos alvo de microtúbulos, isso permanece desconhecido. No entanto, os inibidores de Aurora e PLK parecem não causar neuropatia significativa e a principal toxicidade limitante da dose observada foi neutropenia (baixo número de neutrófilos), enquanto outras linhagens hematopoiéticas pareceram ser poupadas (Jackson *et al.*, 2007).

Esses compostos controles aqui utilizados causam tanto o fenótipo monoastral (fusos monopolares) como multiastral (fusos multipolares). O PTC (+) gerou o fenótipo de monastral em células PC3. Na literatura, poucos compostos descrevem essa alteração no tratamento. Com maior destaque, o monastrol (Mayer *et al.*, 1999) e seus análogos (Müller *et al.*, 2007). O estudo realizado na linhagem de glioblastoma (U-87 MG), após o tratamento com monastrol (50 µM) e seus novos análogos, como: *enastron* (1 µM), *dimethylenastron* (1 µM), *vasastrol VS-83* (5 µM) e *S-trityl-L-cysteine* (1 µM), mostrou distribuição dos cromossomos e microtúbulos em monoásteres bem evidenciada. Outros tratamentos com derivados do monastrol, como o composto 9 (por monoacetilação) e o composto 10 (por diacetilação) na concentração de 50 µM e 62,5 µM, respectivamente, geraram perfis de monoásteres em HeLa, e, após 7 horas de tratamento, no entanto, não inibiu totalmente a proliferação celular (Klein *et al.*, 2007).

É importante ressaltar que, outras substâncias como, a *1-phenethylamino-3-phenothiazin-10-yl-propan-2-ol* (5 µM) foi testada em linhagens não transformadas como de fibroblastos de ratos (3Y1), levando a formação de fusos monopolares e apoptose (Okumura *et al.*, 2006). A linhagem PTX10, derivada de tumor ovariano (1A9) resistente ao taxol, foi utilizada como modelo para testar o composto A1 (potencia análogo do composto HR22C16) (1µM), gerando o fenótipo de monoásteres (Marcus *et al.*, 2005). Tarby *et al.*, 2006 revelaram a ação do composto 4-phenyl-tetrahydroisoquinoline e seus derivados como potenciais inibidores de Eg5 e gerando a mesma configuração monopolar. Compostos do grupo

vanadocene dichloride (VDC) inibiram a proliferação de linhagens tumorais de mama e de glioblastoma, comprometendo a formação do fuso bipolar e gerando a formação de monopólos (Navara *et al.*, 2001).

Embora estes novos inibidores mitóticos sejam um avanço promissor, eles ainda têm a desvantagem de bloquear funções essenciais em células não tumorais. A seletividade do câncer ou a janela terapêutica destes agentes pode ser estreita. Em último caso, a estratégia terapêutica ideal dependerá da identificação de requisitos exclusivos para a sobrevivência das células cancerígenas. A terapêutica eficaz contra o câncer deve explorar as diferenças biológicas entre as células tumorais e as células não tumorais das quais elas surgiram (Yap *et al.*, 2016).

Nesse contexto, o centrossomo é estudado como potencial alvo nas pesquisas de novas moléculas anticâncer. O centrossomo é o centro de organização de microtúbulos e é dinamicamente regulado por uma série de alterações bioquímicas e morfológicas que paralelamente culminam com a progressão do ciclo celular. Os centrossomos são formados por um par de centríolos dispostos ortogonalmente em forma de barril, cada um com 200 nm de comprimento, localizados próximos ao núcleo e rodeados por um material pericentriolar (PCM) vagamente definido (Doxsey, 2001). Assim, o centrossomo participa como centro (*hub*) crucial para o controle e regulação do ciclo celular. Eventos como a proliferação celular descontrolada, é uma das características (*hallmarks*) do câncer, que são acompanhados por desregulação de uma ou mais vias de sinalização. Assim, o direcionamento de potenciais intervenções no centrossomo representa uma oportunidade terapêutica valiosa para o tratamento do câncer.

Desse modo, o PTC (+) (2,5 e 7,95 μ M) induziu a desorganização do centrossomo em PC3. É importante destacar que a marcação para a caracterização fenotípica aqui utilizada foi para tubulina γ . A tubulina γ é uma proteína centrossomal que se localiza em maior concentração no material pericentriolar (Stearns *et al.*, 1991) e é amplamente utilizado como marcador para o centrossomo. A fim de ilustrar e corroborar com o que foi encontrado na microscopia confocal, a figura que ilustra a quantificação de superfície e volume do centrossomos sob o tratamento com PTC (+) revela a anormalidade na desorganização do centrossomo, sendo um achado que não é relatado na literatura para substâncias do grupo dos pterocarpanos, tendo descrito pela primeira vez nesse trabalho. Contudo, a anormalidade em número de centrossomos (clusterização dos centrossomos) é um achado comum na pesquisa em *drug discovery* versus câncer.

Os centrosomos verdadeiros contêm um par de centríolos circundados por material pericentriolar, enquanto que os centrossomos acentriolares carecem de centríolos e podem ser formados pela fragmentação do PCM (Lawo *et al.*, 2009; Zyss; Gergely, 2009). Cerca da metade das células PC3 são conhecidas por conter centrossomos extras verdadeiros (Kwon *et al.*, 2008). Dessa maneira, a fim de esclarecer a real duplicação do centrossomo contendo centríolos foi realizado, a marcação para CNTROB (centríolo-filho), que mostrou, no tratamento com PTC (+) 7,95 μM , a duplicação de centríolos, mas a separação dos centrossomos não ocorreu, levando a crer que a influência destes centrossomos não-separados sobre a organização de microtúbulos resulta em fusos monoastrais, comportamento semelhante ao que ocorreu no tratamento com o monastrol (50 e 100 μM) (Kapoor *et al.*, 2000).

A geração de pólos a partir da fragmentação centrossomal também foi evidenciada no tratamento com PTC (+) (2,5 e 7,95 μM) (Figura 22 D, seta azul). Isto indica que alguns pólos multipolar do fuso foram ancorados aos centrossomos acentriolares. Esses defeitos são conhecidos por serem induzidos por *knockdown* de Aurora-A (De Luca *et al.*, 2008), um oncogene extensivamente estudado envolvido em múltiplos passos de mitose (Carvajal; Tse; Schwartz, 2006), e depleção de Cep57 (Wu *et al.*, 2012), uma proteína centrossomal envolvida na agregação de microtúbulos durante a nucleação (Momotani *et al.*, 2008).

Estudos mostram que os pólos acentrossomais e centrossomais precisam ser agrupados a fim de montar fusos bipolares em células tumorais com número normal de centrossomos (Kleylein-Sohn *et al.*, 2012). Este mecanismo de focalização dos pólos é dependente de HSET, uma quinesina envolvida no agrupamento de centrossomos em células tumorais, mas, em células não tumorais, é dispensável (Kleylein-Sohn *et al.*, 2012; Kwon *et al.*, 2008).

Por outro lado, em relação à busca de terapias alvo para o centrossomo, muitos estudos procuram maneiras para bloquear a clusterização de centrossomos (Fielding *et al.*, 2011; Kawamura *et al.*, 2013; Kwon *et al.*, 2008; RAAB *et al.*, 2012; Rebacz *et al.*, 2007), implicados na progressão tumoral, como já foi mostrado anteriormente. O composto QLT-0267, um inibidor da adesão focal e da proteína centrossomal, tem inibido a atividade centrossomal (clusterização) (Fielding *et al.*, 2011). Enquanto, a substância *N*2-(3-pyridylmethyl)-5-nitro-2-furamide, cujo nome é conhecido como inibidor químico de clusterização de centrossomo 1 - *Centrosome Clustering Chemical Inhibitor-01* (CCCI-01) mostrou potencial efeito em linhagens tumorais (Kawamura *et al.*, 2013).

O estudo realizado por Navara *et al.*, (2001) mostrou a indução de desorganização na formação dos pólos com o tratamento utilizando as substâncias *VDC* e *VDacac* no tratamento com linhagens de tumorais de mama (BT-20) e de glioblastoma (U373).

A organização da rede de actina, outro componente do citoesqueleto responsável por dar suporte à célula, por determinar o formato da célula e por direcionar o movimento e a divisão da célula, foi analisada em PC3 tratadas com PTC (+); as células foram fixadas e marcadas para actina (*FITC-phalloidin*) e DNA (Hoechst 33258), e analisadas por imunofluorescência. As células apresentaram multinucleação, com núcleos, por vezes, de tamanhos variados e tamanho celular aumentado, com forte polarização de actina, com elevação do índice celular (*cell index*). O tratamento causou o desaparecimento dos feixes citosólicos paralelos (fibras de actina paralelas), resultando uma rede fortemente marcada e fracamente distribuída no citosol, localizando-se por vezes próximo aos núcleos (áreas fortemente marcada em verde) e acúmulo de actina na região de contato célula-célula. Nenhum dado na literatura referente a estudos com pterocarpanos mostram achados que vinculam potenciais ações na rede de actina. No trabalho de Militão *et al.*, (2014) nenhuma alteração em actina foi identificada.

A maioria dos compostos que atuam no citoesqueleto de actina e modulam sua dinâmica foram isoladas de plantas terrestres, fungos, bactérias, animais marinhos e substâncias derivadas de esponjas marinhas. Estes produtos naturais podem ser divididos em dois grupos dependendo do seu efeito sobre o citoesqueleto de actina: (a) aqueles que formam e estabilizam filamentos de actina e (b) aqueles que desestabilizam filamentos ou impedem a montagem dos microfilamentos (Kustermans; Piette; Legrand-Poels, 2008). O membro mais conhecido da família de *phallotoxin* é a phalloidina. A phalloidina é um composto de estabilização de filamentos de actina sintetizado pelo fungo venenoso “Death cap” *Amanita phalloides* (Wieland; Faulstich, 1977). Este composto não é capaz de entrar livremente em células e é geralmente utilizado acoplado a um fluoróforo para marcar filamentos de actina. A *Jasplakinolide* (JP) também chamado de jaspamida é outro estabilizador de filamentos de actina isolado da esponja marinha *Jaspis johnstoni* (Zampella *et al.*, 1999), com uma estrutura significativamente diferente e com membrana permeável ao contrário da phalloidina. Além de atuar como estabilizador de filamentos, a JP é um potente indutor de polimerização de actina (Bubb *et al.*, 2000).

Outro grupo importante são as substâncias conhecidas como *latrunculins* e *cytochalasins*, cujo mecanismo de ação se dá pelo sequestro dos monômeros de actina e, assim, desestabilizam e inibem a polimerização da actina (Spector *et al.*, 1983; Vilozny *et al.*, 2004).

A *cytochalasin* liga-se aos extremos positivos de crescimento dos filamentos de actina e assim evita a adição de monômeros de actina nessas extremidades (Cooper, 1987), a *latrunculins* forma complexos 1:1 com monômeros de actina e provoca uma interrupção do citoesqueleto de actina em várias células (Coue *et al.*, 1987, Spector *et al.*, 1983). Outro composto, o *Swinholide A* (SwA), sequestra e liga-se especificamente a dímeros de actina e, como alguns dos agentes bloqueadores/desestabilizadores de filamentos, separa os filamentos de actina (Bubb *et al.*, 1995).

Os estudos de Hayot *et al.*, (2006) mostram resultados de IC₅₀ em linhagens tumorais (MCF7 – mama / A549 – pulmão), onde *cytochalasin D* e *latrunculins* exibiram perfis citotóxicos mais baixos (IC₅₀ entre 5×10^{-7} e 3×10^{-6} M) do que *jasplakinolide* (IC₅₀ entre 10^{-9} e 5×10^{-8} M). Nesse estudo similares efeitos ao que foi encontrado com o PTC (+) (forte marcação da rede no citosol), a substância testada em MCF7, a *jasplakinolide* (na concentração de 5×10^{-10} M), mudou completamente a aparência da disposição da rede de actina, mas sem aumentar o tamanho celular.

O trabalho realizado por Cuadros *et al.*, (1999) mostrou que, em células em linhagem de rim de macaco (Vero), a substância isolada *spisulosine* (0,5 μ M) de *Spisula polynyma* mostrou similar efeito ao pterocarpano após 20 horas de incubação com alteração da rede de actina.

Outro achado a destacado foram perturbações na acumulação de actina nos locais de contato célula-célula, também observado durante o tratamento com PTC (+). Essa observação, foi identificada com a substância *hanultarin*, isolada de sementes da planta *Trichosanthes kirilowii*, revelou forte atividade inibitória da polimerização de actina de queratinócitos humanos (HaCaT) nas concentrações de 0,5 – 12 μ g/mL. O tratamento produziu estruturas de actina do tipo agregado (*aggregate-like*) (Moon *et al.*, 2008), o que também acontece no tratamento com o PTC (+).

Com interesse de identificar o perfil proteico envolvido nas diferentes atividades de regulação, incluindo centrossomo, microtúbulos e o esqueleto de actina, foi utilizada análise proteômica como ferramenta na Biologia de Sistemas na investigação no câncer. A proteômica é o método universalmente aplicável para a investigação de praticamente qualquer processo biológico, incluindo a pesquisa em *drug discovery*, e particularmente atraente para a pesquisa do câncer, principalmente a fim de desvendar a complexidade de processos na tumorigênese, na progressão do câncer, na recidiva tumoral e na metástase, muitas vezes, envolvendo grandes redes de proteínas (Guo; Zou; Wang, 2013).

Nessa análise foi utilizada a técnica de *shotgun* no processo pré-clínico para caracterizar o perfil proteico resultante do tratamento com atividade anticâncer: PTC (+) em adenocarcinoma de próstata (PC3), a fim de lançar luz sobre os putativos mecanismos celulares por trás dos fenótipos observados (disposição em monoásteres, desorganização de centrôssomo e polarização de actina).

Para os estudos proteômicos, a linhagem tumoral PC3 foi utilizada como modelo, uma vez que, como já mencionado, representa *in vitro*, o modelo de células resistentes à castração, além de não expressar o gene *p53*, tratando-se de uma linhagem mais agressiva e com grande poder de gerar metástases. Porém, levando-se em conta que o estudo onde se gera uma quantidade de resultados em larga-escala, utilizar mais de uma linhagem celular para caracterizar a ação de drogas torna-se muito difícil devido a heterogeneidade na expressão proteica que pode ser gerada entre as linhagens. Assim, tentar comparar perfis proteicos em diferentes linhagens é uma estratégia complexa, pois muitas proteínas de baixa abundância em uma determinada linhagem e que poderiam ser usadas como alvos universais para o mesmo tipo de câncer e desempenhar importantes papéis críticos na transdução de sinal, são perdidas (Drake *et al.*, 2011), como o que acontece nos estudos com tumores sólidos da mama (Lam; Jimenez; Boven, 2013).

Para identificar as proteínas, a plataforma da *Waters Synapt G2-Si* foi utilizada. As células PC3 foram tratadas em 24 h e 48 h com a substância em estudo (PTC + - 7,95 μM) e drogas controle (Monastrol – 50 μM e Nocodazol – 0,25 μM), gerando uma lista de proteínas. Para o tratamento com PTC (+) durante 24 horas, das 137 proteínas quantificadas, 24 foram superexpressas, 28 subexpressas e 85 não foram diferencialmente expressas (Tabela suplementar 1). Para o tratamento com PTC (+) durante 48 horas, das 137 proteínas quantificadas, 05 foram superexpressas, 13 subexpressas e 119 não foram diferencialmente expressas (Tabela suplementar 2).

Para os estudos de classificação e interação, somente as proteínas expressas no tratamento de 24 horas foram utilizadas, uma vez que a expressão diferencial somente foi evidente nesse tempo. Em contrapartida, após 48 horas e tratamento, o número de proteínas diferencialmente expressas foi muito inferior. Este achado pode estar envolvido com o tempo de parada durante a divisão celular como mostrado na Figura 19, onde a proliferação das células PC3 permanece estável após 48 horas de exposição à droga (intervalos de 36 e 56 horas), podendo prever ainda que, o efeito do fármaco sobre o perfil proteico aconteça nas primeiras 24 horas após a exposição, presumindo uma possível tentativa das células de “resolver o

problema” após esse tempo, parecendo normalizar à medida que o efeito do fármaco age nas culturas (aumento do número de proteínas não diferencialmente expressas). Este achado acontece em todas as três condições de tratamento quando se compara os perfis de 24 horas com os perfis de 48 horas (ver tabelas suplementares e Figura 26).

Assim, após a análise das proteínas contidas na tabela suplementar 1, foram identificados genes superexpressos envolvidas com atividade GTPase (*ARHGAP28; KTN1; TRIO*), de diferenciação (*HNRNPH3; NME1-NME2*), histonas (*HIST2H3A; H3F3B*), genes de regulação (*ANXA2; CHD8; P4HB; TCP1; TRIM28*), de organização e de arranjo microtúbulo/axonema/citoesqueleto (*ACTG1; HYDIN; INADL; KIF7; MSN; TUBB6*), de dobramento proteico (*HSPA1A; HSPA6*), de atividade iônica (*UNC80; ZC3H13*), de ubiquitinação (*HUWE1*) e de resposta a estresse (*ATM*). Para genes subexpressos, foram identificados genes envolvidos com atividade mitótica (*SMC4*), de regulação (*ANXA5; ANXA1; GRM2; PPIA; PTPN13; PRKDC*), de atividade glicolítica (*PGKI*), de organização e de arranjo microtúbulo/axonema/citoesqueleto (*ACTA1; CCT5; CHD3; CFL1; DNAH9; DNAH12; EZR; GCC2; MYH2; SNRNP200; SYNE2; TRIP11*), de atividade oxidativa (*ACAD11*), de atividade de adesão, motilidade e proliferação celular (*DLG5; ITGB4; PIK3CB; PRG4*) e de ubiquitinação (*UBR5*). É importante aqui destacar que cerca de 20 proteínas diferencialmente expressas (tabela 3) foram encontradas tanto no tratamento com o composto do estudo quanto nos controles positivos, apresentando *status* de expressão similares aos apresentados nos tratamentos com os controles positivos. Além disso, na figura 28, a apresentação ontológica mostra que, mesmo em expressões de proteínas diferentes, uma condição esperada, já que os mecanismos de ação das substâncias são diferentes, logo expressões proteicas diferentes; a ontologia é similar, revelando, assim, grupos de proteínas envolvidas com a manutenção e regulação do citoesqueleto, com efeitos proliferativos, com replicação do DNA, etc. Como os principais alvos dos compostos aqui estudados são proteínas do citoesqueleto, as descrições dos genes que o compõem serão inicialmente abordadas.

O remodelamento do citoesqueleto de actina é imediatamente controlado por proteínas de ligação à actina que regulam eventos de polimerização e despolimerização, bem como *cross-linking* e agrupamento de filamentos de actina. Diversas moléculas de sinalização ligam a eventos mediados por ligantes ao processo de remodelação. Entre estas moléculas encontram-se os membros da família Rho GTPase, que constituem como reguladores moleculares que induzem alterações morfológicas distintas em diversos tipos de células (Hall, 1998; Vanaelst; D'souza-Schorey, 1997). Os genes *ARHGAP28, KTN1* e *TRIO* estão

relacionados como membros da família Rho GTPase. Essas proteínas são mais conhecidas pela sua capacidade de induzir rearranjos dinâmicos do citoesqueleto de actina associado à membrana plasmática (Aspenstrom; Fransson; Saras, 2004; Hotta *et al.*, 1996; Medley *et al.*, 2000; Murphy *et al.*, 1999). Além desta função, as Rho GTPases também regulam a contratilidade da actina-miosina e a dinâmica dos microtúbulos. Acredita-se que efeitos mediados por Rho sobre a transcrição e o tráfico de membranas sejam secundários a estas funções. No nível mais macroscópico, as Rho GTPases são implicadas em muitos processos biológicos celulares importantes, incluindo o controle do crescimento celular, da citocinese, da motilidade celular, da adesão da matriz extracelular célula-célula, na transformação e invasão celular e no desenvolvimento celular (Govek; Hatten; Van Aelst, 2011). Outro gene relacionado com a interação actino-miosina é o gene *INADL*, também conhecido como gene *Patj*, este está envolvido com a disposição e conformação da circunferência do cinto de actino-miosina na região apical e basal das células epiteliais (Nakajima; Tanoue, 2011), influenciando na polaridade e na junção célula-célula.

O gene *PTPN13* codifica uma fosfatase do tipo 13 não-receptor, importante como sinalizadora na regulação (ativação) de outras proteínas GTP-ases, além de regular ainda uma variedade de processos celulares incluindo o crescimento celular, a diferenciação, o ciclo mitótico e a transformação oncogênica (Julien *et al.*, 2011). Estudos mostram que a superexpressão da *PTPN13* atua na inibição da proliferação, da invasão e da inversão do processo de transição epitelial-mesenquimal nas linhagens de hepatocarcinoma MHCC97H e HepG2, agindo como regulador (supressor) na tumorigênese (Zhan *et al.*, 2016). Outros trabalhos também mostram a importância desse gene nos diferentes tumores (Freiss; Chalbos, 2011), incluindo carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (Niu *et al.*, 2009), câncer de mama (Glondou-Lassis *et al.*, 2010) e câncer de pulmão (Scrima *et al.*, 2012).

O gene *GCC2* codifica a proteína 2 contendo o domínio *coiled-coil* e GRIP e tem função no *scaffolding* de proteínas CLASPs (Efimov *et al.*, 2007). As proteínas CLASPs compreendem uma família (CLIP 115 - 170) responsáveis por ligar os microtúbulos ao córtex celular (Lansbergen *et al.*, 2006) e são responsáveis também em nuclear microtúbulos independente da região centrossomal, mas dependente de γ -tubulina para que a nucleação ocorra (Efimov *et al.*, 2007). Poucos são os trabalhos da atividade desse gene em câncer, somente Pongor *et al.*, 2015 correlacionaram a expressão de *GCC2* como supressor tumoral em câncer de mama.

O gene *ACTG1*, outro gene também envolvido com a regulação do citoesqueleto e polimerização de actina, expressa a γ -actina (Vainio *et al.*, 2011), uma proteína importante para a integridade da junção e motilidade celular. As adesões juncionais são responsáveis por manter a polarização das células epiteliais e no acoplamento de citoesqueleto às células adjacentes, permitindo movimentos coordenados (Ebnet, 2008). É importante destacar que nas junções os complexos de proteínas que os formam são dinâmicos e que a sua composição está sujeita a regulação dependendo da maturação e integridade juncionais.

O gene *ACTA1* expressa a proteína α -actina, importante constituinte do citoesqueleto e um componente principal do aparelho contrátil, envolvidas na motilidade celular, na estrutura e na integridade celular (Akkari *et al.*, 2003). O trabalho recente de WU *et al.*, 2015 mostrou o gene *ACTA1* como potencial biomarcador em câncer de mama luminal e basal relacionado a resistência a drogas. O trabalho revela que estes resultados indicam que, em resposta a fármacos na quimioterapia, as ligações anormais da matriz extracelular a proteínas citoesqueléticas intracelulares, resultantes de placas de adesão ou irregularidades de actina que podem levar ao bloqueio da absorção do fármaco pelas células alvo e contribuir para a resistência aos fármacos.

O gene *CFL1* codifica a proteína cofilina e está associada na regulação e modulação de actina, dependente de pH intracelular, por despolimerizar os filamentos de F-actina e inibir a polimerização de G-actina (Ono, 2007), desempenhando um papel fundamental na migração celular e citocinese (Hotulainen *et al.*, 2005). Recentes trabalhos mostram que a cofilina está superexpressa e relacionada diretamente com invasão, metástase e quimio-resistência de vários tumores sólidos malignos, incluindo os tumores prostáticos (LU *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2006; YANG *et al.*, 2013; ZHU *et al.*, 2006). Em próstata, *knockdown* de *CFL1* resulta no aumento da sensibilidade a certos agentes quimioterápicos, incluindo docetaxel (Pérez-Martínez *et al.*, 2012) e sua superregulação à resistência ao taxol em câncer ovariano (LI *et al.*, 2013). O recente trabalho em próstata mostrou que, no tratamento com docetaxel em LNCaP, o gene *CFL1* foi subexpresso e promoveu citotoxicidade, apoptose ativada e atividade aumentada de caspase-3 (Xiao *et al.*, 2016), demonstrando que o efeito anti-câncer do docetaxel induziu apoptose através da supressão da cofilina-1. Em glioblastoma, a inibição da atividade da cofilina é capaz de inibir a motilidade celular, enquanto a superexpressão de cofilina aumenta a velocidade da migração (Yap *et al.*, 2005).

O gene *KIF7* é uma kinesina caracterizada por conter o domínio catalítico motor de cinesina na porção N-terminal e domínio homólogo *Cos2* em *Drosophila*, interagindo com

microtúbulos (Kato; Kato, 2004). O gene *KIF7* atua na via de sinalização *Hedgehog*, já definida por ser responsável pela manutenção de muitos processos celulares importantes e desenvolvimento tecidual (Ingham; McMahon, 2001). A ativação aberrante dessa via já foi relatado em muitos cânceres, incluindo câncer gástrico (Berman *et al.*, 2003), câncer endometrial (Liao *et al.*, 2009A), câncer ovariano (Liao *et al.*, 2009B), câncer pancreático (Thayer *et al.*, 2003), câncer de pulmão (Watkins *et al.*, 2003) e câncer de próstata (Sanchez *et al.*, 2004). O trabalho realizado por HO *et al.*, 2014 mostrou que a super expressão de *KIF7* suprime o crescimento, invasão e migração celular em córioncarcinoma.

Uma importante proteína do citoesqueleto é a tubulina- β (cadeia 6) – *TUBB6*. Em todas as células em divisão, as tubulinas compreendem os componentes principais dos fusos mitóticos e, em conjunto com filamentos de actina e filamentos intermediários, estabelecem a citoarquitetura interna do citoplasma de células interfásicas (Heuser; Kirschner, 1980). O gene *TUBB6*, codificante de um subtipo de β -tubulinas, é o constituinte principal do microtúbulo, desempenhando papéis fundamentais na manutenção da estrutura celular, na formação do fuso mitótico, no transporte de produtos químicos, etc. Além disso, o gene *TUBB6* também está funcionalmente associado com a comunicação intercelular juncional *gap* (*gap junctional intercellular communication* - GJIC). Alguns estudos mostraram as relações entre as tubulinas e essas junções com processo metastáticos em próstata/outras cânceres (LI *et al.*, 2014). Como exemplo, é possível observar que a relação do nível de tubulina afeta o processo de metástase em células de carcinoma colorretal (Schaefer *et al.*, 2007) e em mama (Champine *et al.*, 2007). Um estudo utilizando 60 linhagens de células de câncer com diferentes capacidades de invasão mostrou que o gene *TUBB6* foi identificado como um gene associado à invasão (HSU *et al.*, 2013). Além disso, também foi identificado como uma das 38 assinaturas de expressão gênica em câncer de mama após quimioterapia (Jézéquel *et al.*, 2009).

Outras proteínas motoras importantes do citoesqueleto e constituinte do axonema são as dineínas 9 e 12 de cadeia pesada, codificadas pelo gene *DNAH9* e pelo gene *DNAH12*, respectivamente (King, 2000). Poucos são os trabalhos relacionados com esses genes e o câncer. Em câncer pancreático, o gene *DNAH9* foi superexpresso e implicado ao processo de apoptose (Apostolou *et al.*, 2010), já em leucemia mielóide crônica, o gene *DNAH9* participa de interações moleculares implicadas na tumorigênese (Lavrov *et al.*, 2016). O gene *DNAH12* foi associado com a sobrevivência de células tumorais no câncer ovariano (Madden *et al.*, 2014).

Os genes do complexo T polipeptídeo 1 (*TCPI* e *CCT5*) atuam como membros de chaperoninas auxiliando na síntese de proteínas do citoesqueleto. O gene *TCP-1* é super

expresso em vários cânceres e mostra maior expressão com avanço da doença (Coghlin *et al.*, 2006). Como membro da família chaperonina do grupo II, esse gene auxilia no dobramento de proteínas (Yam *et al.*, 2008), incluindo as tubulinas e as actinas (Sternlicht *et al.*, 1993). Já para o gene *CCT5*, estudos mostraram que a alta expressão está associada a resistência a multi-drogas em carcinoma gástrico (Ludwig; Dietel; Lage, 2001) e na resistência ao tratamento com docetaxel em câncer de mama (Ooe; Kato; Noguchi, 2007). Apesar da diferença de expressão, *TCP1* (super-regulado) e *CCT5* (subregulado), é relatado que a presença de um grande número de subunidades CCT associadas (*CCT α* , *CCT β* , *CCT γ* , *CCT δ* , *CCT ϵ* , *CCT ζ* , *CCT η* , *CCT θ*), juntamente com o seu padrão de evolução, implica não só a independência funcional entre si, mas também sugere que o seu arranjo na estrutura final é importante para a atividade funcional do *fold*ing de proteínas (Liou; Willison, 1997).

O gene *HYDIN*, conhecido como constituinte do par central axial axonemal ou indutor de hidrocefalia, foi identificado como portador de uma deleção de um único nucleotídeo, o que resultou em uma proteína mais curta associada com hidrocefalia congênita letal em camundongos (Davy; Robinson, 2003). Este gene foi detectado em tecidos humanos, tais como testículos, cérebro e pulmão (Doggett *et al.*, 2006; Nagase *et al.*, 2001); porém, faltam estudos sistemáticos a nível de expressão de todas as variantes em tecidos humanos. Além disso, ainda não estão disponíveis informações sobre a expressão da proteína, devido à ausência de anticorpos específicos. Tudo isso dificulta a investigação da expressão e função do gene *HYDIN* em tecidos saudáveis e da associação de seus transcritos com hidrocefalia congênita e outras doenças, logo, o conhecimento das variantes desse gene é escasso até o momento. Outros estudos mostraram que mutações recessivas do gene *HYDIN* estão associados à discinesia ciliar primária em pacientes (Olbrich *et al.*, 2012).

Além das proteínas anteriormente citadas, as proteínas envolvidas no contato célula-célula, membrana-citoesqueleto e nucleoesqueleto-citoesqueleto são descritas a seguir, ressaltando a importância das mesmas no desencadeamento do fenótipo celular.

O gene *MSN* (*Moesin - Membrane-Organizing Extension Spike Protein*) é um membro da família ERM (*Ezrin, Radixin, Moesin*). As proteínas ERM atuam como ligantes de membrana-citoesqueleto em estruturas especializadas enriquecidas em actina, tais como microvilosidades, pregas e sulcos de clivagem, desempenhando assim um papel chave na morfologia celular, adesão e motilidade (Tsukita; Yonemura, 1999; Georgescu *et al.*, 2014). A *Moesin* está associada na motilidade e invasão em carcinomas mamários (Condeelis; Singer; Segall, 2005), além de estar associada a outros tipos de câncer como carcinoma papilar da

tireóide (Brown *et al.*, 2006) e carcinoma de células escamosas (Kobayashi *et al.*, 2004). A *Moesin* desempenha um papel importante nas funções celulares, especialmente na polaridade, participando na estabilidade da junção celular e, implicada também, no trânsito vesicular e no remodelamento apical (Georgescu *et al.*, 2014; Hughes; Fehon, 2007), processos-chave na carcinogênese. Essa proteína torna-se um potencial alvo na terapia uma vez que pertence à família ERM, cujos membros interagem com SRC-proteínas em sinalização celular mediada por adesão (Srivastava *et al.*, 2005); além de já publicado a sensibilidade gênica no tratamento com *Dasatinib*, um inibidor de quinases SRC (Finn *et al.*, 2007).

A proteína ezrina (gene *EZR*) também foi diferencialmente expressa. Conhecida como citovilina ou vilina 2, participa da família ERM e age como intermediário entre a membrana plasmática e o citoesqueleto de actina, desempenhando papel fundamental na adesão, proliferação, migração, motilidade, regulação dos canais iônicos, formato celular, apoptose e organização da estrutura da superfície celular (Bretscher *et al.*, 2002; Fehon *et al.*, 2010). Muitos trabalhos revelam que a elevada expressão de ezrina se correlaciona com o comportamento metastático e péssimo prognóstico em muito tumores, como melanoma, câncer colorretal, carcinoma endometrióide, tumores astrocíticos, sarcomas de tecidos moles e adenocarcinomas de pulmão e mama (Chen *et al.*, 2013; Elliott *et al.*, 2005; Federici *et al.*, 2009; Geiger *et al.*, 2000; Köbel *et al.*, 2006; Leiphrakpam *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015; Weng *et al.*, 2005).

O trabalho de Yang *et al.*, (2007) mostrou, por *knockdown* em linhagem intestinal Caco-2, que as proteínas ezrina e radixina tem papel fundamental em recrutar a proteína MRP2, associada a resistência a multi-drogas e localizam a MRP2 na região da borda em escova de células tubulares proximais.

O trabalho Solinet *et al.*, (2013) revela que a ação de moesina e ezrina é diretamente ligada à organização dos fusos mitóticos através da ligação e proteínas ERM com os microtúbulos astrais. Ainda, os resultados indicam que a perturbação da ancoragem mediada por moesina-(microtúbulos astrais) ao córtex leva à redução do tamanho do fuso, possivelmente interrompendo as forças de tração exercidas pelo sistema que envolvem outras proteínas como as dineínas.

O gene *MYH2* codifica a proteína miosina II a qual também está envolvida com a junção célula-célula e ligação com actina. A miosina II desempenha um papel importante em diversos processos celulares contráteis e móveis, tais como contração muscular, citocinese, migração celular e adesão celular em células eucarióticas (Berg; Powell; Cheney, 2001; Sellers,

2000). Alguns trabalhos mostram expressão diferenciada do complexo de miosina após tratamento com paclitaxel em câncer de pulmão (Che *et al.*, 2013), carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (Vachani *et al.*, 2007) e carcinoma hepatocelular (WU *et al.*, 2012).

O gene *ITGB4* codifica a integrina beta 4, receptores de glicoproteína transmembrana associados de forma não covalente. As integrinas medeiam a adesão da célula-matriz ou da célula-célula, e os sinais transduzidos que regulam a expressão de gene e o crescimento celular (Soung *et al.*, 2010). O trabalho de Leng *et al.*, 2016 mostrou que a super expressão de *ITGB4* contribuiu para a proliferação, metástase e baixa diferenciação em carcinoma hepatocelular. Em próstata, estudos prévios mostraram que a supressão do gene *ITGB4* reduz a migração, mas não potencial invasivo de células tumorais da próstata (Banyard *et al.*, 2014), além de promover a transição do tecido prostático normal para neoplasia intra-epitelial (Gorlov *et al.*, 2009). Em contrapartida, a super regulação de *ITGB4* em adenocarcinoma pancreático ductal promoveu a transição epitelial mesenquimal (Masugi *et al.*, 2015). A baixa expressão de *DLG5* e *ITGB4*, aqui, pode ser atribuída à grande quantidade de células que, durante o tratamento, estão paradas na divisão celular em relação ao controle (células em monocamada - *flat*).

O gene *SYNE2* codifica a proteína nesprina 2, uma proteína constituinte do envelope nuclear de ligação com actina e responsável por ligar o nucleoesqueleto ao citoesqueleto (Rajgor; Shanahan, 2013). Provavelmente a subexpressão de nesprina 2 está associada a perda da membrana nuclear nas células tratadas com PTC (+) com parada na divisão celular em prometáfase.

O núcleo é rodeado por uma bicamada lipídica dupla, o envelope nuclear, compreendendo a membrana nuclear interna e externa. O complexo ligante do nucleoesqueleto e do citoesqueleto LINC (*linker of nucleoskeleton and cytoskeleton*) é composto principalmente por dois tipos de famílias de proteínas: as proteínas nesprinas, que são recrutadas para a membrana nuclear externa, onde elas interagem com o citoesqueleto e as proteínas SUN, localizadas na membrana nuclear interna, onde interagem com laminas no nucleoplasma e com proteínas nesprinas no espaço perinuclear (Crisp *et al.*, 2006; Isermann; Lammerding, 2013). É importante destacar que as células em prometáfase (maioria no tratamento com PTC (+)) já não possuem o envoltório nuclear.

As anexinas são proteínas de ligação a fosfolípidos dependentes de cálcio com várias funções celulares, incluindo papéis na organização da membrana-citoesqueleto, no

tráfico vesicular e na regulação da atividade de canais iônicos (Gerke; Creutz; Moss, 2005; Singh, 2007). Aqui, o gene *ANXA2* foi superexpresso, o que pode ter relação com câncer de alto grau, como exemplo cânceres com fator de Gleason 8–10 (Banerjee *et al.*, 2003; YEE *et al.*, 2007). Além disso, várias linhagens celulares mais agressivas de câncer de próstata, tais como DU145 e MDA PCa 2a, os quais expressam níveis moderados de *ANXA2*, mostram comportamento consistente com os resultados clínicos (Banerjee *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2003), levando a crer que os níveis de expressão estão relacionados com o fenótipo mais agressivo. O gene *ANXA2* reduz a proliferação celular em células LNCaP (Liu *et al.*, 2003), enquanto que a subexpressão de *ANXA2*, em células DU145, inibiu a migração sem afetar a proliferação ou a apoptose. Portanto, os efeitos específicos da alteração do nível de expressão de *ANXA2* no câncer de próstata continuam em questão. O gene *ANXA1* conhecido como uma proteína anti-inflamatória (Perretti; D'acquistio, 2009) foi subexpresso, mostrando que, em linhagens mais agressivas, essa proteína se encontra *down-regulated*. O estudo de Maschler *et al.* 2010 identificou que o gene *ANXA1* age como um supressor de metástases, portanto, o aumento na expressão de *ANXA1* contribui para o fenótipo menos invasivo, o que não é representado na linhagem PC3 aqui utilizada. Ainda, no trabalho de Kreunin *et al.*, 2007 foi mostrada a associação do fenótipo não metastático de linhagens celulares de câncer da mama. Outra anexina pouco expressa foi a *ANXA5*. Esse gene encontra-se superexpresso em muitos tumores sólidos, como tumores de fígado - hepatocarcinoma (Ohkubo *et al.*, 2000), câncer de mama (Sato; Ogata; De Luca, 2000), câncer cervical (Raynal *et al.*, 1993), cólon-retal (XUE *et al.*, 2009), entre outros, atuando principalmente na diferenciação celular, proliferação e carcinogênese, servindo, até, como potencial marcador para alguns cânceres. Em próstata, a *ANXA5* é super regulada e promove a tumorigênese e a progressão do câncer (Lee; Cho; Kim, 2011). Entretanto, a subexpressão de *ANXA5* no tratamento com PTC (+) depende de outras proteínas ou mesmo de outros membros de anexinas, as quais podem agir sinergicamente e afetar a progressão tumoral. Embora os mecanismos detalhados não estejam completamente definidos.

O gene *DLG5* codifica a proteína *disks large homolog 5* um membro da família de homólogos de discos grandes (*discs large* - DLG), um subconjunto da superfamília de quinase guanilato associada a membrana (*membrane-associated guanylate kinase* - MAGUK). As proteínas MAGUK são compostas de um domínio catalisador inativado de guanilato quinase, além dos domínios PDZ e SH3 (*Src homology 3*), e pensa-se que funcionam como moléculas do tipo *scaffolding* em locais de contato célula-célula (Dimitratos *et al.*, 1999; Harris; Lim,

2001). A proteína codificada por este gene localiza-se na membrana plasmática e citoplasma, e interage com os componentes das junções aderentes e do citoesqueleto (Funke; Dakoji; Bredt, 2005; Ren, 1993). O gene *DLG5* é altamente expresso em tecidos normais, mas a sua expressão é diminuída ou perdida nas linhagens celulares de câncer (Nakamura *et al.*, 1998). A regulação negativa do gene *DLG5* está altamente correlacionada com a fase do tumor (Smolen *et al.*, 2010) e a expressão de *DLG5* é ainda mais baixa em células de câncer do tipo basal (Sarrió *et al.*, 2008) e metaplásicas (Hennessy *et al.*, 2009), células que mostram o comportamento da transição epitelial-mesenquimal. A função das DLGs consiste na manutenção da polaridade celular, proliferação celular, migração e adesão, divisão celular e formação de sinapses. Ademais, elas estão implicadas em cânceres, como de mama, cervical, cólon, bexiga e próstata (Liu *et al.*, 2014; Tomiyama *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2015).

O gene *GRM2* expressa a proteína receptor 2 glutamato metabotrópico, pertencendo ao grupo II da classe de receptores. Os receptores metabotrópicos estão associados à família de receptores acoplados à proteína G (Flor *et al.*, 1995). O estudo de Arcella *et al.*, 2005 mostrou que o bloqueio de receptores metabotrópicos do grupo II induziu a redução na proliferação em linhagem de glioma. No entanto, é comum encontrar superexpressão de *GRM2* em câncer de mama (Speyer *et al.*, 2012), adenocarcinoma de pulmão (BIDKHORI *et al.*, 2013), câncer colorretal (Fukuda *et al.*, 1997), meduloblastomas e outros gliomas (Teh; Chen, 2012), levando a proliferação celular, uma vez que o gene *GRM2* é responsável por manter a via de sinalização do fator de crescimento endotelial (*epidermal growth factor* – EGF) (Arcella *et al.*, 2005).

A regulação de proteínas de remodelamento de cromatina e organização do centrossomal mostraram expressões diferenciadas no tratamento com o PTC (+).

O gene *CHD8* codifica a enzima *chromodomain-helicase-DNA-binding protein 8* e está envolvido com muitos processos de regulação positiva e negativa da via WNT. A via de sinalização WNT controla uma vasta gama de processos de desenvolvimento, incluindo proliferação celular, desencadeamento de processos celulares, polaridade celular e manutenção de células estaminais (Saito-Diaz *et al.*, 2013). O gene *CHD8* participa da via de desativação do complexo de transativação de beta-catenina. A beta-catenina é conhecida por recrutar uma série de repressores transcricionais e participar diretamente da via WNT (Song; Gelmann, 2008). Estudos mostram que o gene *CHD8* está super regulado em muitos cânceres (Latulippe *et al.*, 2002; Wallace *et al.*, 2008), além disso, esse gene mostra o papel de co-ativador do gene *AR*, favorecendo a proliferação celular (Menon; Yates; Bochar, 2010).

Outro gene diferencialmente expresso no tratamento com PTC (+) foi o *CHD3*, o qual codifica a enzima *Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 3*, porém, em relação ao *CHD8*, está agrupado em outra família (*CHD6–CHD9*) devido às pequenas diferenças de homologia (Aubry; Mattéi; Galibert, 1998; Woodage *et al.*, 1997), além de atuar em vias totalmente diferentes ao do gene *CHD8*. O gene *CHD3* é encontrado em complexos múltiplos, incluindo o complexo de desacetilase de remodelação de nucleosomas (*nucleosome remodeling deacetylase* - NuRD), o complexo que regula a desacetilação (através de *TRIM28*) e inativação de p53 e no carregamento de coesina na cromatina (Luo *et al.*, 2000; Wang; Zhang, 2001; Zhang *et al.*, 1998).

O trabalho de Sillibourne *et al.*, (2007) mostrou a interação dos genes *CHD3* e *CHD4* com a pericentrina e centrossomo. Os autores mostraram que a anulação funcional de *CHD3* e, de certa forma, mais relevante do que *CHD4*, interrompeu a integridade e função da organização dos microtúbulos, dos centrossomos e da progressão mitótica (fusos desorganizados, a maioria mostrando uma configuração semelhante a fase de prometáfase). Os componentes do complexo NuRD (*CHD3/4*, *MBD3*, e *HDAC1*) foi caracterizado no centrossomo e nos pólos do fuso durante a divisão celular, destacando a localização do gene *CHD3* de forma muito estável. Ainda, este trabalho mostrou que a depleção de *CHD3* utilizando siRNA causou perda de pericentrina, logo, também, de material centrossomal. Outros experimentos demonstraram que o nível de γ -tubulina, uma proteína centrossomal que se liga à pericentrina através da sua associação com o complexo do anel de γ -tubulina (γ -TuRC) (Zimmerman *et al.*, 2004), foi significativamente reduzida no centrossomo após o tratamento com siRNA contra *CHD3*, enquanto que uma redução pouco significativa foi observada com o tratamento com siRNA para o gene *CHD4* (Sillibourne *et al.*, 2007). A perda de material e o comprometimento da integridade centrossomal também foi evidenciada em nossos tratamentos com PTC (+), provavelmente do gene *CHD3*, aqui, apresentar-se subregulado, corroborando com os achados de Sillibourne *et al.*, (2007). Outros resultados encontrados que corroboram com o tratamento com PTC (+), ainda no trabalho de Sillibourne *et al.*, 2007, foi o fenótipo mais proeminente de células em prometáfase com desalinhamento dos cromossomos. Observou-se também um número significativo de fusos nos quais se separaram, dando origem a um eixo bipolar, mas apenas um pólo faz nucleação dos microtúbulos (configuração de fusos em monopólos), por vezes fusos tripolares, quadropolares (configuração de fusos em multipólos). Considerando que todas as células de controle entraram em mitose durante o tempo em que as células foram analisadas, apenas metade das células *CHD3*-depletadas entraram

mitose no mesmo período de tempo. Isto refletiu no atraso na fase do ciclo celular antes da mitose (queda na proliferação).

Algumas das células *CHD3*-depletadas que falharam na citocinese entraram em uma nova rodada de divisão, logo os defeitos em estádios múltiplos, da citocinese falha, são consistentes com a desorganização geral dos microtúbulos e potencialmente culminam com a formação de células poliplóides (Sillibourne *et al.*, 2007). Considerando todos esses achados fenotípicos, o gene *CHD3* e seus produtos podem ser considerados potenciais alvo do PTC (+). Outros estudos mostraram o papel de *CHD3* como um importante mediador da quimio-resistência no câncer ovariano, onde, após o silenciamento do gene, as células apresentaram crescimento lento e resistência a drogas anti-câncer como carboplatina e cisplatina (Cutter *et al.*, 2011).

Devemos destacar que a regulação de proteínas de atividade transcricional, replicação do DNA e manutenção de cromossomos foram diferencialmente expressas no tratamento com PTC (+). Por exemplo, a histona H3.2 (*HIST2H3A*) desempenha o papel central na regulação da transcrição, reparação do DNA, replicação do DNA e estabilidade cromossômica (Economopoulou *et al.*, 2009), essas histonas do tipo H3 estão em alta expressão em tumores prostáticos (Xiang *et al.*, 2007). Outro gene com alta expressão foi *HSPA1A*. A *HSPA1A* é uma das importantes HSPs implicadas na tolerância a temperatura. Foi demonstrado em estudos com linhagens de câncer que níveis mais elevados de *HSPA1A* estão associados com resistência ao calor (Khoie *et al.*, 2004). Provavelmente, o tratamento com PTC (+) causou algum estresse térmico, causando elevação da expressão de *HSPA1A*. Se, a célula é capaz de montar uma resposta competente, a histona (*HSPA1A*) pode acumular no núcleo contribuindo para a reativação e estimulação da DNA polimerase-beta, resultando em termotolerância (Takahashi *et al.*, 2008). Outra histona diferencialmente expressa foi a H3 da família 3B (H3.3B), expressa pelo gene *H3F3B* (ALBIG, 1995). O gene *H3F3B* é um dos três membros da família de histonas de subtipo de substituição H3 (Frank; Doenecke; Albig, 2003). Os membros das histonas de substituição (*H3.3A* e *H3.3B*) são tipicamente sintetizados independentemente da replicação do DNA, porém a expressão entre os genes *H3.3A* e *H3.3B* é diferente. Alterações no gene *H3F3B* foram encontradas em 95 % dos pacientes com condroblastoma (Behjati *et al.*, 2013 e 2014), além de alterações no mesmo gene estão relatadas em tumores ovarianos (Mes-Masson; Patricia, 2005). Em outras linhagens de câncer, o gene *H3F3B* aparece com altos níveis de expressão em várias linhagens tumorais humanas (tais como HL60, HeLa e HepG2) (Frank; Doenecke; Albig, 2003).

O gene *SMC4*, conhecido como a proteína 4 de manutenção estrutural dos cromossomos, é uma subunidade do *core* de condensina I e II, dois grandes complexos proteicos envolvidos na condensação cromossômica (Schmiesing *et al.*, 1998). Os níveis de proteínas das subunidades de condensina são constantes durante o ciclo celular, no entanto, as condensinas são enriquecidas em cromossomos mitóticos. O complexo de condensina I é evolutivamente conservado e consiste em cinco subunidades: duas subunidades da família SMC (manutenção estrutural dos cromossomas), *SMC2* e *SMC4*, e três subunidades não-SMC, *NCAPD2*, *NCAPH* e *NCAPG* (Kimura; Hirano, 1997). Quatro das cinco subunidades, *SMC4*, *NCAPD2*, *NCAPG* e *NCAPH*, são fosforiladas em células HeLa mitóticas e interfásicas, mas em locais diferentes (Takemoto *et al.*, 2004). Como a condensina I é citosólica, ela só obtém acesso aos cromossomos após a desintegração do envelope nuclear no início da prometáfase (ONO *et al.*, 2004). A condensina I, ativada pela fosforilação mediada por *CDK1*, promove a hipercondensação de cromossomos que já foram condensados na prófase através da ação da condensina II (Hirota *et al.*, 2004). Estudos mostram que o gene *SMC4* está relacionado a tumorigênese (Zhou *et al.*, 2012). Neste estudo, após análises por expressão gênica (*SMC4* mRNA - qRT-PCR), expressão *knockdown SMC4* (*SMC4* siRNAs), *western blotting* e imunohistoquímica, a expressão de *SMC4* foi significativamente associada com o tamanho do tumor, desdiferenciação, estádios avançados e invasão vascular dos cânceres hepáticos primários. Além disso, a expressão *knockdown* de *SMC4* reduziu a proliferação de células do câncer hepático. O trabalho de FENG *et al.*, (2014) também correlaciona a expressão de *SMC4* com a tumorigênese em câncer de colorretal. A expressão *knockdown* de *SMC4* suprimiu significativamente a proliferação celular, com diminuição do grau de malignidade. Outro trabalho mostrou a super expressão de *SMC4* em adenocarcinoma de pulmão, envolvendo a atividade deste gene no ciclo e divisão celular, levando a progressão tumoral (Bidkhorri *et al.*, 2013).

No trabalho de Chang *et al.*, (2011), o perfil proteico de linhagens de câncer de mama resistente a taxanos foi comparada com linhagens de mama resistentes a taxanos combinadas com tratamento com SAHA (*suberoylanilide hydroxamic acid*), um inibidor de histona desacetilase. Como resultado, a expressão de *SMC4* foi reduzida, indicando que uma combinação de taxanos e SAHA poderia ser eficaz para o tratamento do câncer de mama e que os genes envolvidos na resposta sinérgica ao paclitaxel e SAHA poderiam servir como biomarcadores para prever resposta terapêutica em doentes com câncer da mama.

Ainda em relação a genes que regulam a transcrição, o gene *NME1-NME2* é um nucleosídeo difosfato quinase (*nucleoside diphosphate kinase -NDPK*) com produto co-transcrito ocorrendo naturalmente dos genes vizinhos *NME1* e *NME2*. O RNA co-transcrito e a função do seu produto proteico ainda não foram determinados (Valentijn; Koster; Versteeg, 2006). Porém, alguns trabalhos mostram que níveis de baixa expressão de mRNA de *NME1-NME2* foram associados com metástases tumorais, participando como supressor de metástases (Youn; Kim; Kim, 2008). Nesse trabalho foi descrito que a proteína NME1-NME2, atua como uma molécula-chave na angiogênese do tumor da mama, inibindo o potencial metastático das células cancerosas através da sua interação com proteínas envolvidas com a sinalização celular. Deste modo, os níveis diminuídos de proteína NME1-NME2 falharam em exercer seu papel como supressores da tumorigênese e da angiogênese.

O gene *PIK3CB* codifica a enzima fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-quinase de subunidade beta catalítica e está envolvida em vias de sinalização que regulam o crescimento celular, em virtude da sua ativação em resposta a vários estímulos mitogênicos (HU *et al.*, 1993). As PI3Ks de classe I são enzimas bem caracterizadas e incluem as da classe IA (p110 α , p110 β e p110 δ) e as da classe IB (p110 γ). A P110 α é necessária para sustentar a proliferação de tumores *PIK3CA* mutantes (Samuels *et al.*, 2004), enquanto p110 β , codificada pelo gene *PIK3CB*, está implicada na tumorigênese (Torbett *et al.*, 2008). A principal via de ativação gênica é a PI3K, associada ao controle do crescimento e da proliferação celular em células epiteliais normais e na ativação aberrante na tumorigênese, desregulando o metabolismo celular, a proliferação, a apoptose e a angiogênese (Gustafson *et al.*, 2010; Lopiccolo *et al.*, 2008; Shaw; Cantley, 2006), frequentemente ativado em câncer de próstata (Marques *et al.*, 2015). Além disso, essa via está envolvida na resistência de muitos tumores à quimioterápicos (Zhan; Han, 2004; Zhang *et al.*, 2010). Devido muitos cânceres dependerem da via PI3K, grupos de pesquisa procuram produzir novos fármacos que atuem na mesma (Blagden *et al.*, 2014; Fruman; Cantley, 2014; Liu *et al.*, 2009; Shah; Mangaonkar, 2015; Marques *et al.*, 2015; Morabito *et al.*, 2015; Okoli *et al.*, 2015).

Recentes trabalhos mostram que as PI3Ks estão implicadas em vários tipos de câncer como de colorretal (WU *et al.*, 2016), colorretal resistente a multidrogas (Wen *et al.*, 2014), câncer de pulmão (Stamatkin *et al.*, 2015), leucemia (Shah; Mangaonkar, 2015), leucemia linfocítica crônica (Morabito *et al.*, 2015), carcinoma de células escamosas esofágico (Zhu *et al.*, 2015), câncer de próstata (Manson-Bahr *et al.*, 2015; Marques *et al.*, 2015), adenocarcinoma retal (Yu *et al.*, 2014), adenocarcinoma pancreático (Wu *et al.*, 2014),

meduloblastoma (Salm *et al.*, 2015), linfoma não-Hodgkin (Okoli *et al.*, 2015), linfoma de células B (Fruman; Cantley, 2014) e mieloma múltiplo (Hofmann *et al.*, 2014).

Proteínas envolvidas com atividade de regulação de proteínas associadas ao estresse, apoptose, choque térmico e via glicolítica também foram diferencialmente expressas no tratamento com PTC (+).

O gene *P4HB*, também conhecido como um dissulfeto isomerase, é uma proteína multifuncional que catalisa a formação e rearranjo de ligações dissulfeto. Ele age como uma chaperona molecular que ajuda na estruturação de proteínas com erros de conformação (*misfolded*) em resposta ao estresse de retículo endoplasmático (Noiva, 1999; Radons, 2016) e estudos correlacionando *in vitro*, *in vivo*, e dados clínicos implicam que o *P4HB* ocupa um papel importante na resistência tumoral ao tratamento com Temozolomide, um composto padrão ouro para o tratamento de câncer, como o glioblastoma multiforme (SUN *et al.*, 2013). O gene *HSPA6* também participa como chaperona (Radons, 2016) na remodelagem de proteínas que são expressas apenas depois de condições de estresse severo (Hageman *et al.*, 2011).

Outro gene associado ao estresse é o *ATM*. Também conhecido como serina proteína quinase, este gene está relacionado com dano de DNA e controle do ciclo celular, atuando como regulador (Lapenna; Giordano, 2009). O trabalho de DEEP *et al.*, 2006 mostrou que as substâncias *Silymarin* e *silibinin* causaram parada do ciclo celular em G₂/M em PC3, provavelmente estando associada ao aumento da fosforilação de Chk2 (*checkpoint kinase 2*) e, consequentemente, aumento na expressão do *ATM*. É importante destacar que, a transição G₂/M é regulada positivamente pelo complexo Cdc2 e ciclina B (Taylor; STARK, 2001) e a família Cdc25 de fosfatases regulam a atividade de Cdc2 através da desfosforilação por fosforilação inibitória na treonina 14 e na tirosina 15 (Sebastian; Kakizuka; HUNTER, 1993). Estas fosfatases são inativadas através da fosforilação por quinases de controle celular (Chk1/2), que, por sua vez, podem ser ativadas pelo gene *ATM* - quinase em resposta a danos no DNA (Singh *et al.*, 2004). Outro gene também envolvido no dano de DNA é o *PRKDC*, uma subunidade catalítica da proteína quinase dependente de DNA (RUIS *et al.*, 2008). Estudos mostram que *PRKDC* está altamente expresso em câncer colorretal (Sun *et al.*, 2016).

O gene *TRIM28*, da família de motivo (*motif*) tripartido, está associado em câncer gástrico como super expresso e com pobre prognóstico nos pacientes (YOKOE *et al.*, 2010). A ação do *TRIM28* é de inibir o gene *p53* por interagir com a oncoproteína MDM2 e promover degradação e ubiquitilação (Wang *et al.*, 2005) do *p53*. Além disso, *TRIM28* e *MDM2* causam inibição da acetilação de *p53*, possivelmente devido ao recrutamento de *HDAC1* para

complexos *p53-MDM2* realizadas pela *TRIM28* (Hatakeyama, 2011). Porém, a linhagem de PC3 não expressa o gene *p53*, levando a crer a regulação por *TRIM28* a outros genes envolvidos com a morte celular.

O gene *HUWE1* codifica a proteína 1 contendo os domínios HECT, UBA e WWE (enzima E3), desempenhando um papel importante na coordenação de diversos processos celulares, como replicação do DNA, reparo de danos no DNA, regulação da transcrição e apoptose (Markkanen *et al.*, 2012; Parsons *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2008). A enzima E3 possui muitos substratos (*Cdc6*, *Mcl-1*, histonas, *c-Myc* e *p53*), fazendo que a classificação de gene em promotor ou supressor tumoral seja incerto (MA *et al.*, 2016). Outro gene envolvido com complexo ligase E3 é *UBR5* (*Ubiquitin protein ligase E3 component n-recognin 5*). O gene *UBR5* raramente é mutado em tecidos somáticos saudáveis, mas é mutado e/ou excessivamente expresso em câncer (Clancy *et al.*, 2003; O'brien *et al.*, 2008). Esse gene possui inúmeros papéis e associações (integridade genômica, expressão gênica, apoptose, reparo de DNA, ciclo celular, pluripotência, metabolismo, angiogênese) tanto por superexpressão, quanto por ativação. Esses processos serão desencadeados dependendo do substrato e das vias de atuação (Shearer *et al.*, 2015).

O gene *HNRNPH3* pertence à subfamília de ribonucleoproteínas nucleares heterogêneas expressas ubiquamente. Os hnRNPs são proteínas de ligação de RNA e complexam-se com RNA nuclear heterogêneo (*heterogeneous nuclear RNA* - hnRNA). Essas proteínas estão associadas com pré-mRNAs no núcleo e parecem influenciar o processamento de pré-mRNA, além de outros aspectos do metabolismo e transporte do mRNA (Lutz; Jacob; Fuchs, 1988). A proteína codificada por este gene tem duas repetições de domínios *quasi-RRM* que se ligam aos RNAs. Esta proteína está envolvida no processo de *splicing* (Honoré *et al.*, 2000), também participa na parada desse processo induzida por choque térmico (Mahé *et al.*, 1997) e como regulador do processo de apoptose por regular a expressão de *Bcl-2* (família de proteínas reguladores chaves da apoptose) (Garneau *et al.*, 2005). Outro gene que regula a apoptose é o *PPIA*. Este gene expressa a enzima *peptidylprolyl isomerase A* (*PPIA*), também conhecida como ciclofilina A (*CypA*) ou rotamase, permitindo regular muitos processos biológicos, incluindo sinalização intracelular, transcrição, inflamação, apoptose e patogênese do vírus da AIDS (AN *et al.*, 2007). Trabalhos mostram a expressão elevada desse gene em muitos cânceres, incluindo carcinoma de células escamosas esofágico (Li *et al.*, 2013), colangiocarcinoma (Obchoei *et al.*, 2015), mieloma múltiplo (Zhu *et al.*, 2015), câncer gástrico

(FENG *et al.*, 2015), câncer de pâncreas, câncer de pulmão de células não pequenas e carcinoma hepatocelular (Lee, 2010; LI *et al.*, 2006; Qian *et al.*, 2012).

O gene *PGK1* codifica a proteína fosfoglicerato quinase 1 e é uma enzima glicolítica geradora de ATP participando da via glicolítica (Migita *et al.*, 2001), além de ser regulado pelo fator indutor de hipóxia-1 α (HIF-1 α) (Daly *et al.*, 2004). A função desse gene é catalisar a conversão de 1,3-difosfoglicerato em 3-fosfoglicerato possuindo ainda efeitos na replicação e reparação do DNA (Popanda *et al.*, 1998; Ronai, 1993; Vandeberg, 1985). Possui ainda influência na angiogênese do tumor promovendo a formação extracelular de angiostatina a partir da plasmina em alta expressão de *PGK1* (Vaupel; Mayer, 2007). Logo, essas alterações metabólicas resultam em mudanças fisiológicas das células que se correlacionam com características biológicas da lesão maligna.

Muitos trabalhos mostram que o gene *PGK1* está super regulado e associado positivamente com a tumorigênese, crescimento tumoral, angiogênese e metástase de muitos cânceres, como neuroblastoma (Ameis *et al.*, 2013), astrocitoma (Yan *et al.*, 2012), câncer de cólon (Ahmad *et al.* 2013), câncer de pulmão (Chen *et al.*, 2003), câncer gástrico (Zieker *et al.*, 2010), câncer de próstata (Jung *et al.*, 2009; Larson *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2010), câncer pancreático (Cecconi; Palmieri; Donadelli, 2011), câncer ovariano resistente a multi-drogas (Duan *et al.*, 2001) e câncer de fígado (Ai *et al.*, 2003).

As interações são estabelecidas utilizando-se diversos parâmetros, que incluem as associações diretas (físico) e indiretas (funcional), provenientes de quatro fontes: o contexto genômico, experimentação, co-expressão e relatos na literatura acerca das proteínas. Atualmente, o STRING possui informações sobre mais de 9 milhões de proteínas de mais de 2 mil organismos (Szklarczyk *et al.*, 2014). As diferentes interações e “parcerias“ funcionais que ocorrem entre as proteínas estão no cerne do processamento celular e sua caracterização sistemática ajuda a contextualizar essas proteínas no sistema celular biológico.

A rede de interação criada evidencia, como os principais nós, proteínas do citoesqueleto relacionando-se de forma bem consistente quando os valores de confiança são acima de 0,400. É importante lembrar que muitas dessas interações já foram discutidas nas sessões anteriores. No entanto, muitas interações observadas na rede gerada se baseiam apenas em relatos científicos e em homologias com outras categorias de proteínas, nos quais duas proteínas são relacionadas; além disso, esses relatos estão, ainda, associados a interações dessas proteínas em outras espécies, logo, sendo mais difícil definir a real participação de cada proteína. Algumas proteínas aqui identificadas e diferencialmente expressas no tratamento com

PTC (+) não mostraram relações diretas entre si (*KIF7*, *ACAD11*, *ZC3H13*, *HNRNPH3*, *UBR5*, *ITGB4*, *PRG4*, *PTPN13*, *UNC80* e *KTN1*), como se, durante o tratamento outras redes e “comunidades proteicas” fossem afetadas ao mesmo tempo. Porém, para essas proteínas, quando se reduz o valor de *confidence score* do STRING para menos de 0.400, essas proteínas passam a se relacionar, entretanto, semelhante a interações pouco precisas de homologias entre outras proteínas e homologias em outras espécies.

De uma maneira geral, quando se analisa um interatoma, as proteínas identificadas como membros de mais de uma “comunidade proteica” são de particular interesse. Em geral, cada “comunidade proteica” representa um processo celular distinto, por conseguinte, aquela proteína que, por exemplo, é membro de várias “comunidades” pode estar participando de múltiplos processos, e pode ser considerada com o sentido a “interface” de distintos, mas adjacentes, processos celulares (Jonsson; Bates, 2006).

Como representado na rede do interatoma (Figura 29) e, já mencionado, muitas proteínas diferencialmente expressas estão associadas ao citoesqueleto, envolvendo a disposição da rede de actina, microtúbulos, organização e regulação do fuso mitótico, bem como na manutenção da integridade do centróssomo. Muitas das proteínas citadas e já discutidas aqui relacionam-se principalmente no contato entre a membrana celular com o citoesqueleto de actina e microtubular.

A actina, juntamente com a miosina II, é importante para a separação do centróssomos ao fornecer forças corticais que direcionam a separação dos centróssomos recém-duplicados (Rosenblatt *et al.*, 2004). Rosenblatt *et al.*, (2004) hipotetizam que, se os microtúbulos astrais anexam ao citoesqueleto da actina cortical e estimulam um relaxamento local da miosina II, as forças contráteis assimétricas induzidas conduziriam a separação centróssomo. Se as células tiverem dois centróssomos, o estado de energia mais baixo esperado será a disposição de dois centróssomos em pólos opostos.

De fato, a contribuição da rigidez cortical para a formação do fuso tem sido recentemente demonstrada em estudos múltiplos, o que parece ser mediado em grande parte pela ativação da moesina (Carreno *et al.*, 2008; Kunda *et al.*, 2008). As proteínas ERM ligam-se à actina e mantém o córtex rígido através da ligação cruzada do córtex de actina com a membrana plasmática (Bretscher; Edwards; Fehon, 2002). A depleção da moesina, o único membro da família ERM em *Drosophila*, prejudica a rigidez cortical e é importante para a formação e posicionamento do fuso (Carreno *et al.*, 2008; Kunda *et al.*, 2008).

O membro da família ERM, ezrina, localiza-se heterogeneamente no córtex celular onde se formam as fibras de retração (FRs). As FRs são estruturas ricas em actina que se formam durante o arranjo mitótico nos locais de forte adesão. As regiões de FR são importantes para promover a interação dos microtúbulos astrais com o córtex, direcionando a orientação do fuso (Théry *et al.*, 2005). Assim, a rigidez cortical dependente de actina durante a mitose é importante para o agrupamento de centrossomos, facilitando a interação dos microtúbulos astrais com o córtex celular. As proteínas associadas aos microtúbulos ligadas com as extremidades (+) dos MTs, tais como CLIP-170, também são importantes para a ancoragem de MTs ao córtex. Os MTs motores, tais como as dineínas motriz (*DNAH9* e *DNAH12*), são provavelmente também responsáveis pelas forças de tração necessárias para o posicionamento do fuso (Nguyen-Ngoc; Afshar; Gönczy, 2007).

As proteínas quinases Rho também fosforilam e regulam as proteínas ezrin/radixina/moesina (Matsui *et al.*, 1998; Shaw *et al.*, 1998), um processo crucial na montagem de adesões focais e F-actina (Mackay *et al.*, 1997). Os aumentos na síntese de fosfatidil inositol bisfosfato (PIP2) estimulados pela GTPases podem regular a polimerização da actina e a formação de contato focal devido à capacidade de PIP2 ligar-se e regular a atividade de várias proteínas associadas à actina (Hartwig *et al.*, 1995; Ren; Schwartz, 1998; Tolia; Cantley; Carpenter, 1995).

Outra interessante interação acontece entre as proteínas dos genes *TCPI* e *CCT5* com as proteínas do citoesqueleto *ACTA1*, *ACTG1* e *TUBB6*. Os genes *TCPI* e *CCT5* são responsáveis pela síntese e modelagem das proteínas citoesqueleto alfa-actina, gama-actina, tubulina 6 (Coghlin *et al.*, 2006; Liou; Willison, 1997), aqui diferencialmente expressas.

Os genes de choque térmico *HSPA6*, *HSPA1A* e *P4HB*, associados ao estresse celular, estão interagindo entre si e diretamente com os genes reguladores *TCPI* e *CCT5*, mostrando uma interação altamente regulada. Essas interações, provavelmente, podem ser atribuídas ao tratamento com o PTC (+), uma vez que estas chaperonas participam em todos estes processos através da sua capacidade de reconhecer conformações não nativas de outras proteínas, ligando-se à segmentos desses peptídios após danos induzidos por estresse (Liou; Willison, 1997; Noiva, 1999).

6 CONCLUSÃO

O PTC (+) tem potencial antitumoral, tendo causado parada na divisão celular (G_2/M) em prófase/prometáfase, em linhagem de próstata. O PTC (+) induziu ação contra as linhagens de próstata, causando parada na divisão celular (G_2/M) em prófase/prometáfase, diminuindo, assim, a proliferação celular. A disposição dos fusos mitóticos em monopólos foram, em sua maioria, presentes nos tratamentos de 2,5 μM e 7,95 μM . O tratamento com PTC (+) causou desorganização dos centrossomos, comprometendo sua integridade, provavelmente resultado de um impedimento na regulação e recrutamento de proteínas associadas à formação e maturação dos centrossomos, entretanto, o tratamento não impediu a divisão dos centríolos. Ainda, após longo período de exposição ao PTC, a rede de actina foi comprometida pela desorganização das fibras e polarização em regiões corticais e em pontos focais no citoplasma celular. O resultado na identificação e quantificação de proteínas obtido indicam que além de proteínas envolvidas com o citoesqueleto, proteínas de regulação transcricional, de remodelagem de cromatina e de estresse celular foram diferencialmente expressos e associados diretamente entre si e entre as proteínas que constituem o citoesqueleto celular. Interessantemente, a proteína codificada pelo gene *CHD3*, uma vez subregulada no perfil proteico, curiosamente, mostrou efeitos muito semelhantes ao que acontece com o tratamento com o PTC (+), tornando-se um possível candidato e alvo para elucidar potencial mecanismo de ação. O PTC (+) apresentou resultados que levam a crer que seu mecanismo de ação envolva mais de um alvo, tornando-o, assim, um modelo na pesquisa e desenvolvimento de compostos multi-alvos e de ação multi-segmentada.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

Estudos posteriores devem ser realizados para *knockin* desse gene em PC3 devem ser realizados, bem como ensaios *in silico* de *docking* molecular entre a molécula e o putativo alvo, com intuito de confirmar o potencial mecanismo de ação do pterocarpano.

Finalmente, os dados farmacológicos, fenotípicos e de expressão diferencial proteica, no tratamento com o pterocarpano aqui apresentados, contribuem para o desenvolvimento e validação de potenciais alvos para posterior validação. Por estas razões, a base lógica do novo desenvolvimento de fármacos anticâncer é a prospecção de compostos líder selecionados com base na sua propriedade para inibir múltiplos alvos. Embora o uso de terapias direcionadas seja relativamente recente em oncologia, seu objetivo mudou muito rapidamente nos últimos anos. A partir do objetivo original de encontrar o fármaco mais específico, agindo sobre um único alvo para matar seletivamente células neoplásicas, o objetivo se voltou para encontrar compostos capazes de inibir várias moléculas, cuja ativação pode contribuir para a progressão do câncer. As vantagens da multi-segmentação, em comparação com a abordagem de alvo único, estão se tornando evidentes como a experiência da clínica que prossegue. O mais relevante é, provavelmente, que estas drogas possam ajudar a superar a resistência a terapias específicas, um fenômeno inesperado observado durante os ensaios clínicos, o que é frequentemente devido à ativação de vias alternativas.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, R. T. Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. **Genes & development**, v. 15, n. 17, p. 2177-2196, 2001.
- ABUALHASAN, M. N. *et al.* Doing the methylene shuffle—Further insights into the inhibition of mitotic kinesin Eg5 with S-trityl l-cysteine. **European journal of medicinal chemistry**, v. 54, p. 483-498, 2012.
- AHMAD, S. S. *et al.* Phosphoglycerate kinase 1 as a promoter of metastasis in colon cancer. **International journal of oncology**, v. 43, n. 2, p. 586-590, 2013.
- AI, J. *et al.* FLNA and PGK1 are two potential markers for progression in hepatocellular carcinoma. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 27, n. 3-4, p. 207-216, 2011.
- AKKARI, P. Anthony *et al.* Production of human skeletal α -actin proteins by the baculovirus expression system. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 307, n. 1, p. 74-79, 2003.
- ALBANESE, C. *et al.* Activation of the cyclin D1 gene by the E1A-associated protein p300 through AP-1 inhibits cellular apoptosis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 48, p. 34186-34195, 1999.
- ALBIG, W. *et al.* The human replacement histone H3. 3B gene (H3F3B). **Genomics**, v. 30, n. 2, p. 264-272, 1995.
- AMEIS, H. M. *et al.* PGK1 as predictor of CXCR4 expression, bone marrow metastases and survival in neuroblastoma. **PLoS one**, v. 8, n. 12, p. e83701, 2013.
- American Cancer Society. **Cancer facts and figures**. Atlanta, NW: American Cancer society, n° de páginas 56, 2016.
- AN, P. *et al.* Regulatory polymorphisms in the cyclophilin A gene, PPIA, accelerate progression to AIDS. **PLoS Pathog**, v. 3, n. 6, p. e88, 2007.
- ANDERSEN, R. J. *et al.* Regression of castrate-recurrent prostate cancer by a small-molecule inhibitor of the amino-terminus domain of the androgen receptor. **Cancer cell**, v. 17, n. 6, p. 535-546, 2010.
- APOSTOLOU, P.; TOLOUDI, M.; PAPASOTIRIOU, I. P-042The genetic profile of pancreatic circulating tumor cells. **Annals of Oncology**, v. 27, n. Suppl 2, p. ii13, 2016.
- APWEILER, R. *et al.* UniProt: the universal protein knowledgebase. **Nucleic acids research**, v. 32, n. suppl 1, p. D115-D119, 2004.
- ARCELLA, A. *et al.* Pharmacological blockade of group II metabotropic glutamate receptors reduces the growth of glioma cells in vivo. **Neuro-oncology**, v. 7, n. 3, p. 236-245, 2005.
- ASPENSTRÖM, P.; FRANSSON, Å.; SARAS, J. Rho GTPases have diverse effects on the organization of the actin filament system. **Biochemical Journal**, v. 377, n. 2, p. 327-337,

2004.

ATTAR, R. M.; TAKIMOTO, C. H.; GOTTARDIS, M. M. Castration-resistant prostate cancer: locking up the molecular escape routes. **Clinical Cancer Research**, v. 15, n. 10, p. 3251-3255, 2009.

AUBRY, F.; MATTÉI, M.; GALIBERT, F. Identification of a human 17p-located cDNA encoding a protein of the Snf2-like helicase family. **European journal of biochemistry**, v. 254, n. 3, p. 558-564, 1998.

AWALE, S. *et al.* Constituents of Brazilian red propolis and their preferential cytotoxic activity against human pancreatic PANC-1 cancer cell line in nutrient-deprived condition. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 16, n. 1, p. 181-189, 2008.

AZIMZADEH, J.; BORNENS, M. Structure and duplication of the centrosome. **Journal of cell science**, v. 120, n. 13, p. 2139-2142, 2007.

BACAL, N. S.; FAULHABER, M. H. W. **Aplicação prática em citometria de fluxo**. São Paulo: Atheneu. Instituto de ensino e pesquisa Albert Einstein, 2003.

BAKER, D. D. *et al.* The value of natural products to future pharmaceutical discovery. **Natural product reports**, v. 24, n. 6, p. 1225-1244, 2007.

BALTER, J. M. *et al.* Online repositioning during treatment of the prostate: a study of potential limits and gains. **International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics**, v. 27, n. 1, p. 137-143, 1993.

BANERJEE, Abhijit G. *et al.* Expression of biomarkers modulating prostate cancer angiogenesis: differential expression of annexin II in prostate carcinomas from India and USA. **Molecular cancer**, v. 2, n. 1, p. 34, 2003.

BANYARD, J. *et al.* Identification of genes regulating migration and invasion using a new model of metastatic prostate cancer. **BMC cancer**, v. 14, n. 1, p. 387, 2014.

BARDERAS, R.; BABEL, I.; CASAL, J. I. Colorectal cancer proteomics, molecular characterization and biomarker discovery. **PROTEOMICS-Clinical Applications**, v. 4, n. 2, p. 159-178, 2010.

BARTEK, J.; LUKAS, J. DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation. **Current opinion in cell biology**, v. 19, n. 2, p. 238-245, 2007.

BASSET, C. *et al.* Secondary metabolites from *Spirotropis longifolia* (DC) Baill and their antifungal activity against human pathogenic fungi. **Phytochemistry**, v. 74, p. 166-172, 2012.

BASTO, R. *et al.* Centrosome amplification can initiate tumorigenesis in flies. **Cell**, v. 133, n. 6, p. 1032-1042, 2008.

BASTO, R. *et al.* Centrosome amplification can initiate tumorigenesis in flies. **Cell**, v. 133, n. 6, p. 1032-1042, 2008.

- BASTO, R. *et al.* Flies without centrioles. **Cell**, v. 125, n. 7, p. 1375-1386, 2006.
- BEHJATI, S. *et al.* Corrigendum: Distinct H3F3A and H3F3B driver mutations define chondroblastoma and giant cell tumor of bone. **Nature genetics**, v. 46, n. 3, p. 316-316, 2014.
- BEHJATI, S. *et al.* Distinct H3F3A and H3F3B driver mutations define chondroblastoma and giant cell tumor of bone. **Nature genetics**, v. 45, n. 12, p. 1479-1482, 2013.
- BELYANTSEVA, I. A. *et al.* γ -Actin is required for cytoskeletal maintenance but not development. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 24, p. 9703-9708, 2009.
- BENITAH, S. A. *et al.* Rho GTPases in human carcinogenesis: a tale of excess. **Clinical and Translational Oncology**, v. 5, n. 2, p. 70-78, 2003.
- BERG, J. S.; POWELL, B. C.; CHENEY, R. E. A millennial myosin census. **Molecular biology of the cell**, v. 12, n. 4, p. 780-794, 2001.
- BERGNES, G.; BREJC, K.; BELMONT, L. Mitotic kinesins: prospects for antimitotic drug discovery. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 5, n. 2, p. 127-145, 2005.
- BERMAN, D. M. *et al.* Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours. **Nature**, v. 425, n. 6960, p. 846-851, 2003.
- BETTENCOURT-DIAS, Mónica; GLOVER, David M. Centrosome biogenesis and function: centrosomes brings new understanding. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 6, p. 451-463, 2007.
- BIDKHORI, G. *et al.* Reconstruction of an integrated genome-scale co-expression network reveals key modules involved in lung adenocarcinoma. **PloS one**, v. 8, n. 7, p. e67552, 2013.
- BILHEIMER, D. W. *et al.* Mevinolin and colestipol stimulate receptor-mediated clearance of low density lipoprotein from plasma in familial hypercholesterolemia heterozygotes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 80, n. 13, p. 4124-4128, 1983.
- BILL-AXELSON, A. *et al.* Radical prostatectomy versus watchful waiting in early prostate cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 364, n. 18, p. 1708-1717, 2011.
- BLAGDEN, S. *et al.* First-in-human study of CH5132799, an oral class I PI3K inhibitor, studying toxicity, pharmacokinetics, and pharmacodynamics, in patients with metastatic cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 20, n. 23, p. 5908-5917, 2014.
- BLAGDEN, S. P.; GLOVER, D. M. Polar expeditions—provisioning the centrosome for mitosis. **Nature cell biology**, v. 5, n. 6, p. 505-511, 2003.
- BLASKO, J. C.; GRIMM, P. D.; RAGDE, Haakon. Brachytherapy and organ preservation in the management of carcinoma of the prostate. In: **Seminars in radiation oncology**. WB Saunders, 1993. p. 240-249.

- BLATT, C. T. T. *et al.* Cytotoxic flavonoids from the stem bark of *Lonchocarpus aff. fluvialis*. **Phytotherapy Research**, v. 16, n. 4, p. 320-325, 2002.
- BOLTE, S.; CORDELIÈRES, F. P. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. **Journal of microscopy**, v. 224, n. 3, p. 213-232, 2006.
- BORCHARDT, J. K. The beginnings of drug therapy: Ancient mesopotamian medicine. **Drug News Perspect**, v. 15, n. 3, p. 187-192, 2002.
- BORISY, G. G.; TAYLOR, E. W. The mechanism of action of colchicine: colchicine binding to sea urchin eggs and the mitotic apparatus. **The Journal of cell biology**, v. 34, n. 2, p. 535, 1967.
- BORNENS, M. Centrosome composition and microtubule anchoring mechanisms. **Current opinion in cell biology**, v. 14, n. 1, p. 25-34, 2002.
- BOTZ, J. *et al.* Cell cycle regulation of the murine cyclin E gene depends on an E2F binding site in the promoter. **Molecular and Cellular Biology**, v. 16, n. 7, p. 3401-3409, 1996.
- BOVERI, T. **The origin of malignant tumors**. [S.l.]: Williams & Wilkins, 1929.
- BOVERI, T. **Über mehrpolige mitosen als mittel zur analyse des zellkerns**. [S.l.:s.n.], 1902.
- BRANGWYNNE, C. P. *et al.* Microtubules can bear enhanced compressive loads in living cells because of lateral reinforcement. **The Journal of cell biology**, v. 173, n. 5, p. 733-741, 2006.
- BRETSCHER, A.; EDWARDS, K.; FEHON, R. G. ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 3, n. 8, p. 586-599, 2002.
- BROWN, L. M. *et al.* Quantitative and qualitative differences in protein expression between papillary thyroid carcinoma and normal thyroid tissue. **Molecular carcinogenesis**, v. 45, n. 8, p. 613-626, 2006.
- BRUYÈRE, C.; MEIJER, L. Targeting cyclin-dependent kinases in anti-neoplastic therapy. **Current opinion in cell biology**, v. 25, n. 6, p. 772-779, 2013.
- BUARQUE, C. D. *et al.* 11a-N-Tosyl-5-deoxy-pterocarpan (LQB-223), a promising prototype for targeting MDR leukemia cell lines. **European journal of medicinal chemistry**, v. 78, p. 190-197, 2014.
- BUARQUE, C. D. *et al.* Pterocarpanquinones, aza-pterocarpanquinone and derivatives: Synthesis, antineoplastic activity on human malignant cell lines and antileishmanial activity on *Leishmania amazonensis*. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 19, n. 22, p. 6885-6891, 2011.
- BUBB, M. R. *et al.* Effects of jasplakinolide on the kinetics of actin polymerization an explanation for certain in vivo observations. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 7, p. 5163-5170, 2000.

BUBB, M. R. *et al.* Swinholide A is a microfilament disrupting marine toxin that stabilizes actin dimers and severs actin filaments. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 8, p. 3463-3466, 1995.

BURSTEIN, H. J. *et al.* Clinical Cancer Advances 2017: Annual Report on Progress Against Cancer From the American Society of Clinical Oncology. **Journal of Clinical Oncology**, v. 35, n. 12, p. 1341-1367, 2017.

CALLESEN, A. K. *et al.* Reproducibility of mass spectrometry based protein profiles for diagnosis of ovarian cancer across clinical studies: A systematic review. **Journal of proteomics**, v. 75, n. 10, p. 2758-2772, 2012.

CANCER Research Uk. Disponível em: <http://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/worldwide-cancer#heading-Zero>. Acesso em: 28 dez. 2016.

CARBON, S. *et al.* AmiGO: online access to ontology and annotation data. **Bioinformatics**, v. 25, n. 2, p. 288-289, 2009.

CARDOZO, C. P. *et al.* C-terminal Hsp-interacting protein slows androgen receptor synthesis and reduces its rate of degradation. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 410, n. 1, p. 134-140, 2003.

CARRENO, S. *et al.* Moesin and its activating kinase Slik are required for cortical stability and microtubule organization in mitotic cells. **The Journal of cell biology**, v. 180, n. 4, p. 739-746, 2008.

CARVAJAL, R. D.; TSE, A.; SCHWARTZ, G. K. Aurora kinases: new targets for cancer therapy. **Clinical Cancer Research**, v. 12, n. 23, p. 6869-6875, 2006.

CARVALHO, H. F.; RECCO-PIMENTEL, S. M. **A célula**. [S.l.]: Manole, 2013.

CASTELLANOS, E.; DOMINGUEZ, P.; GONZALEZ, C. Centrosome dysfunction in Drosophila neural stem cells causes tumors that are not due to genome instability. **Current Biology**, v. 18, n. 16, p. 1209-1214, 2008.

CAZARES, L. H. *et al.* MALDI tissue imaging: from biomarker discovery to clinical applications. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 401, n. 1, p. 17-27, 2011.

CECCONI, D.; PALMIERI, M.; DONADELLI, M. Proteomics in pancreatic cancer research. **Proteomics**, v. 11, n. 4, p. 816-828, 2011.

CENTERS for disease control and prevention (CDC). Disponível em: <http://www.cdc.gov/cancer/international/statistics.htm> Acesso em: 04 dez. 2016.

CERVEIRA, N., BIZARRO, S. TEIXEIRA, M. Cancer cell cycle. **Journal of the Portuguese Biochemical Society**, v. 9, p. 47, 2012.

CHAMPINE, P. J. *et al.* Microarray analysis reveals potential mechanisms of BRMS1-mediated metastasis suppression. **Clinical & experimental metastasis**, v. 24, n. 7, p. 551-565, 2007.

CHANG, A. J. *et al.* High-risk prostate cancer [mdash] classification and therapy. **Nature reviews Clinical oncology**, v. 11, n. 6, p. 308-323, 2014.

CHANG, H. *et al.* Identification of genes associated with chemosensitivity to SAHA/taxane combination treatment in taxane-resistant breast cancer cells. **Breast cancer research and treatment**, v. 125, n. 1, p. 55-63, 2011.

CHAO, C. *et al.* Statin therapy is not associated with prostate cancer recurrence among patients who underwent radiation therapy. **Cancer letters**, v. 335, n. 1, p. 214-218, 2013.

CHE, C. *et al.* DNA microarray reveals different pathways responding to paclitaxel and docetaxel in non-small cell lung cancer cell line. **International journal of clinical and experimental pathology**, v. 6, n. 8, p. 1538-1548, 2013.

CHEN, G. *et al.* Protein profiles associated with survival in lung adenocarcinoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 23, p. 13537-13542, 2003.

CHEN, Q. Y. *et al.* Silence of ezrin modifies migration and actin cytoskeleton rearrangements and enhances chemosensitivity of lung cancer cells in vitro. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 377, n. 1-2, p. 207-218, 2013.

CHOI, H. J.; ZHU, B. T. Critical role of cyclin B1/Cdc2 up-regulation in the induction of mitotic prometaphase arrest in human breast cancer cells treated with 2-methoxyestradiol. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1823, n. 8, p. 1306-1315, 2012.

CIEMERYCH, M. A. *et al.* Development of mice expressing a single D-type cyclin. **Genes & development**, v. 16, n. 24, p. 3277-3289, 2002.

CLANCY, J. L. *et al.* EDD, the human orthologue of the hyperplastic discs tumour suppressor gene, is amplified and overexpressed in cancer. **Oncogene**, v. 22, n. 32, p. 5070-5081, 2003.

COGHLIN, C. *et al.* Characterization and over-expression of chaperonin t-complex proteins in colorectal cancer. **The Journal of pathology**, v. 210, n. 3, p. 351-357, 2006.

COLE, A. M. *et al.* Cyclin D2–cyclin-dependent kinase 4/6 is required for efficient proliferation and tumorigenesis following Apc loss. **Cancer research**, v. 70, n. 20, p. 8149-8158, 2010.

CONDEELIS, J.; SINGER, R. H.; SEGALL, J. E. The great escape: when cancer cells hijack the genes for chemotaxis and motility. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 21, p. 695-718, 2005.

COOPER, A. B. *et al.* A unique function for cyclin D3 in early B cell development. **Nature immunology**, v. 7, n. 5, p. 489, 2006.

COOPER, J., Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. **Journal Cell Biology**, v. 105, p. 1473–1478, 1987.

- COOPERBERG, M. R. *et al.* Validation of a cell-cycle progression gene panel to improve risk stratification in a contemporary prostatectomy cohort. **Journal of Clinical Oncology**, v. 31, n. 11, p. 1428-1434, 2013.
- COOPERBERG, M. R.; BROERING, J. M.; CARROLL, P. R. Time trends and local variation in primary treatment of localized prostate cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, n. 7, p. 1117-1123, 2010.
- COUÉ, M. *et al.* Inhibition of actin polymerization by latrunculin A. **FEBS letters**, v. 213, n. 2, p. 316-318, 1987.
- COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 860, 2002.
- CRAGG, G. M.; GROTHAUS, P. G.; NEWMAN, D. J. Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. **Chemical reviews**, v. 109, n. 7, p. 3012-3043, 2009.
- CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Plants as a source of anti-cancer agents. **Journal of ethnopharmacology**, v. 100, n. 1, p. 72-79, 2005.
- CRISP, M. *et al.* Coupling of the nucleus and cytoplasm. **The Journal of cell biology**, v. 172, n. 1, p. 41-53, 2006.
- CROCE, C. M. Oncogenes and cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 358, n. 5, p. 502-511, 2008.
- CUADROS, R. *et al.* The marine compound spisulosine, an inhibitor of cell proliferation, promotes the disassembly of actin stress fibers. **Cancer letters**, v. 152, n. 1, p. 23-29, 2000.
- CUTTER, N. *et al.* **A role for the chromatin remodeling protein CHD3 in ovarian cancer therapy response.** Faculty Works: BCES, 1999-2023.
- D'AMICO, A. V. *et al.* Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer. **Jama**, v. 280, n. 11, p. 969-974, 1998.
- DALY, E. B. *et al.* Secretion of phosphoglycerate kinase from tumour cells is controlled by oxygen-sensing hydroxylases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1691, n. 1, p. 17-22, 2004.
- DAMMERMANN, A. *et al.* Centriole assembly requires both centriolar and pericentriolar material proteins. **Developmental cell**, v. 7, n. 6, p. 815-829, 2004.
- DANIEL, M.; PURKAYASTHA, R. P. **Handbook of phytoalexin metabolism and action.** New York: Marcel Dekker Inc., 1995.
- DARSHAN, M. S. *et al.* Taxane-induced blockade to nuclear accumulation of the androgen receptor predicts clinical responses in metastatic prostate cancer. **Cancer research**, v. 71, n. 18, p. 6019-6029, 2011.

DARZYNKIEWIC, Z.; HALICKA, H. D.; ZHAO, H. Analysis of Cellular DNA Content by Flow and Laser Scanning Cytometry. **Advanced Experimental Medicinal Biology**, v. 676, p.137-147, 2010.

DAVY, B. E.; ROBINSON, M. L. Congenital hydrocephalus in hy3 mice is caused by a frameshift mutation in Hydin, a large novel gene. **Human Molecular Genetics**, v. 12, n. 10, p. 1163-1170, 2003.

DE BONO, J. S. *et al.* Abiraterone and increased survival in metastatic prostate cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 364, n. 21, p. 1995-2005, 2011.

DE BONO, J. S. *et al.* Prednisone plus cabazitaxel or mitoxantrone for metastatic castration-resistant prostate cancer progressing after docetaxel treatment: a randomised open-label trial. **The Lancet**, v. 376, n. 9747, p. 1147-1154, 2010.

DE LUCA, M. *et al.* Aurora-A and ch-TOG act in a common pathway in control of spindle pole integrity. **Oncogene**, v. 27, n. 51, p. 6539-6549, 2008.

DECORTE, B. L. Underexplored Opportunities for Natural Products in Drug Discovery: Miniperspective. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, n. 20, p. 9295-9304, 2016.

DEEP, G. *et al.* Silymarin and silibinin cause G1 and G2–M cell cycle arrest via distinct circuitries in human prostate cancer PC3 cells: a comparison of flavanone silibinin with flavanolignan mixture silymarin. **Oncogene**, v. 25, n. 7, p. 1053-1069, 2006.

DENMEADE, S. R.; LIN, X. S.; ISAACS, J. T. Role of programmed (apoptotic) cell death during the progression and therapy for prostate cancer. **The Prostate**, v. 28, n. 4, p. 251-265, 1996.

DEVLIN, H.; MUDRYJ, M. Progression of prostate cancer: multiple pathways to androgen independence. **Cancer letters**, v. 274, n. 2, p. 177-186, 2009.

DI STEFANO, V. *et al.* Knockdown of cyclin-dependent kinase inhibitors induces cardiomyocyte re-entry in the cell cycle. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 10, p. 8644-8654, 2011.

DIAMANDIS, E. P. Prostate-specific antigen: its usefulness in clinical medicine. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 9, n. 8, p. 310-316, 1998.

DIAS, D. A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. A historical overview of natural products in drug discovery. **Metabolites**, v. 2, n. 2, p. 303-336, 2012.

DILLARD, P. R.; LIN, M.; KHAN, S. A. Androgen-independent prostate cancer cells acquire the complete steroidogenic potential of synthesizing testosterone from cholesterol. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 295, n. 1, p. 115-120, 2008.

DIMITRATOS, S. D. *et al.* Signaling pathways are focused at specialized regions of the plasma membrane by scaffolding proteins of the MAGUK family. **Bioessays**, v. 21, n. 11, p. 912-921, 1999.

- DOGGETT, N. A. *et al.* A 360-kb interchromosomal duplication of the human HYDIN locus. **Genomics**, v. 88, n. 6, p. 762-771, 2006.
- DONG, P. *et al.* Induction of paclitaxel resistance by ER α mediated prohibitin mitochondrial-nuclear shuttling. **PloS one**, v. 8, n. 12, p. e83519, 2013.
- DOWNING, K. H.; NOGALES, E. Tubulin and microtubule structure. **Current opinion in cell biology**, v. 10, n. 1, p. 16-22, 1998.
- DOXSEY, S. Re-evaluating centrosome function. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 2, n. 9, p. 688-698, 2001.
- DUAN, Z. *et al.* Overexpression of human phosphoglycerate kinase 1 (PGK1) induces a multidrug resistance phenotype. **Anticancer research**, v. 22, n. 4, p. 1933-1941, 2001.
- DULAK, J.; JÓZKOWICZ, A. Anti-angiogenic and anti-inflammatory effects of statins: relevance to anti-cancer therapy. **Current cancer drug targets**, v. 5, n. 8, p. 579-594, 2005.
- DURAND, X. *et al.* The value of urinary prostate cancer gene 3 (PCA3) scores in predicting pathological features at radical prostatectomy. **BJU international**, v. 110, n. 1, p. 43-49, 2012.
- EBNET, Klaus. Organization of multiprotein complexes at cell-cell junctions. **Histochemistry and cell biology**, v. 130, n. 1, p. 1-20, 2008.
- ECONOMOPOULOU, M. *et al.* Histone H2AX is integral to hypoxia-driven neovascularization. **Nature medicine**, v. 15, n. 5, p. 553-558, 2009.
- EFIMOV, A. *et al.* Asymmetric CLASP-dependent nucleation of noncentrosomal microtubules at the trans-Golgi network. **Developmental cell**, v. 12, n. 6, p. 917-930, 2007.
- EL-NASSAN, H. B. Advances in the discovery of kinesin spindle protein (Eg5) inhibitors as antitumor agents. **European journal of medicinal chemistry**, v. 62, p. 614-631, 2013.
- ELLIOTT, B. E. *et al.* The membrane cytoskeletal crosslinker ezrin is required for metastasis of breast carcinoma cells. **Breast cancer research**, v. 7, n. 3, p. R365, 2005.
- ELSON, E. L. Cellular mechanics as an indicator of cytoskeletal structure and function. **Annual review of biophysics and biophysical chemistry**, v. 17, n. 1, p. 397-430, 1988.
- ENGLER, T. A. *et al.* Synthetic pterocarpanes with anti-HIV activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 3, n. 6, p. 1229-1232, 1993.
- EPSTEIN, J. I. *et al.* The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) consensus conference on Gleason grading of prostatic carcinoma. **The American journal of surgical pathology**, v. 29, n. 9, p. 1228-1242, 2005.
- FALCÃO, M. J. C. *et al.* Cytotoxic flavonoids from *Platymiscium floribundum*. **Journal of natural products**, v. 68, n. 3, p. 423-426, 2005.

- FANAYAN, S.; HINCAPIE, M.; HANCOCK, W. S. Using lectins to harvest the plasma/serum glycoproteome. **Electrophoresis**, v. 33, n. 12, p. 1746-1754, 2012.
- FEDERICI, C. *et al.* Pleiotropic function of ezrin in human metastatic melanomas. **International journal of cancer**, v. 124, n. 12, p. 2804-2812, 2009.
- FEDI, P.; TRONICK, S. R.; AARONSON, S. A. Growth factors. In: HOLLAND JF; BAST RC; MORTON DL; FREI E, KUFEL DW; WEICHSELBAUM RR. **Cancer Medicine**. Baltimore, MD: Williams and Wilkins, 1997. p. 41-64.
- FEHON, R. G.; MCCLATCHEY, A. I.; BRETSCHER, A.. Organizing the cell cortex: the role of ERM proteins. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 11, n. 4, p. 276-287, 2010.
- FENG, W. *et al.* Cyclophilin A enhances cell proliferation and xenografted tumor growth of early gastric cancer. **Digestive diseases and sciences**, v. 60, n. 9, p. 2700-2711, 2015.
- FENG, X. D. *et al.* Structural maintenance of chromosomes 4 is a predictor of survival and a novel therapeutic target in colorectal cancer. **Asian Pac. J. Cancer Prev**, v. 15, p. 9459-9465, 2014.
- FERRAZ, R. **Citometria de Fluxo: Cell Sorting fundamentos e aplicações**. Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), 2000. Disponível em: <http://picf.ioc.fiocruz.br/Apostila%20de%20Citometria%20de%20Fluxo%20%20sorting.pdf>. Acesso em: 7 dez. 2016.
- FIELDING, A. B. *et al.* A critical role of integrin-linked kinase, ch-TOG and TACC3 in centrosome clustering in cancer cells. **Oncogene**, v. 30, n. 5, p. 521-534, 2011.
- FINN, R. S. *et al.* Dasatinib, an orally active small molecule inhibitor of both the src and abl kinases, selectively inhibits growth of basal-type/"triple-negative" breast cancer cell lines growing in vitro. **Breast cancer research and treatment**, v. 105, n. 3, p. 319-326, 2007.
- FIRAT-KARALAR, E. N.; STEARNS, T. The centriole duplication cycle. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 369, n. 1650, p. 20130460, 2014.
- FIZAZI, K. *et al.* Activity and safety of ODM-201 in patients with progressive metastatic castration-resistant prostate cancer (ARADES): an open-label phase 1 dose-escalation and randomised phase 2 dose expansion trial. **The lancet oncology**, v. 15, n. 9, p. 975-985, 2014.
- FIZAZI, K. *et al.* Denosumab versus zoledronic acid for treatment of bone metastases in men with castration-resistant prostate cancer: a randomised, double-blind study. **The Lancet**, v. 377, n. 9768, p. 813-822, 2011.
- FLITNEY, E. W. *et al.* Insights into the mechanical properties of epithelial cells: the effects of shear stress on the assembly and remodeling of keratin intermediate filaments. **The FASEB Journal**, v. 23, n. 7, p. 2110-2119, 2009.

- FLOR, P. J. *et al.* Molecular cloning, functional expression and pharmacological characterization of the human metabotropic glutamate receptor type 2. **European Journal of Neuroscience**, v. 7, n. 4, p. 622-629, 1995.
- FRANK, D.; DOENECKE, D.; ALBIG, W. Differential expression of human replacement and cell cycle dependent H3 histone genes. **Gene**, v. 312, p. 135-143, 2003.
- FREISS, G.; CHALBOS, D. PTPN13/PTPL1: an important regulator of tumor aggressiveness. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)**, v. 11, n. 1, p. 78-88, 2011.
- FRUMAN, D. A.; CANTLEY, L. C. Idelalisib—a PI3K δ inhibitor for B-cell cancers. **The New England journal of medicine**, v. 370, n. 11, p. 1061, 2014.
- FU, M. *et al.* Acetylation in hormone signaling and the cell cycle. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 13, n. 3, p. 259-276, 2002.
- FUDGE, D. *et al.* The intermediate filament network in cultured human keratinocytes is remarkably extensible and resilient. **PLoS One**, v. 3, n. 6, p. e2327, 2008.
- FUKASAWA, K. Oncogenes and tumour suppressors take on centrosomes. **Nature Reviews. Cancer**, v. 7, p. 911–924, 2007.
- FUKS, Z. *et al.* **Three-dimensional conformal treatment:** a new frontier in radiation therapy. United States: Important Advances in Oncology, 1991.
- FUKUDA, S. *et al.* Isolation of a novel gene showing reduced expression in metastatic colorectal carcinoma cell lines and carcinomas. **Cancer Science**, v. 88, n. 8, p. 725-731, 1997.
- FUNKE, L.; DAKOJI, S.; BREDT, D. S. Membrane-associated guanylate kinases regulate adhesion and plasticity at cell junctions. **Annual Review of Biochemistry**, v. 74, p. 219-245, 2005.
- GADDIPATI, J. P. *et al.* Frequent detection of codon 877 mutation in the androgen receptor gene in advanced prostate cancers. **Cancer Research**, v. 54, n. 11, p. 2861-2864, 1994.
- GALGOCZY, D. J.; TOCZYSKI, D. P. Checkpoint adaptation precedes spontaneous and damage-induced genomic instability in yeast. **Molecular and Cellular Biology**, v. 21, n. 5, p. 1710-1718, 2001.
- GANEM, N. J.; GODINHO, S. A.; PELLMAN, D. A mechanism linking extra centrosomes to chromosomal instability. **Nature**, v. 460, n. 7252, p. 278-282, 2009.
- GANEM, N. J.; STORCHOVA, Z.; PELLMAN, D. Tetraploidy, aneuploidy and cancer. **Current opinion in genetics & development**, v. 17, n. 2, p. 157-162, 2007.
- GANZ, P. A. *et al.* National Institutes of Health State-of-the-Science Conference: role of active surveillance in the management of men with localized prostate cancer. **Annals of internal medicine**, v. 156, n. 8, p. 591-595, 2012.

- GARNEAU, D. *et al.* Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F/H proteins modulate the alternative splicing of the apoptotic mediator Bcl-x. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 24, p. 22641-22650, 2005.
- GARRISON, J. B. *et al.* Novel quinazoline-based compounds impair prostate tumorigenesis by targeting tumor vascularity. **Cancer research**, v. 67, n. 23, p. 11344-11352, 2007.
- GARRISON, J. B.; KYPRIANOU, N. Doxazosin induces apoptosis of benign and malignant prostate cells via a death receptor-mediated pathway. **Cancer research**, v. 66, n. 1, p. 464-472, 2006.
- GEIGER, K. D. *et al.* Ezrin immunoreactivity is associated with increasing malignancy of astrocytic tumors but is absent in oligodendrogliomas. **The American journal of pathology**, v. 157, n. 6, p. 1785-1793, 2000.
- GENG, Y. *et al.* Regulation of cyclin E transcription by E2Fs and retinoblastoma protein. **Oncogene**, v. 12, n. 6, p. 1173-1180, 1996.
- GEORGESCU, M. M. *et al.* NHERF1/EBP50 controls morphogenesis of 3D colonic glands by stabilizing PTEN and ezrin-radixin-moesin proteins at the apical membrane. **Neoplasia**, v. 16, n. 4, p. 365-374. e2, 2014.
- GERKE, V.; CREUTZ, C. E.; MOSS, S. E. Annexins: linking Ca²⁺ signalling to membrane dynamics. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 6, n. 6, p. 449-461, 2005.
- GIAEVER, I.; KEESE, C. R. A morphological biosensor for mammalian cells. **Nature**, v. 366, n. 6455, p. 591, 1993.
- GIEHL, M. *et al.* Centrosome aberrations in chronic myeloid leukemia correlate with stage of disease and chromosomal instability. **Leukemia**, v. 19, n. 7, p. 1192-1197, 2005.
- GLADDEN, A. B.; DIEHL, J. A. Cell cycle progression without cyclin E/CDK2: breaking down the walls of dogma. **Cancer cell**, v. 4, n. 3, p. 160-162, 2003.
- GLEASON, D. F. Classification of prostatic carcinomas. **Cancer chemotherapy reports**, v. 50, n. 3, p. 125-128, 1966.
- GLONDU-LASSIS, M. *et al.* PTPL1/PTPN13 regulates breast cancer cell aggressiveness through direct inactivation of Src kinase. **Cancer research**, v. 70, n. 12, p. 5116-5126, 2010.
- GODINHO, S. A.; KWON, M.; PELLMAN, D. Centrosomes and cancer: how cancer cells divide with too many centrosomes. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 28, n. 1-2, p. 85-98, 2009.
- GONZALEZ, P.; WESTHORPE, F. G.; TAYLOR, S. S. The spindle assembly checkpoint. **Current biology**, v. 22, n. 22, p. R966-R980, 2012.
- GOODIN, S.; KANE, M. P.; RUBIN, E. H. Epothilones: mechanism of action and biologic activity. **Journal of clinical oncology**, v. 22, n. 10, p. 2015-2025, 2004.

- GORELIK, L.; FLAVELL, R. A. Immune-mediated eradication of tumors through the blockade of transforming growth factor-[beta] signaling in T cells. **Nature medicine**, v. 7, n. 10, p. 1118, 2001.
- GORLOV, I. P. *et al.* Candidate pathways and genes for prostate cancer: a meta-analysis of gene expression data. **BMC medical genomics**, v. 2, n. 1, p. 48, 2009.
- GOVEK, E. E.; HATTEN, M. E.; VAN AELST, L. The role of Rho GTPase proteins in CNS neuronal migration. **Developmental neurobiology**, v. 71, n. 6, p. 528-553, 2011.
- GRASSO, C. S. *et al.* The mutational landscape of lethal castration-resistant prostate cancer. **Nature**, v. 487, n. 7406, p. 239-243, 2012.
- GREIDER, C. W. Telomerase activity, cell proliferation, and cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 1, p. 90-92, 1998.
- GRÖNBERG, H. Prostate cancer epidemiology. **The Lancet**, v. 361, n. 9360, p. 859-864, 2003.
- GUÉRITTE, F.; FAHY, J. The vinca alkaloids. **Anticancer agents from natural products**, v. 10, p. 123-135, 2005.
- GUO, S.; ZOU, J.; WANG, G. Advances in the proteomic discovery of novel therapeutic targets in cancer. **Drug design, development and therapy**, v. 7, p. 1259, 2013.
- GUSTAFSON, A. M. *et al.* Airway PI3K pathway activation is an early and reversible event in lung cancer development. **Science translational medicine**, v. 2, n. 26, p. 26ra25-26ra25, 2010.
- HAGEMAN, J. *et al.* The diverse members of the mammalian HSP70 machine show distinct chaperone-like activities. **Biochemical Journal**, v. 435, n. 1, p. 127-142, 2011.
- HALL, A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. **Science**, v. 279, n. 5350, p. 509-514, 1998.
- HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.
- HANAHAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. The hallmarks of cancer. **cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000.
- HARINANTENAINA, L. *et al.* Antiproliferative Compounds from *Pongamiopsis pervilleana* from the Madagascar Dry Forest (1). **Journal of natural products**, v. 73, n. 9, p. 1559-1562, 2010.
- HARRIS, A. Location of cellular adhesions to solid substrata. **Developmental biology**, v. 35, n. 1, p. 97-114, 1973.
- HARRIS, B. Z.; LIM, W. A. Mechanism and role of PDZ domains in signaling complex assembly. **Journal of cell science**, v. 114, n. 18, p. 3219-3231, 2001.

HARSHA, H. C.; PANDEY, A. Phosphoproteomics in cancer. **Molecular oncology**, v. 4, n. 6, p. 482-495, 2010.

HARTWELL, L. H. *et al.* Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. **Science**, v. 246, n. 4930, p. 629-634, 1989.

HARTWIG, J. H. *et al.* Thrombin receptor ligation and activated Rac uncap actin filament barbed ends through phosphoinositide synthesis in permeabilized human platelets. **Cell**, v. 82, n. 4, p. 643-653, 1995.

HARVEY, A. L.; GERICKE, N. **Biodiversity** Ch. 15 [S.l.]: Pavlinov, 2011.

HATAKEYAMA, S. TRIM proteins and cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, n. 11, p. 792-804, 2011.

HAWKSWORTH, G. M. Advantages and disadvantages of using human cells for pharmacological and toxicological studies. **Human & experimental toxicology**, v. 13, n. 8, p. 568-573, 1994.

HAYOT, C. *et al.* Characterization of the activities of actin-affecting drugs on tumor cell migration. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 211, n. 1, p. 30-40, 2006.

HELFAND, B. T.; CHANG, L.; GOLDMAN, R. D. Intermediate filaments are dynamic and motile elements of cellular architecture. **Journal of cell science**, v. 117, n. 2, p. 133-141, 2004.

HENDZEL, M. J. *et al.* Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. **Chromosoma**, v. 106, n. 6, p. 348-360, 1997.

HENNESSY, B. T. *et al.* Characterization of a naturally occurring breast cancer subset enriched in epithelial-to-mesenchymal transition and stem cell characteristics. **Cancer research**, v. 69, n. 10, p. 4116-4124, 2009.

HENSLEY, P. J. *et al.* Novel pharmacologic targeting of tight junctions and focal adhesions in prostate cancer cells. **PloS one**, v. 9, n. 1, p. e86238, 2014.

HEUSER, J. E.; KIRSCHNER, M. Filament organization revealed in platinum replicas of freeze-dried cytoskeletons. **The Journal of Cell Biology**, v. 86, n. 1, p. 212-234, 1980.

HIROTA, T. *et al.* Distinct functions of condensin I and II in mitotic chromosome assembly. **Journal of cell science**, v. 117, n. 26, p. 6435-6445, 2004.

HO, J. *et al.* Downregulation of the gli transcription factors regulator kif7 facilitates cell survival and migration of choriocarcinoma cells. **PloS one**, v. 9, n. 9, p. e108248, 2014.

HOFMANN, C. *et al.* PI3K-dependent multiple myeloma cell survival is mediated by the PIK3CA isoform. **British journal of haematology**, v. 166, n. 4, p. 529-539, 2014.

- HOLEN, K. *et al.* A phase I trial of MK-0731, a kinesin spindle protein (KSP) inhibitor, in patients with solid tumors. **Investigational new drugs**, v. 30, n. 3, p. 1088-1095, 2012.
- HOLLEBECQUE, A. *et al.* A phase I, dose-escalation study of the Eg5-inhibitor EMD 534085 in patients with advanced solid tumors or lymphoma. **Investigational new drugs**, v. 31, n. 6, p. 1530, 2013.
- HOLNTHONER, W. *et al.* Fibroblast growth factor-2 induces Lef/Tcf-dependent transcription in human endothelial cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 48, p. 45847-45853, 2002.
- HOLY, T. E.; LEIBLER, S. Dynamic instability of microtubules as an efficient way to search in space. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 12, p. 5682-5685, 1994.
- HONORÉ, B. The hnRNP 2H9 gene, which is involved in the splicing reaction, is a multiply spliced gene. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression**, v. 1492, n. 1, p. 108-119, 2000.
- HOQUE, A.; CHEN, H.; XU, X. Statin induces apoptosis and cell growth arrest in prostate cancer cells. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, v. 17, n. 1, p. 88-94, 2008.
- HÖRNBERG, E. *et al.* Expression of androgen receptor splice variants in prostate cancer bone metastases is associated with castration-resistance and short survival. **PloS one**, v. 6, n. 4, p. e19059, 2011.
- HOTTA, K. *et al.* Interaction of the Rho family small G proteins with kinectin, an anchoring protein of kinesin motor. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 225, n. 1, p. 69-74, 1996.
- HOTULAINEN, P. *et al.* Actin-depolymerizing factor and cofilin-1 play overlapping roles in promoting rapid F-actin depolymerization in mammalian nonmuscle cells. **Molecular biology of the cell**, v. 16, n. 2, p. 649-664, 2005.
- HSU, Y. C. *et al.* Genome-wide analysis of three-way interplay among gene expression, cancer cell invasion and anti-cancer compound sensitivity. **BMC medicine**, v. 11, n. 1, p. 106, 2013.
- HU, P. *et al.* Cloning of a novel, ubiquitously expressed human phosphatidylinositol 3-kinase and identification of its binding site on p85. **Molecular and Cellular Biology**, v. 13, n. 12, p. 7677-7688, 1993.
- HUANG, B. *et al.* Toll-like receptors on tumor cells facilitate evasion of immune surveillance. **Cancer research**, v. 65, n. 12, p. 5009-5014, 2005.
- HUGGINS, C; HODGES, C. V. Studies on prostatic cancer: I. The effect of castration, of estrogen and of androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 22, n. 4, p. 232-240, 1972.

HUGHES, S. C.; FEHON, R. G. Understanding ERM proteins—the awesome power of genetics finally brought to bear. **Current opinion in cell biology**, v. 19, n. 1, p. 51-56, 2007.

ICHIKAWA, H. *et al.* Anticancer drugs designed by mother nature: ancient drugs but modern targets. **Current pharmaceutical design**, v. 13, n. 33, p. 3400-3416, 2007.

IGNEY, F. H.; KRAMMER, P. H. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. **Nature reviews. Cancer**, v. 2, n. 4, p. 277, 2002.

INGHAM, Philip W.; MCMAHON, Andrew P. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. **Genes & development**, v. 15, n. 23, p. 3059-3087, 2001.

INOUE, S.; SALMON, E. D. Force generation by microtubule assembly/disassembly in mitosis and related movements. **Molecular biology of the cell**, v. 6, n. 12, p. 1619-1640, 1995.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Estimativa 2016/2017**: Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/wcm/dncc/2015/dados-apresentados.pdf> . Acesso em: 3 dez. 2015.

IRANSHAHI, M. *et al.* Cytotoxic evaluation of alkaloids and isoflavonoids from the Australian tree *Erythrina vespertilio*. **Planta medica**, v. 78, n. 07, p. 730-736, 2012.

ISERMANN, P.; LAMMERDING, J. Nuclear mechanics and mechanotransduction in health and disease. **Current Biology**, v. 23, n. 24, p. R1113-R1121, 2013.

JACKSON, J. R. *et al.* Targeted anti-mitotic therapies: can we improve on tubulin agents?. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 2, p. 107-117, 2007.

JACKSON, S. M.; ERICSSON, J.; EDWARDS, P. A. Signaling molecules derived from the cholesterol biosynthetic pathway. In: **Cholesterol**. [S.l.]: Springer US, 1997. p. 1-21.

JAENSCH, S. *et al.* Automated tracking and analysis of centrosomes in early *Caenorhabditis elegans* embryos. **Bioinformatics**, v. 26, n. 12, p. i13-i20, 2010.

JÉZÉQUEL, P. *et al.* A 38-gene expression signature to predict metastasis risk in node-positive breast cancer after systemic adjuvant chemotherapy: a genomic substudy of PACS01 clinical trial. **Breast cancer research and treatment**, v. 116, n. 3, p. 509-520, 2009.

JIMÉNEZ-GONZÁLEZ, L. *et al.* Pterocarpanes: interesting natural products with antifungal activity and other biological properties. **Phytochemistry Reviews**, v. 7, n. 1, p. 125-154, 2008.

JIRAWATNOTAI, S. *et al.* A function for cyclin D1 in DNA repair uncovered by interactome analyses in human cancers. **Nature**, v. 474, n. 7350, p. 230, 2011.

JONSSON, P. F.; BATES, P. A. Global topological features of cancer proteins in the human interactome. **Bioinformatics**, v. 22, n. 18, p. 2291-2297, 2006.

- JORDAN, M. A.; WILSON, L. Microtubules as a target for anticancer drugs. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 4, p. 253-265, 2004.
- JUAN, G. *et al.* Histone H 3 phosphorylation and expression of cyclins A and B 1 measured in individual cells during their progression through G 2 and mitosis. **Cytometry**, v. 32, n. 2, p. 71-77, 1998.
- JULIEN, R. M. **A primer of drug action: A concise nontechnical guide to the actions, uses, and side effects of psychoactive drugs, revised and updated.** [S.l.]: Holt Paperbacks, 2013.
- JULIEN, S. G. *et al.* Inside the human cancer tyrosine phosphatome. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, n. 1, p. 35-49, 2011.
- JUNG, Y. *et al.* Expression of PGK1 by prostate cancer cells induces bone formation. **Molecular Cancer Research**, v. 7, n. 10, p. 1595-1604, 2009.
- KAKEYA, H. *et al.* Epoxyquinol A, a highly functionalized pentaketide dimer with antiangiogenic activity isolated from fungal metabolites. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, n. 14, p. 3496-3497, 2002.
- KALININA, J. *et al.* Proteomics of gliomas: initial biomarker discovery and evolution of technology. **Neuro-oncology**, v. 13, n. 9, p. 926-942, 2011.
- KANTOFF, P. W. *et al.* Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 363, n. 5, p. 411-422, 2010.
- KAPOOR, T. M. *et al.* Probing spindle assembly mechanisms with monastrol, a small molecule inhibitor of the mitotic kinesin, Eg5. **The Journal of cell biology**, v. 150, n. 5, p. 975-988, 2000.
- KARAKOZOVA, M. *et al.* Arginylation of β -actin regulates actin cytoskeleton and cell motility. **Science**, v. 313, n. 5784, p. 192-196, 2006.
- KASHINA, A. S. Differential arginylation of actin isoforms: the mystery of the actin N-terminus. **Trends in cell biology**, v. 16, n. 12, p. 610-615, 2006.
- KASTAN, M. B.; BARTEK, J. Cell-cycle checkpoints and cancer. **Nature**, v. 432, n. 7015, p. 316-323, 2004.
- KATOH, Y.; KATOH, M. KIF27 is one of orthologs for Drosophila Costal-2. **International journal of oncology**, v. 25, n. 6, p. 1875-1880, 2004.
- KAUR, R.; KAPOOR, K.; KAUR, H. Plants as a source of anticancer agents. **J Nat Prod Plant Resour**, v. 1, n. 1, p. 119-124, 2011.
- KAWADA, M. *et al.* New atpenins, NBRI23477 A and B, inhibit the growth of human prostate cancer cells. **The Journal of antibiotics**, v. 62, n. 5, p. 243-246, 2009.
- KAWAMURA, E. *et al.* Identification of novel small molecule inhibitors of centrosome clustering in cancer cells. **Oncotarget**, v. 4, n. 10, p. 1763, 2013.

- KAZAMI, S. *et al.* Iejimalides show anti-osteoclast activity via V-ATPase inhibition. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 70, n. 6, p. 1364-1370, 2006.
- KEEN, N.; TAYLOR, S. Aurora-kinase inhibitors as anticancer agents. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 12, p. 927-936, 2004.
- KHOEI, S. *et al.* The role of heat shock protein 70 in the thermoresistance of prostate cancer cell line spheroids. **FEBS letters**, v. 561, n. 1-3, p. 144-148, 2004.
- KIMURA, K.; HIRANO, T. ATP-dependent positive supercoiling of DNA by 13S condensin: a biochemical implication for chromosome condensation. **Cell**, v. 90, n. 4, p. 625-634, 1997.
- KING, S. M. The dynein microtubule motor. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1496, n. 1, p. 60-75, 2000.
- KING, T. A. *et al.* Long-term results of wide-field brachytherapy as the sole method of radiation therapy after segmental mastectomy for T is, 1, 2 breast cancer. **The American journal of surgery**, v. 180, n. 4, p. 299-304, 2000.
- KINGHORN, A. D.; CHIN, Y. W.; SWANSON, S. M. Discovery of natural product anticancer agents from biodiverse organisms. **Current opinion in drug discovery & development**, v. 12, n. 2, p. 189, 2009.
- KINGSTON, D. **Taxol and its analogs**. Boca Raton, FL: CRC Press, 2005.
- KLEIN, E. *et al.* New chemical tools for investigating human mitotic kinesin Eg5. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 15, n. 19, p. 6474-6488, 2007.
- KLEYLEIN-SOHN, J. *et al.* Acentrosomal spindle organization renders cancer cells dependent on the kinesin HSET. **Journal of cell science**, v. 125, n. 22, p. 5391-5402, 2012.
- KNOCKLEBY, J.; LEE, H. Same partners, different dance: involvement of DNA replication proteins in centrosome regulation. **Cell cycle**, v. 9, n. 22, p. 4487-4491, 2010.
- KOBAYASHI, H. *et al.* Clinical significance of cellular distribution of moesin in patients with oral squamous cell carcinoma. **Clinical cancer research**, v. 10, n. 2, p. 572-580, 2004.
- KÖBEL, M. *et al.* Ezrin expression is related to poor prognosis in FIGO stage I endometrioid carcinomas. **Modern pathology**, v. 19, n. 4, p. 581-587, 2006.
- KOFF, A. *et al.* Human cyclin E, a new cyclin that interacts with two members of the CDC2 gene family. **Cell**, v. 66, n. 6, p. 1217-1228, 1991.
- KOFF, A. *et al.* Formation and activation of a cyclin E-cdk2 complex during the G1 phase of the human cell cycle. **Science**, v. 257, n. 5077, p. 1689-1695, 1992.
- KOH, J. *et al.* Tumour-derived p16 alleles encoding proteins defective in cell-cycle inhibition. **Nature**, v. 375, n. 6531, p. 506-510, 1995.

- KOOMEN, J. M.; SMALLEY, K. S. M. Using quantitative proteomic analysis to understand genotype specific intrinsic drug resistance in melanoma. **Oncotarget**, v. 2, n. 4, p. 329, 2011.
- KRATZ, F. *et al.* Prodrug strategies in anticancer chemotherapy. **ChemMedChem**, v. 3, n. 1, p. 20-53, 2008.
- KREUNIN, P. *et al.* Proteomic profiling identifies breast tumor metastasis-associated factors in an isogenic model. **Proteomics**, v. 7, n. 2, p. 299-312, 2007.
- KUBARA, P. M. *et al.* Human cells enter mitosis with damaged DNA after treatment with pharmacological concentrations of genotoxic agents. **Biochemical Journal**, v. 446, n. 3, p. 373-381, 2012.
- KUETE, V. *et al.* Cytotoxic flavonoids and isoflavonoids from *Erythrina sigmoidea* towards multi-factorial drug resistant cancer cells. **Investigational new drugs**, v. 32, n. 6, p. 1053-1062, 2014.
- KUNDA, P. *et al.* Moesin controls cortical rigidity, cell rounding, and spindle morphogenesis during mitosis. **Current Biology**, v. 18, n. 2, p. 91-101, 2008.
- KURIBAYASHI, K. *et al.* Murine NK cell cultures: effects of interleukin-2 and interferon on cell growth and cytotoxic reactivity. **The Journal of Immunology**, v. 126, n. 6, p. 2321-2327, 1981.
- KUSAMA, T. *et al.* 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme a reductase inhibitors reduce human pancreatic cancer cell invasion and metastasis. **Gastroenterology**, v. 122, n. 2, p. 308-317, 2002.
- KUSTERMANS, G.; PIETTE, J.; LEGRAND-POELS, S. Actin-targeting natural compounds as tools to study the role of actin cytoskeleton in signal transduction. **Biochemical pharmacology**, v. 76, n. 11, p. 1310-1322, 2008.
- KWON, M. *et al.* Mechanisms to suppress multipolar divisions in cancer cells with extra centrosomes. **Genes & development**, v. 22, n. 16, p. 2189-2203, 2008.
- LABAER, J. *et al.* New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. **Genes & development**, v. 11, n. 7, p. 847-862, 1997.
- LACEY, K. R.; JACKSON, P. K.; STEARNS, T. Cyclin-dependent kinase control of centrosome duplication. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 6, p. 2817-2822, 1999.
- LAM, S. W.; JIMENEZ, C. R.; BOVEN, E. Breast cancer classification by proteomic technologies: current state of knowledge. **Cancer treatment reviews**, v. 40, n. 1, p. 129-138, 2014.
- LANCASTER, O. M. *et al.* Mitotic rounding alters cell geometry to ensure efficient bipolar spindle formation. **Developmental cell**, v. 25, n. 3, p. 270-283, 2013.

- LANSBERGEN, G. *et al.* CLASPs attach microtubule plus ends to the cell cortex through a complex with LL5 β . **Developmental cell**, v. 11, n. 1, p. 21-32, 2006.
- LAPENNA, S.; GIORDANO, A. Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer. **Nature reviews Drug discovery**, v. 8, n. 7, p. 547-566, 2009.
- LARSON, S. R. *et al.* Characterization of osteoblastic and osteolytic proteins in prostate cancer bone metastases. **The Prostate**, v. 73, n. 9, p. 932-940, 2013.
- LATULIPPE, E. *et al.* Comprehensive gene expression analysis of prostate cancer reveals distinct transcriptional programs associated with metastatic disease. **Cancer research**, v. 62, n. 15, p. 4499-4506, 2002.
- LAVORATO, H. L. Agonista versus antagonista do GnRH em ciclos de reprodução assistida: DNA fragmentação e apoptose das células da granulosa. 2012.
- LAVROV, A. V. *et al.* Frequent variations in cancer-related genes may play prognostic role in treatment of patients with chronic myeloid leukemia. **BMC genetics**, v. 17, n. 1, p. S14, 2016.
- LAWO, S. *et al.* HAUS, the 8-subunit human Augmin complex, regulates centrosome and spindle integrity. **Current Biology**, v. 19, n. 10, p. 816-826, 2009.
- LEE, C. W. *et al.* A phase II study of ispinesib (SB-715992) in patients with metastatic or recurrent malignant melanoma: a National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group trial. **Investigational new drugs**, v. 26, n. 3, p. 249-255, 2008.
- LEE, E. K.; CHO, H.; KIM, C. W. Proteomic analysis of cancer stem cells in human prostate cancer cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 412, n. 2, p. 279-285, 2011.
- LEE, J. Novel combinational treatment of cisplatin with cyclophilin A inhibitors in human hepatocellular carcinomas. **Archives of pharmacal research**, v. 33, n. 9, p. 1401-1409, 2010.
- LEE, K. H.; XIAO, Z. Podophyllotoxins and analogs. **Anticancer agents from natural products**, p. 71-88, 2005.
- LEIPHRAKPAM, P. D. *et al.* Ezrin expression and cell survival regulation in colorectal cancer. **Cellular signalling**, v. 26, n. 5, p. 868-879, 2014.
- LENG, C. *et al.* An integrin beta4-EGFR unit promotes hepatocellular carcinoma lung metastases by enhancing anchorage independence through activation of FAK-AKT pathway. **Cancer letters**, v. 376, n. 1, p. 188-196, 2016.
- LEVIN, Y. *et al.* Multidimensional protein fractionation of blood proteins coupled to data-independent nanoLC-MS/MS analysis. **Journal of proteomics**, v. 73, n. 3, p. 689-695, 2010.
- LEVINE, D. S. *et al.* Formation of the tetraploid intermediate is associated with the development of cells with more than four centrioles in the elastase-simian virus 40 tumor antigen transgenic mouse model of pancreatic cancer. **Proceedings of the National Academy**

of **Sciences**, v. 88, n. 15, p. 6427-6431, 1991.

LI, F. *et al.* Cytotoxic constituents from Brazilian red propolis and their structure–activity relationship. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 16, n. 10, p. 5434-5440, 2008.

LI, G. Z. *et al.* Database searching and accounting of multiplexed precursor and product ion spectra from the data independent analysis of simple and complex peptide mixtures. **Proteomics**, v. 9, n. 6, p. 1696-1719, 2009.

LI, J. *et al.* Prognostic value of ezrin in various cancers: a systematic review and updated meta-analysis. **Nature Publishing Group. Scientific Reports**, v. 5, p. 17903, 2015.

LI, M. *et al.* Cyclophilin A is overexpressed in human pancreatic cancer cells and stimulates cell proliferation through CD147. **Cancer**, v. 106, n. 10, p. 2284-2294, 2006.

LI, M. *et al.* Upregulation of phosphorylated cofilin 1 correlates with taxol resistance in human ovarian cancer in vitro and in vivo. **Oncology reports**, v. 29, n. 1, p. 58-66, 2013.

LI, R. *et al.* Computational identification of surrogate genes for prostate cancer phases using machine learning and molecular network analysis. **Theoretical Biology and Medical Modelling**, v. 11, n. 1, p. 37, 2014.

LI, X. N. *et al.* Tonkinensines A and B, two novel alkaloids from *Sophora tonkinensis*. **Tetrahedron Letters**, v. 49, n. 23, p. 3797-3801, 2008.

LI, Y. *et al.* Expression and prognostic relevance of Cyclophilin A and matrix metalloproteinase 9 in esophageal squamous cell carcinoma. **Diagnostic pathology**, v. 8, n. 1, p. 207, 2013.

LIANG, L. *et al.* The Phytoestrogenic Compound Cajanol from Pigeonpea Roots is Associated with the Activation of Estrogen Receptor α -dependent Signaling Pathway in Human Prostate Cancer Cells. **Phytotherapy Research**, v. 27, n. 12, p. 1834-1841, 2013.

LIANG, S. *et al.* Quantitative proteomics for cancer biomarker discovery. **Combinatorial chemistry & high throughput screening**, v. 15, n. 3, p. 221-231, 2012.

LIAO, X. *et al.* Aberrant activation of hedgehog signaling pathway contributes to endometrial carcinogenesis through β -catenin. **Modern Pathology**, v. 22, n. 6, p. 839-847, 2009A.

LIAO, X. *et al.* Aberrant activation of hedgehog signaling pathway in ovarian cancers: effect on prognosis, cell invasion and differentiation. **Carcinogenesis**, v. 30, n. 1, p. 131-140, 2009B.

LINGLE, W. L. *et al.* Centrosome hypertrophy in human breast tumors: implications for genomic stability and cell polarity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 6, p. 2950-2955, 1998.

LIU, A. K. F.; WILLISON, K. R. Elucidation of the subunit orientation in CCT (chaperonin containing TCP1) from the subunit composition of CCT micro-complexes. **The EMBO journal**, v. 16, n. 14, p. 4311-4316, 1997.

LIU, J. *et al.* DLG5 in cell polarity maintenance and cancer development. **International journal of biological sciences**, v. 10, p. 543-549, 2014.

LIU, J. *et al.* Nuclear annexin II negatively regulates growth of LNCaP cells and substitution of ser 11 and 25 to glu prevents nucleo-cytoplasmic shuttling of annexin II. **BMC biochemistry**, v. 4, n. 1, p. 10, 2003.

LIU, P. *et al.* Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. **Nature reviews Drug discovery**, v. 8, n. 8, p. 627-644, 2009.

LONCAREK, J. *et al.* Control of daughter centriole formation by the pericentriolar material. **Nature cell biology**, v. 10, n. 3, p. 322-328, 2008.

LOPICCOLO, J. *et al.* Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway: effective combinations and clinical considerations. **Drug Resistance Updates**, v. 11, n. 1, p. 32-50, 2008.

LU-YAO, G. L.; YAO, S. L. Population-based study of long-term survival in patients with clinically localised prostate cancer. **The Lancet**, v. 349, n. 9056, p. 906-910, 1997.

LU, L. I. *et al.* Overexpression of cofilin 1 in prostate cancer and the corresponding clinical implications. **Oncology letters**, v. 9, n. 6, p. 2757-2761, 2015.

LUDWIG, A.; DIETEL, M.; LAGE, H. Identification of differentially expressed genes in classical and atypical multidrug-resistant gastric carcinoma cells. **Anticancer research**, v. 22, n. 6A, p. 3213-3221, 2001.

LUO, J. *et al.* Deacetylation of p53 modulates its effect on cell growth and apoptosis. **Nature**, v. 408, n. 6810, p. 377-381, 2000.

LUTZ, Y.; JACOB, M.; FUCHS, J. P. The distribution of two hnRNP-associated proteins defined by a monoclonal antibody is altered in heat-shocked HeLa cells. **Experimental cell research**, v. 175, n. 1, p. 109-124, 1988.

MA, W. *et al.* Tumour suppressive function of HUWE1 in thyroid cancer. **Journal of biosciences**, v. 41, n. 3, p. 395-405, 2016.

MACKAY, D. J. G. *et al.* Rho-and rac-dependent assembly of focal adhesion complexes and actin filaments in permeabilized fibroblasts: an essential role for ezrin/radixin/moesin proteins. **The Journal of cell biology**, v. 138, n. 4, p. 927-938, 1997.

MADDEN, S. F. *et al.* OvMark: a user-friendly system for the identification of prognostic biomarkers in publically available ovarian cancer gene expression datasets. **Molecular cancer**, v. 13, n. 1, p. 241, 2014.

MAHAJAN, P. *et al.* Antioxidant and antiproliferative activity of indigocarpan, a pterocarpan from *Indigofera aspalathoides*. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 68, n. 10, p. 1331-1339, 2016.

- MAHÉ, d. *et al.* cloning of human 2h9 heterogeneous nuclear ribonucleoproteins relation with splicing and early heat shock-induced splicing arrest. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 3, p. 1827-1836, 1997.
- MANN, D. *et al.* Trends in statin use and low-density lipoprotein cholesterol levels among US adults: impact of the 2001 National Cholesterol Education Program guidelines. **Annals of Pharmacotherapy**, v. 42, n. 9, p. 1208-1215, 2008.
- MANSON-BAHR, D. *et al.* Mutation detection in formalin-fixed prostate cancer biopsies taken at the time of diagnosis using next-generation DNA sequencing. **Journal of clinical pathology**, p. jclinpath-2014-202754, 2015.
- MARCELLI, M. *et al.* Androgen receptor mutations in prostate cancer. **Cancer research**, v. 60, n. 4, p. 944-949, 2000.
- MARCUS, A. I. *et al.* Mitotic kinesin inhibitors induce mitotic arrest and cell death in Taxol-resistant and-sensitive cancer cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 12, p. 11569-11577, 2005.
- MARKKANEN, E. *et al.* Regulation of oxidative DNA damage repair by DNA polymerase λ and MutYH by cross-talk of phosphorylation and ubiquitination. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 2, p. 437-442, 2012.
- MARQUES, R. B. *et al.* High efficacy of combination therapy using PI3K/AKT inhibitors with androgen deprivation in prostate cancer preclinical models. **European urology**, v. 67, n. 6, p. 1177-1185, 2015.
- MARTINO, T. *et al.* The pterocarpanquinone LQB-118 inhibits tumor cell proliferation by downregulation of c-Myc and cyclins D1 and B1 mRNA and upregulation of p21 cell cycle inhibitor expression. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 22, n. 12, p. 3115-3122, 2014.
- MASCHLER, S. *et al.* Annexin A1 attenuates EMT and metastatic potential in breast cancer. **EMBO molecular medicine**, v. 2, n. 10, p. 401-414, 2010.
- MASUGI, Y. *et al.* Upregulation of integrin β 4 promotes epithelial–mesenchymal transition and is a novel prognostic marker in pancreatic ductal adenocarcinoma. **Laboratory Investigation**, v. 95, n. 3, p. 308-319, 2015.
- MONTAGNOLI, A. *et al.* Ubiquitination of p27 is regulated by Cdk-dependent phosphorylation and trimeric complex formation. **Genes & Development**, v. 13, n. 9, p. 1181-1189, 1999.
- MATSUI, T. *et al.* Rho-kinase phosphorylates COOH-terminal threonines of ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins and regulates their head-to-tail association. **The Journal of cell biology**, v. 140, n. 3, p. 647-657, 1998.
- MAURICH, T. *et al.* Erybraedin C and bitucarpin A, two structurally related pterocarpan purified from *Bituminaria bituminosa*, induced apoptosis in human colon adenocarcinoma cell lines MMR-and p53-proficient and-deficient in a dose-, time-, and structure-dependent fashion. **Chemico-biological interactions**, v. 159, n. 2, p. 104-116, 2006.

MAYER, T. U. *et al.* Small molecule inhibitor of mitotic spindle bipolarity identified in a phenotype-based screen. **Science**, v. 286, n. 5441, p. 971-974, 1999.

MAZZORANA, M.; MONTOYA, G.; B MORTUZA, G. The centrosome: a target for cancer therapy. **Current cancer drug targets**, v. 11, n. 5, p. 600-612, 2011.

MCGUIRE, W. P. *et al.* Taxol: a unique antineoplastic agent with significant activity in advanced ovarian epithelial neoplasms. **Annals of internal medicine**, v. 111, n. 4, p. 273-279, 1989.

MCPHAUL, M. J. Mechanisms of prostate cancer progression to androgen independence. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 22, n. 2, p. 373-388, 2008.

MEDLEY, Q. G. *et al.* The trio guanine nucleotide exchange factor is a RhoA target Binding of RhoA to the trio immunoglobulin-like domain. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 46, p. 36116-36123, 2000.

MEIJER, L. *et al.* specific histone H1 kinase. **The EMBO Journal**, v. 8, n. 8, 1989.

MEIRA, A. S. **Estudo do potencial efeito inibitório do composto sintético CPO001 sobre a quinesina Eg5: análises in vitro com validação de cálculos em bioquímica quântica.** 19/02/2016. 106. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Faculdade de Medicina, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Programa de Pós- Graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.

MELLADO, B. *et al.* Molecular biology of androgen-independent prostate cancer: the role of the androgen receptor pathway. **Clinical and Translational Oncology**, v. 11, n. 1, p. 5-10, 2009.

MENON, T.; YATES, J. A.; BOCHAR, D. A. Regulation of androgen-responsive transcription by the chromatin remodeling factor CHD8. **Molecular endocrinology**, v. 24, n. 6, p. 1165-1174, 2010.

MERALDI, P.; HONDA, R.; NIGG, E. A. Aurora-A overexpression reveals tetraploidization as a major route to centrosome amplification in p53^{-/-} cells. **The EMBO journal**, v. 21, n. 4, p. 483-492, 2002.

MES-MASSON, A. M.; PATRICIA, N. Identification of novel variant, 1484delG in the 3'UTR of H3F3B, a member of the histone 3B replacement family, in ovarian tumors. **International journal of oncology**, v. 26, p. 1621-1627, 2005.

METZ, H. L. **Microscópio Confocal.** Campina: UNICAMP, 2004. Disponível em:http://www.ifi.unicamp.br/~lunazzi/F530_F590_F690_F809_F895/F530_F590_F690_F895/F530_F590_F690_F895_sem2_2004/003069Hugo_M_Franchini_F530_RF.pdf. Acessado em 7 dez. 2016.

MI, H. *et al.* PANTHER version 11: expanded annotation data from Gene Ontology and Reactome pathways, and data analysis tool enhancements. **Nucleic Acids Research**, p. gkw1138, 2016.

MIGITA, T. *et al.* The accumulation of angiostatin-like fragments in human prostate carcinoma. **Clinical cancer research**, v. 7, n. 9, p. 2750-2756, 2001.

MILITAO, G. C. G. *et al.* Bioassay-guided fractionation of pterocarpan from roots of *Harpalyce brasiliensis* Benth. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 15, n. 21, p. 6687-6691, 2007b.

MILITAO, G. C. G. *et al.* Comparative cytotoxicity of 2, 3, 9-trimethoxypterocarpan in leukemia cell lines (HL-60, Jurkat, Molt-4, and K562) and human peripheral blood mononuclear cells. **Journal of Natural Medicines**, v. 61, n. 2, p. 196-199, 2007a.

MILITAO, G. C. G. *et al.* Induction of apoptosis by pterocarpan from *Platymiscium floribundum* in HL-60 human leukemia cells. **Life sciences**, v. 78, n. 20, p. 2409-2417, 2006.

MILITAO, G. C. G. *et al.* Pterocarpan induce tumor cell death through persistent mitotic arrest during prometaphase. **Biochimie**, v. 104, p. 147-155, 2014.

MITCHISON, T. *et al.* Dynamic instability of microtubule growth. **Nature**, v. 312, n. 5991, p. 237-242, 1984.

MITCHISON, T. J. Towards a pharmacological genetics. **Chemistry & biology**, v. 1, n. 1, p. 3-6, 1994.

MOMOTANI, K. *et al.* Cep57, a multidomain protein with unique microtubule and centrosomal localization domains. **Biochemical Journal**, v. 412, n. 2, p. 265-273, 2008.

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, p. 105-111, 2001.

MOODLEY, Kriebashne *et al.* Real-time profiling of NK cell killing of human astrocytes using xCELLigence technology. **Journal of neuroscience methods**, v. 200, n. 2, p. 173-180, 2011.

MOON, S. S. *et al.* Hanultarin, a cytotoxic lignan as an inhibitor of actin cytoskeleton polymerization from the seeds of *Trichosanthes kirilowii*. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 16, n. 15, p. 7264-7269, 2008.

MORABITO, F. *et al.* Ibrutinib, idelalisib and obinutuzumab for the treatment of patients with chronic lymphocytic leukemia: three new arrows aiming at the target. **Leukemia & lymphoma**, v. 56, n. 12, p. 3250-3256, 2015.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MÜCKE, N. *et al.* Assessing the flexibility of intermediate filaments by atomic force microscopy. **Journal of molecular biology**, v. 335, n. 5, p. 1241-1250, 2004.

- MÜLLER, C. *et al.* Inhibitors of kinesin Eg5: antiproliferative activity of monastrol analogues against human glioblastoma cells. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 59, n. 2, p. 157-164, 2007.
- MURPHY, G. A. *et al.* Cellular functions of TC10, a Rho family GTPase: regulation of morphology, signal transduction and cell growth. **Oncogene**, v. 18, n. 26, p. 3831-3845, 1999.
- MURUGESH, M. G.; SUBBURAJ, K.; TRIVEDI, G. K. Regioselective synthesis of substituted pterocarpans and pterocarpenes. Lewis acid Ti (IV) promoted formal (3+ 2) cycloaddition reactions. **Tetrahedron**, v. 52, n. 6, p. 2217-2228, 1996.
- MUSACCHIO, A.; SALMON, E. D. The spindle-assembly checkpoint in space and time. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 8, n. 5, p. 379-393, 2007.
- NAGASE, T. *et al.* Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XX. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro. **DNA research**, v. 8, n. 2, p. 85-95, 2001.
- NAKAGAWA, M. *et al.* Structures of cabenegrins AI and A-II, potent anti-snake venoms. **Tetrahedron Letters**, v. 23, n. 38, p. 3855-3858, 1982.
- NAKAJIMA, H.; TANOUE, T. Lulu2 regulates the circumferential actomyosin tensile system in epithelial cells through p114RhoGEF. **The Journal of Cell Biology**, v. 195, n. 2, p. 245-261, 2011.
- NAKAMURA, H. *et al.* Identification of a novel human homolog of the Drosophila dlg, P-dlg, specifically expressed in the gland tissues and interacting with p55. **FEBS letters**, v. 433, n. 1-2, p. 63-67, 1998.
- NAKAYAMA, K. *et al.* Mice lacking p27Kip1 display increased body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia, and pituitary tumors. **Cell**, v. 85, n. 5, p. 707-720, 1996.
- NAUMANEN, P.; LAPPALAINEN, P.; HOTULAINEN, P. Mechanisms of actin stress fibre assembly. **Journal of microscopy**, v. 231, n. 3, p. 446-454, 2008.
- NAVARA, C. S. *et al.* Vanadocenes as potent anti-proliferative agents disrupting mitotic spindle formation in cancer cells. **Anti-cancer drugs**, v. 12, n. 4, p. 369-376, 2001.
- NESTAL DE MORAES, G. *et al.* The pterocarpanquinone LQB-118 induces apoptosis in acute myeloid leukemia cells of distinct molecular subtypes and targets FoxO3a and FoxM1 transcription factors. **International journal of oncology**, v. 45, n. 5, p. 1949-1958, 2014.
- NETTO, C. D. *et al.* (±)-3, 4-Dihydroxy-8, 9-methylenedioxypterocarpan and derivatives: Cytotoxic effect on human leukemia cell lines. **European journal of medicinal chemistry**, v. 44, n. 2, p. 920-925, 2009.
- NETTO, C. D. *et al.* New Pterocarpanquinones: synthesis, antineoplastic activity on cultured human malignant cell lines and TNF- α modulation in human PBMC cells. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 18, n. 4, p. 1610-1616, 2010.

- NGUYEN-NGOC, T.; AFSHAR, K.; GÖNCZY, P. Coupling of cortical dynein and G α proteins mediates spindle positioning in *Caenorhabditis elegans*. **Nature cell biology**, v. 9, n. 11, p. 1294-1302, 2007.
- NGUYEN, P. H. *et al.* Cytotoxic and PTP1B inhibitory activities from *Erythrina abyssinica*. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 19, n. 23, p. 6745-6749, 2009.
- NIGG, E. A. Centrosome duplication: of rules and licenses. **Trends in cell biology**, v. 17, n. 5, p. 215-221, 2007.
- NIGG, E. A. Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. **Bioessays**, v. 17, n. 6, p. 471-480, 1995.
- NILSSON, S. *et al.* A randomized, dose-response, multicenter phase II study of radium-223 chloride for the palliation of painful bone metastases in patients with castration-resistant prostate cancer. **European journal of cancer**, v. 48, n. 5, p. 678-686, 2012.
- NISHIDA, N. *et al.* Angiogenesis in cancer. **Vascular health and risk management**, v. 2, n. 3, p. 213, 2006.
- NIU, D. *et al.* Pterocarpan Derivatives from *Clinopodium urticifolium* and Their Cytotoxicity. **Asian Journal of Chemistry**, v. 25, n. 17, p. 9672, 2013.
- NIU, J. *et al.* Genetic polymorphisms in the PTPN13 gene and risk of squamous cell carcinoma of head and neck. **Carcinogenesis**, v. 30, n. 12, p. 2053-2058, 2009.
- NOIVA, R. Protein disulfide isomerase: the multifunctional redox chaperone of the endoplasmic reticulum. In: **Seminars in cell & developmental biology**. Academic Press, 1999. p. 481-493.
- NORBURY, C.; NURSE, P. Animal cell cycles and their control. **Annual review of biochemistry**, v. 61, n. 1, p. 441-468, 1992.
- O'BRIEN, P. M. *et al.* The E3 ubiquitin ligase EDD is an adverse prognostic factor for serous epithelial ovarian cancer and modulates cisplatin resistance in vitro. **British journal of cancer**, v. 98, n. 6, p. 1085-1093, 2008.
- OBCHOEI, S. *et al.* Secreted cyclophilin A mediates G1/S phase transition of cholangiocarcinoma cells via CD147/ERK1/2 pathway. **Tumor Biology**, v. 36, n. 2, p. 849-859, 2015.
- OHKUBO, T. *et al.* Surgical results for hepatocellular carcinoma with macroscopic portal vein tumor thrombosis. **Journal of the American College of Surgeons**, v. 191, n. 6, p. 657-660, 2000.
- OHTANI, K.; DEGREGORI, J.; NEVINS, J. R. Regulation of the cyclin E gene by transcription factor E2F1. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 26, p. 12146-12150, 1995.

- OKOLI, T. C. *et al.* Targeted PI3K δ inhibition by the small molecule idelalisib as a novel therapy in indolent non-Hodgkin lymphoma. **Cancer biology & therapy**, v. 16, n. 2, p. 204-206, 2015.
- OKUMURA, H. *et al.* Phenothiazine and carbazole-related compounds inhibit mitotic kinesin Eg5 and trigger apoptosis in transformed culture cells. **Toxicology letters**, v. 166, n. 1, p. 44-52, 2006.
- OLBRICH, H. *et al.* Recessive HYDIN mutations cause primary ciliary dyskinesia without randomization of left-right body asymmetry. **The American Journal of Human Genetics**, v. 91, n. 4, p. 672-684, 2012.
- ONO, S. Mechanism of depolymerization and severing of actin filaments and its significance in cytoskeletal dynamics. **International review of cytology**, v. 258, p. 1-82, 2007.
- ONO, T. *et al.* Spatial and temporal regulation of Condensins I and II in mitotic chromosome assembly in human cells. **Molecular biology of the cell**, v. 15, n. 7, p. 3296-3308, 2004.
- OOE, A.; KATO, K.; NOGUCHI, S. Possible involvement of CCT5, RGS3, and YKT6 genes up-regulated in p53-mutated tumors in resistance to docetaxel in human breast cancers. **Breast cancer research and treatment**, v. 101, n. 3, p. 305-315, 2007.
- PAGANO, M. *et al.* Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. **Science**, v. 269, n. 5224, p. 682, 1995.
- PALLER, C. J.; ANTONARAKIS, E. S. Cabazitaxel: a novel second-line treatment for metastatic castration-resistant prostate cancer. **Drug design, development and therapy**, v. 5, p. 117, 2011.
- PALOU, G. *et al.* Cyclin regulation by the s phase checkpoint. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 34, p. 26431-26440, 2010.
- PARSONS, J. L. *et al.* Ubiquitin ligase ARF-BP1/Mule modulates base excision repair. **The EMBO Journal**, v. 28, n. 20, p. 3207-3215, 2009.
- PEEHL, D. M. Primary cell cultures as models of prostate cancer development. **Endocrine-related cancer**, v. 12, n. 1, p. 19-47, 2005.
- PELLEGRINI, F.; BUDMAN, D. R. Tubulin function, action of antitubulin drugs, and new drug development. **Cancer investigation**, v. 23, n. 3, p. 264-273, 2005.
- PÉREZ-MARTÍNEZ, F. C. *et al.* Enhanced docetaxel-mediated cytotoxicity in human prostate cancer cells through knockdown of cofilin-1 by carbon nanohorn delivered siRNA. **Biomaterials**, v. 33, n. 32, p. 8152-8159, 2012.
- PERRETTI, M.; D'ACQUISTO, F. Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, n. 1, p. 62-70, 2009.

PETRYLAK, D. P. *et al.* Docetaxel and estramustine compared with mitoxantrone and prednisone for advanced refractory prostate cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 351, n. 15, p. 1513-1520, 2004.

PIENTA, K. J.; ESPER, P. S. Risk factors for prostate cancer. **Annals of internal medicine**, v. 118, n. 10, p. 793-803, 1993.

PIHAN, G. A. Centrosome dysfunction contributes to chromosome instability, chromoanagenesis, and genome reprogramming in cancer. **Frontiers in oncology**, v. 3, 2013.

PIHAN, G. A. *et al.* Centrosome abnormalities and chromosome instability occur together in pre-invasive carcinomas. **Cancer research**, v. 63, n. 6, p. 1398-1404, 2003.

PINES, J.; HUNTER, T. Isolation of a human cyclin cDNA: evidence for cyclin mRNA and protein regulation in the cell cycle and for interaction with p34 cdc2. **Cell**, v. 58, n. 5, p. 833-846, 1989.

PLOUSSARD, G. *et al.* Prostate cancer antigen 3 score accurately predicts tumour volume and might help in selecting prostate cancer patients for active surveillance. **European urology**, v. 59, n. 3, p. 422-429, 2011.

PONGOR, L. *et al.* A genome-wide approach to link genotype to clinical outcome by utilizing next generation sequencing and gene chip data of 6,697 breast cancer patients. **Genome medicine**, v. 7, n. 1, p. 104, 2015.

POPANDA, O.; FOX, G.; THIELMANN, H. W. Modulation of DNA polymerases α , δ and ϵ by lactate dehydrogenase and 3-phosphoglycerate kinase. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression**, v. 1397, n. 1, p. 102-117, 1998.

PORTER, A. T. *et al.* Brachytherapy for prostate cancer. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 45, n. 3, p. 165-178, 1995.

POWELL, S. M. *et al.* Mechanisms of androgen receptor signalling via steroid receptor coactivator-1 in prostate. **Endocrine-related cancer**, v. 11, n. 1, p. 117-130, 2004.

QIAN, Z. *et al.* Downregulation of cyclophilin A by siRNA diminishes non-small cell lung cancer cell growth and metastasis via the regulation of matrix metalloproteinase 9. **BMC cancer**, v. 12, n. 1, p. 442, 2012.

RAAB, M. S. *et al.* GF-15, a novel inhibitor of centrosomal clustering, suppresses tumor cell growth in vitro and in vivo. **Cancer research**, v. 72, n. 20, p. 5374-5385, 2012.

RADMAYR, C. *et al.* 5-alpha-reductase and the development of the human prostate. **Indian journal of urology: IJU: journal of the Urological Society of India**, v. 24, n. 3, p. 309, 2008.

RADONS, J. The human HSP70 family of chaperones: where do we stand?. **Cell Stress and Chaperones**, v. 21, n. 3, p. 379-404, 2016.

- RAGDE, H. *et al.* Ten-year disease free survival after transperineal sonography-guided iodine-125 brachytherapy with or without 45-gray external beam irradiation in the treatment of patients with clinically localized, low to high gleason grade prostate carcinoma. **Cancer**, v. 83, n. 5, p. 989-1001, 1998.
- RAJGOR, D.; SHANAHAN, C. M. Nesprins: from the nuclear envelope and beyond. **Expert reviews in molecular medicine**, v. 15, p. e5, 2013.
- RAYNAL, P. *et al.* Annexin 5 as a potential regulator of annexin 1 phosphorylation by protein kinase C. In vitro inhibition compared with quantitative data on annexin distribution in human endothelial cells. **Biochemical Journal**, v. 292, n. 3, p. 759-765, 1993.
- REBACZ, B. *et al.* Identification of griseofulvin as an inhibitor of centrosomal clustering in a phenotype-based screen. **Cancer Research**, v. 67, n. 13, p. 6342-6350, 2007.
- REN, R. *et al.* Identification of a ten-amino acid proline-rich SH3 binding site. **SCIENCE-NEW YORK THEN WASHINGTON-**, v. 259, p. 1157-1157, 1993.
- REN, X. D.; SCHWARTZ, M. A. Regulation of inositol lipid kinases by Rho and Rac. **Current opinion in genetics & development**, v. 8, n. 1, p. 63-67, 1998.
- RIEDER, C. L.; KHODJAKOV, A. Mitosis through the microscope: advances in seeing inside live dividing cells. **Science**, v. 300, n. 5616, p. 91-96, 2003.
- RIEDER, C. L.; PALAZZO, R. E. Colcemid and the mitotic cycle. **J Cell Sci**, v. 102, n. 3, p. 387-392, 1992.
- ROEESMRPF, P.; FOHLIIAN, J. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. Blamed. **Mass Spectrom**, v. 11, p. 601, 1984.
- RONAI, Z. Glycolytic enzymes as DNA binding proteins. **International journal of biochemistry**, v. 25, n. 7, p. 1073-1076, 1993.
- ROSENBLATT, J. *et al.* Myosin II-dependent cortical movement is required for centrosome separation and positioning during mitotic spindle assembly. **Cell**, v. 117, n. 3, p. 361-372, 2004.
- ROSENBLATT, J. Spindle assembly: asters part their separate ways. **Nature Cell Biology**, v. 7, n. 3, p. 219-222, 2005.
- ROWINSKY, E. K. *et al.* Neurotoxicity of taxol. **Journal of the National Cancer Institute. Monographs**, n. 15, p. 107-115, 1993.
- RUCHAUD, S.; CARMENA, M.; EARNSHAW, W. C. Chromosomal passengers: conducting cell division. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 8, n. 10, p. 798-812, 2007.
- RUDNER, A. D.; MURRAY, A. W. The spindle assembly checkpoint. **Current opinion in cell biology**, v. 8, n. 6, p. 773-780, 1996.

RUIS, B. L.; FATTAH, K. R.; HENDRICKSON, E. A. The catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase regulates proliferation, telomere length, and genomic stability in human somatic cells. **Molecular and cellular biology**, v. 28, n. 20, p. 6182-6195, 2008.

RUSSOWSKY, D. *et al.* AF átima, RA Pilli, LK Kohn, MA Antônio, JE Carvalho. **Bioorg. Chem**, v. 34, p. 173, 2006.

SÁEZ, B. L.; GALCERÁN, J. C. Síndrome de supresión del antiandrógeno: estrategia terapéutica en el cáncer de próstata andrógeno-independiente. **Clinical and Translational Oncology**, v. 6, n. 3, p. 140-149, 2004.

SAITO-DIAZ, K. *et al.* The way Wnt works: components and mechanism. **Growth Factors**, v. 31, n. 1, p. 1-31, 2013.

SAKAMOTO, S. *et al.* Talin1 promotes tumor invasion and metastasis via focal adhesion signaling and anoikis resistance. **Cancer research**, v. 70, n. 5, p. 1885-1895, 2010.

SAKURAI, Y. *et al.* Rautandiols A and B, Pterocarpan and Cytotoxic Constituents from *Neorautanenia mitis* \perp , 1. **Journal of natural products**, v. 69, n. 3, p. 397-399, 2006.

SALEM, M. M.; WERBOVETZ, K. A. Isoflavonoids and Other Compounds from *Psoralea argyrea* with Antiprotozoal Activities. **Journal of natural products**, v. 69, n. 1, p. 43-49, 2006.

SALM, F. *et al.* The phosphoinositide 3-kinase p110 α isoform regulates leukemia inhibitory factor receptor expression via c-Myc and miR-125b to promote cell proliferation in medulloblastoma. **PloS one**, v. 10, n. 4, p. e0123958, 2015.

SAMUELS, Y. *et al.* High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. **Science**, v. 304, n. 5670, p. 554-554, 2004.

SANCHEZ, P. *et al.* Inhibition of prostate cancer proliferation by interference with SONIC HEDGEHOG-GLI1 signaling. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 34, p. 12561-12566, 2004.

SARDANA, G.; DOWELL, B.; DIAMANDIS, E. P. Emerging biomarkers for the diagnosis and prognosis of prostate cancer. **Clinical chemistry**, v. 54, n. 12, p. 1951-1960, 2008.

SARLI, V.; GIANNIS, A. Inhibitors of Mitotic Kinesins: Next-Generation Antimitotics. **ChemMedChem**, v. 1, n. 3, p. 293-298, 2006.

SARRIÓ, D. *et al.* Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype. **Cancer research**, v. 68, n. 4, p. 989-997, 2008.

SATO, H.; OGATA, H.; DE LUCA, L. M. Annexin V inhibits the 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced activation of Ras/extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling pathway upstream of Shc in MCF-7 cells. **Oncogene**, v. 19, n. 25, p. 2904, 2000.

SCHAEFER, K. L. *et al.* PPAR γ inhibitors reduce tubulin protein levels by a PPAR γ , PPAR δ and proteasome-independent mechanism, resulting in cell cycle arrest, apoptosis and reduced metastasis of colorectal carcinoma cells. **International journal of cancer**, v. 120, n. 3, p. 702-713, 2007.

SCHER, H. I. *et al.* Antitumour activity of MDV3100 in castration-resistant prostate cancer: a phase 1–2 study. **The Lancet**, v. 375, n. 9724, p. 1437-1446, 2010.

SCHIFF, P. B.; FANT, J.; HORWITZ, S. B. Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. **Nature**, v. 277, n. 5698, p. 665-667, 1979.

SCHINDELIN, J. *et al.* Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. **Nature methods**, v. 9, n. 7, p. 676-682, 2012.

SCHIRLE, M.; BANTSCHIEFF, M.; KUSTER, B. Mass spectrometry-based proteomics in preclinical drug discovery. **Chemistry & biology**, v. 19, n. 1, p. 72-84, 2012.

SCHMIESING, J. A. *et al.* Identification of two distinct human SMC protein complexes involved in mitotic chromosome dynamics. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 22, p. 12906-12911, 1998.

SCRIMA, M. *et al.* The Nonreceptor-Type Tyrosine Phosphatase PTPN13 Is a Tumor Suppressor Gene in Non-Small Cell Lung Cancer. **The American journal of pathology**, v. 180, n. 3, p. 1202-1214, 2012.

SEBASTIAN, B.; KAKIZUKA, A.; HUNTER, T. Cdc25M2 activation of cyclin-dependent kinases by dephosphorylation of threonine-14 and tyrosine-15. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 8, p. 3521-3524, 1993.

SELLA, A. *et al.* Phase II study of ketoconazole combined with weekly doxorubicin in patients with androgen-independent prostate cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 12, n. 4, p. 683-688, 1994.

SELLERS, J. R. Myosins: a diverse superfamily. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1496, n. 1, p. 3-22, 2000.

SEMENZA, G. L. Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) pathway. **Science's STKE**, v. 2007, n. 407, p. cm8-cm8, 2007.

SEMWOGERERE, D.; WEEKS, E. R. Confocal microscopy. **Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering**, v. 23, p. 1-10, 2005.

SHAH, A.; MANGAONKAR, A. Idelalisib: a novel PI3K δ inhibitor for chronic lymphocytic leukemia. **Annals of Pharmacotherapy**, v. 49, n. 10, p. 1162-1170, 2015.

SHAPIRO, H. M. **Practical Flow Cytometry**. New York : Ed Wiley-Liss, 1995.

SHARMA, N.; MARTIN, A.; MCCABE, C. J. Mining the proteome: the application of tandem mass spectrometry to endocrine cancer research. **Endocrine-related cancer**, v. 19, n. 4, p. R149-R161, 2012.

- SHAW, Reuben J. et al. RhoA-dependent phosphorylation and relocalization of ERM proteins into apical membrane/actin protrusions in fibroblasts. **Molecular biology of the cell**, v. 9, n. 2, p. 403-419, 1998.
- SHAW, R. J.; CANTLEY, L. C. Ras, PI (3) K and mTOR signalling controls tumour cell growth. **Nature**, v. 441, n. 7092, p. 424-430, 2006.
- SHEAFF, R. J. *et al.* Cyclin E-CDK2 is a regulator of p27Kip1. **Genes & development**, v. 11, n. 11, p. 1464-1478, 1997.
- SHEARER, R. F. *et al.* Functional roles of the E3 ubiquitin ligase UBR5 in cancer. **Molecular Cancer Research**, v. 13, n. 12, p. 1523-1532, 2015.
- SHERR, C. J. The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. **Cancer research**, v. 60, n. 14, p. 3689-3695, 2000.
- SHERR, Charles J.; ROBERTS, James M. Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. **Genes & development**, v. 18, n. 22, p. 2699-2711, 2004.
- SHELANSKI, M. L.; TAYLOR, E. W. Isolation of a protein subunit from microtubules. **The Journal of cell biology**, v. 34, n. 2, p. 549-554, 1967.
- SHENGQUAN, L.; NGONG, H. S. Design of low-molecular-weight prodrugs for targeted delivery of anticancer agents. In: INTERNATIONAL CONFERENCE AND EXHIBITION ON PHARMACEUTICS AND NOVEL DRUG DELIVERY SYSTEMS, 3., 2013. [S.l.]. **Anais...** [S.l.:s.n.], 2013.
- SHERR, Charles J. Principles of tumor suppression. **Cell**, v. 116, n. 2, p. 235-246, 2004.
- SHIPLEY, W. U. *et al.* Radiation therapy for clinically localized prostate cancer: a multi-institutional pooled analysis. **Jama**, v. 281, n. 17, p. 1598-1604, 1999.
- SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2016. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 66, n. 1, p. 7-30, 2016.
- SILLIBOURNE, J. E. *et al.* Chromatin remodeling proteins interact with pericentrin to regulate centrosome integrity. **Molecular biology of the cell**, v. 18, n. 9, p. 3667-3680, 2007.
- SINGH, P. Role of Annexin-II in GI cancers: interaction with gastrins/progastrins. **Cancer letters**, v. 252, n. 1, p. 19-35, 2007.
- SINGH, S. V. *et al.* Sulforaphane-induced G2/M phase cell cycle arrest involves checkpoint kinase 2-mediated phosphorylation of cell division cycle 25C. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 24, p. 25813-25822, 2004.
- SLANGY, A. *et al.* Phosphorylation by p34cdc2 regulates spindle association of human Eg5, a kinesin-related motor essential for bipolar spindle formation in vivo. **Cell**, v. 83, n. 7, p. 1159-1169, 1995.

- SMOLEN, G. A. *et al.* A genome-wide RNAi screen identifies multiple RSK-dependent regulators of cell migration. **Genes & development**, v. 24, n. 23, p. 2654-2665, 2010.
- SOLINET, S. *et al.* The actin-binding ERM protein Moesin binds to and stabilizes microtubules at the cell cortex. **Journal Cell Biology**, p. jcb. 201304052, 2013.
- SONG, L. N.; GELMANN, E. P. Silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptor and nuclear receptor corepressor attenuate transcriptional activation by the β -catenin-TCF4 complex. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 38, p. 25988-25999, 2008.
- SOUNG, Y. H.; CLIFFORD, J. L.; CHUNG, J. Crosstalk between integrin and receptor tyrosine kinase signaling in breast carcinoma progression. **BMB reports**, v. 43, n. 5, p. 311-318, 2010.
- SPECTOR, I. *et al.* Latrunculins: novel marine toxins that disrupt microfilament organization in cultured cells. **Science**, v. 219, n. 4584, p. 493-495, 1983.
- SPEYER, C. L. *et al.* Metabotropic glutamate receptor-1: a potential therapeutic target for the treatment of breast cancer. **Breast cancer research and treatment**, v. 132, n. 2, p. 565-573, 2012.
- SPORN, M. B.; LIBY, K. T. Cancer chemoprevention: scientific promise, clinical uncertainty. **Nature clinical practice oncology**, v. 2, n. 10, p. 518-525, 2005.
- SRIVASTAVA, J. *et al.* Src-dependent ezrin phosphorylation in adhesion-mediated signaling. **Molecular biology of the cell**, v. 16, n. 3, p. 1481-1490, 2005.
- STAMATKIN, C. *et al.* Inhibition of class IA PI3K enzymes in non-small cell lung cancer cells uncovers functional compensation among isoforms. **Cancer biology & therapy**, v. 16, n. 9, p. 1341-1352, 2015.
- STASTNA, M.; VAN EYK, J. E. Secreted proteins as a fundamental source for biomarker discovery. **Proteomics**, v. 12, n. 4-5, p. 722-735, 2012.
- STEARNS, Tim; EVANS, Louise; KIRSCHNER, Marc. γ -Tubulin is a highly conserved component of the centrosome. **Cell**, v. 65, n. 5, p. 825-836, 1991.
- STERNLICHT, H. *et al.* The t-complex polypeptide 1 complex is a chaperonin for tubulin and actin in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 20, p. 9422-9426, 1993.
- STORCHOVA, Z.; PELLMAN, D. From polyploidy to aneuploidy, genome instability and cancer. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 5, n. 1, p. 45-54, 2004.
- STREBHARDT, K.; ULLRICH, A. Targeting polo-like kinase 1 for cancer therapy. **Nature reviews cancer**, v. 6, n. 4, p. 321-330, 2006.
- SUN, S. *et al.* Identification of PRKDC (Protein Kinase, DNA-Activated, Catalytic Polypeptide) as an essential gene for colorectal cancer (CRCs) cells. **Gene**, v. 584, n. 1, p. 90-96, 2016.

- SUN, S. *et al.* Castration resistance in human prostate cancer is conferred by a frequently occurring androgen receptor splice variant. **The Journal of clinical investigation**, v. 120, n. 8, p. 2715-2730, 2010.
- SUN, S. *et al.* Inhibition of prolyl 4-hydroxylase, beta polypeptide (P4HB) attenuates temozolomide resistance in malignant glioma via the endoplasmic reticulum stress response (ERSR) pathways. **Neuro-oncology**, p. not005, 2013.
- SYLJUÅSEN, R. G. *et al.* Adaptation to the Ionizing Radiation–Induced G2 Checkpoint Occurs in Human Cells and Depends on Checkpoint Kinase 1 and Polo-like Kinase 1 Kinases. **Cancer research**, v. 66, n. 21, p. 10253-10257, 2006.
- SZKLARCZYK, D. *et al.* STRING v10: protein–protein interaction networks, integrated over the tree of life. **Nucleic acids research**, p. gku1003, 2014.
- TAKAHASHI, A. *et al.* Development of thermotolerance requires interaction between polymerase- β and heat shock proteins. **Cancer science**, v. 99, n. 5, p. 973-978, 2008.
- TAKEMOTO, A. *et al.* Cell cycle-dependent phosphorylation, nuclear localization, and activation of human condensin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 6, p. 4551-4559, 2004.
- TALAPATRA, S. K.; SCHÜTTELKOPF, A. W.; KOZIELSKI, F. The structure of the ternary Eg5–ADP–ispinesib complex. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 68, n. 10, p. 1311-1319, 2012.
- TAN, M. H. E. *et al.* Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 36, n. 1, p. 3, 2015.
- TANG, P. A. *et al.* Phase II study of ispinesib in recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. **Investigational new drugs**, v. 26, n. 3, p. 257-264, 2008.
- TAPLIN, M. E. *et al.* Mutation of the androgen-receptor gene in metastatic androgen-independent prostate cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 332, n. 21, p. 1393-1398, 1995.
- TAPLIN, M.E.; BALK, S. P. Androgen receptor: a key molecule in the progression of prostate cancer to hormone independence. **Journal of cellular biochemistry**, v. 91, n. 3, p. 483-190, 2004.
- TARBY, C. M. *et al.* Inhibitors of human mitotic kinesin Eg5: characterization of the 4-phenyl-tetrahydroisoquinoline lead series. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 16, n. 8, p. 2095-2100, 2006.
- TAYLOR, B. S. *et al.* Integrative genomic profiling of human prostate cancer. **Cancer cell**, v. 18, n. 1, p. 11-22, 2010.
- TAYLOR, W. R.; STARK, G. R. Regulation of the G2/M transition by p53. **Oncogene**, v. 20, n. 15, p. 1803, 2001.

TEH, J.; CHEN, S. Metabotropic glutamate receptors and cancerous growth. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Membrane Transport and Signaling**, v. 1, n. 2, p. 211-220, 2012.

TEITEN, M. H. *et al.* Targeting the wingless signaling pathway with natural compounds as chemopreventive or chemotherapeutic agents. **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 13, n. 1, p. 245-254, 2012.

TERUYA, T. *et al.* Phoslactomycin targets cysteine-269 of the protein phosphatase 2A catalytic subunit in cells. **FEBS letters**, v. 579, n. 11, p. 2463-2468, 2005.

THAYER, S. P. *et al.* Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. **Nature**, v. 425, n. 6960, p. 851-856, 2003.

THÉRY, M. *et al.* The extracellular matrix guides the orientation of the cell division axis. **Nature cell biology**, v. 7, n. 10, p. 947-953, 2005.

TILLEMENT, V. *et al.* Spindle assembly defects leading to the formation of a monopolar mitotic apparatus. **Biology of the Cell**, v. 101, n. 1, p. 1-11, 2009.

TOLIAS, K. F.; CANTLEY, L. C.; CARPENTER, C. L. Rho family GTPases bind to phosphoinositide kinases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 30, p. 17656-17659, 1995.

TOMIYAMA, L. *et al.* Loss of Dlg5 expression promotes the migration and invasion of prostate cancer cells via Girdin phosphorylation. **Oncogene**, v. 34, n. 9, p. 1141-1149, 2015.

TONACK, S. *et al.* Pancreatic cancer: proteomic approaches to a challenging disease. **Pancreatology**, v. 9, n. 5, p. 567-576, 2009.

TORBETT, N. E. *et al.* A chemical screen in diverse breast cancer cell lines reveals genetic enhancers and suppressors of sensitivity to PI3K isoform-selective inhibition. **Biochemical Journal**, v. 415, n. 1, p. 97-110, 2008.

TSUKITA, S.; YONEMURA, S. Cortical actin organization: lessons from ERM (ezrin/radixin/moesin) proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 49, p. 34507-34510, 1999.

VACHANI, A. *et al.* A 10-gene classifier for distinguishing head and neck squamous cell carcinoma and lung squamous cell carcinoma. **Clinical Cancer Research**, v. 13, n. 10, p. 2905-2915, 2007.

VAINIO, P. *et al.* Phospholipase PLA2G7, associated with aggressive prostate cancer, promotes prostate cancer cell migration and invasion and is inhibited by statins. **Oncotarget**, v. 2, n. 12, p. 1176-1190, 2011.

VALENTIJN, L. J.; KOSTER, J.; VERSTEEG, R. Read-through transcript from NM23-H1 into the neighboring NM23-H2 gene encodes a novel protein, NM23-LV. **Genomics**, v. 87, n. 4, p. 483-489, 2006.

VAN AELST, L.; D'SOUZA-SCHOREY, C. Rho GTPases and signaling networks. **Genes & development**, v. 11, n. 18, p. 2295-2322, 1997.

VANDEBERG, J. L. The phosphoglycerate kinase isozyme system in mammals: biochemical, genetic, developmental, and evolutionary aspects. **Isozymes**, v. 12, p. 133, 1985.

VASAITIS, T. S.; BRUNO, R. D.; NJAR, V. C. O. CYP17 inhibitors for prostate cancer therapy. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 125, n. 1, p. 23-31, 2011.

VAUPEL, P.; MAYER, A. Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 26, n. 2, p. 225-239, 2007.

VERMEULEN, K.; VAN BOCKSTAELE, D. R.; BERNEMAN, Z. N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell proliferation**, v. 36, n. 3, p. 131-149, 2003.

VIEIRA, N. C. *et al.* Trypanocidal activity of a new pterocarpan and other secondary metabolites of plants from Northeastern Brazil flora. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 16, n. 4, p. 1676-1682, 2008.

VILLÉN, J.; GYGI, S. P. The SCX/IMAC enrichment approach for global phosphorylation analysis by mass spectrometry. **Nature protocols**, v. 3, n. 10, p. 1630-1638, 2008.

VILOZNY, B. *et al.* A New Dimension to the Biosynthetic Products Isolated from the Sponge *Negombata magnifica*. **Journal of natural products**, v. 67, n. 6, p. 1055-1057, 2004.

VOGELSTEIN, B. *et al.* Cancer genome landscapes. **Science**, v. 339, n. 6127, p. 1546-1558, 2013.

WALLACE, T. A. *et al.* Tumor immunobiological differences in prostate cancer between African-American and European-American men. **Cancer research**, v. 68, n. 3, p. 927-936, 2008.

WANG, C. *et al.* MDM2 interaction with nuclear corepressor KAP1 contributes to p53 inactivation. **The EMBO journal**, v. 24, n. 18, p. 3279-3290, 2005.

WANG, H. B.; ZHANG, Y. Mi2, an auto-antigen for dermatomyositis, is an ATP-dependent nucleosome remodeling factor. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 12, p. 2517-2521, 2001.

WANG, J. *et al.* Characterization of phosphoglycerate kinase-1 expression of stromal cells derived from tumor microenvironment in prostate cancer progression. **Cancer research**, v. 70, n. 2, p. 471-480, 2010.

WANG, W. *et al.* The activity status of cofilin is directly related to invasion, intravasation, and metastasis of mammary tumors. **The Journal of cell biology**, v. 173, n. 3, p. 395-404, 2006.

WARBURG, O. *et al.* On the origin of cancer cells. **Science**, v. 123, n. 3191, p. 309-314, 1956.

WATERS, J. C. *et al.* Localization of Mad2 to kinetochores depends on microtubule attachment, not tension. **The Journal of cell biology**, v. 141, n. 5, p. 1181-1191, 1998.

WÄTJEN, W. *et al.* Pterocarpan phaseollin and neorautenol isolated from *Erythrina addisoniae* induce apoptotic cell death accompanied by inhibition of ERK phosphorylation. **Toxicology**, v. 242, n. 1, p. 71-79, 2007.

WATKINS, D. N. *et al.* Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer. **Nature**, v. 422, n. 6929, p. 313-317, 2003.

WEBBER, M. M. Effects of zinc and cadmium on the growth of human prostatic epithelium in vitro. **Nutrition Research**, v. 6, n. 1, p. 35-40, 1986.

WEINERT, T. DNA damage checkpoints update: getting molecular. **Current opinion in genetics & development**, v. 8, n. 2, p. 185-193, 1998.

WEIS, M. *et al.* Statins have biphasic effects on angiogenesis. **Circulation**, v. 105, n. 6, p. 739-745, 2002.

WEN, F. *et al.* PIK3CA and PIK3CB expression and relationship with multidrug resistance in colorectal carcinoma. **International journal of clinical and experimental pathology**, v. 7, n. 11, p. 8295-303, 2014.

WENG, W. H. *et al.* Prognostic impact of immunohistochemical expression of ezrin in highly malignant soft tissue sarcomas. **Clinical Cancer Research**, v. 11, n. 17, p. 6198-6204, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cancer**. 2015. Disponível em: <http://www.who.int/cancer/en/> Acesso em: 09 dez. 2016.

WIELAND, T.; FAULSTICH, H. The action of phalloidin. **Current problems in clinical biochemistry**, v. 7, p. 11, 1977.

WILDING, G.; CHEN, M.; GELMANN, E. P. Aberrant response in vitro of hormone-responsive prostate cancer cells to antiandrogens. **The Prostate**, v. 14, n. 2, p. 103-115, 1989.

WILKINS, M. R. *et al.* From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. **Nature Biotechnology**, v. 14, n. 1, p. 61-65, 1996.

WILT, T. J. *et al.* Radical prostatectomy versus observation for localized prostate cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 367, n. 3, p. 203-213, 2012.

WITTEKIND, C.; NEID, M. Cancer invasion and metastasis. **Oncology**, v. 69, n. Suppl. 1, p. 14-16, 2005.

WOOD, K. W.; CORNWELL, W. D.; JACKSON, J. R. Past and future of the mitotic spindle as an oncology target. **Current opinion in pharmacology**, v. 1, n. 4, p. 370-377, 2001.

- WOODAGE, T. *et al.* Characterization of the CHD family of proteins. **Proceedings of The National Academy of Sciences**, v. 94, n. 21, p. 11472-11477, 1997.
- WOODS, C. M. *et al.* Taxol-induced mitotic block triggers rapid onset of a p53-independent apoptotic pathway. **Molecular medicine**, v. 1, n. 5, p. 506, 1995.
- WU, C. Y. C. *et al.* PI3K regulation of RAC1 is required for KRAS-induced pancreatic tumorigenesis in mice. **Gastroenterology**, v. 147, n. 6, p. 1405-1416. e7, 2014.
- WU, Q. *et al.* Cep57, a NEDD1-binding pericentriolar material component, is essential for spindle pole integrity. **Cell research**, v. 22, n. 9, p. 1390-1401, 2012.
- WU, S. *et al.* PIK3CA and PIK3CB silencing by RNAi reverse MDR and inhibit tumorigenic properties in human colorectal carcinoma. **Tumor Biology**, v. 37, n. 7, p. 8799-8809, 2016.
- WU, T. *et al.* Identification of personalized chemoresistance genes in subtypes of basal-like breast cancer based on functional differences using pathway analysis. **PloS one**, v. 10, n. 6, p. e0131183, 2015.
- WU, W. *et al.* Comparative proteomic studies of serum from patients with hepatocellular carcinoma. **Journal of Investigative Surgery**, v. 25, n. 1, p. 37-42, 2012.
- XIANG, Y. *et al.* JARID1B is a histone H3 lysine 4 demethylase up-regulated in prostate cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 49, p. 19226-19231, 2007.
- XIAO, P. *et al.* Anticancer effect of docetaxel induces apoptosis of prostate cancer via the cofilin-1 and paxillin signaling pathway. **Molecular medicine reports**, v. 13, n. 5, p. 4079-4084, 2016.
- XUE, G. *et al.* Expression of annexin a5 is associated with higher tumor stage and poor prognosis in colorectal adenocarcinomas. **Journal of clinical gastroenterology**, v. 43, n. 9, p. 831-837, 2009.
- YAM, A. Y. *et al.* Defining the TRiC/CCT interactome links chaperonin function to stabilization of newly made proteins with complex topologies. **Nature structural & molecular biology**, v. 15, n. 12, p. 1255-1262, 2008.
- YAN, H. *et al.* Over-Expression of Cofilin-1 and Phosphoglycerate Kinase 1 in Astrocytomas Involved in Pathogenesis of Radioresistance. **CNS neuroscience & therapeutics**, v. 18, n. 9, p. 729-736, 2012.
- YANG, Q. *et al.* Ezrin and radixin both regulate the apical membrane localization of ABCC2 (MRP2) in human intestinal epithelial Caco-2 cells. **Experimental cell research**, v. 313, n. 16, p. 3517-3525, 2007.
- YANG, Z. L. *et al.* CFL1 and Arp3 are biomarkers for metastasis and poor prognosis of squamous cell/adenosquamous carcinomas and adenocarcinomas of gallbladder. **Cancer investigation**, v. 31, n. 2, p. 132-139, 2013.

- YAP, C. T. *et al.* The motility of glioblastoma tumour cells is modulated by intracellular cofilin expression in a concentration-dependent manner. **Cell motility and the cytoskeleton**, v. 60, n. 3, p. 153-165, 2005.
- YAP, T. A. *et al.* Drug discovery in advanced prostate cancer: translating biology into therapy. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 15, n. 10, p. 699-718, 2016.
- YEE, D. S. *et al.* Reduced annexin II protein expression in high-grade prostatic intraepithelial neoplasia and prostate cancer. **Archives of pathology & laboratory medicine**, v. 131, n. 6, p. 902-908, 2007.
- YOKOE, T. *et al.* KAP1 is associated with peritoneal carcinomatosis in gastric cancer. **Annals of surgical oncology**, v. 17, n. 3, p. 821-828, 2010.
- YOUN, B. H.; KIM, H. D.; KIM, J. Nm23-H1/nucleoside diphosphate kinase as a key molecule in breast tumor angiogenesis. **Expert opinion on therapeutic targets**, v. 12, n. 11, p. 1419-1430, 2008.
- YU, W. D. *et al.* Phosphatidylinositol 3-kinase CB association with preoperative radiotherapy response in rectal adenocarcinoma. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 20, n. 43, p. 16258, 2014.
- ZAMPELLA, A. *et al.* New Jaspamide Derivatives from the Marine Sponge *Jaspis splendans* Collected in Vanuatu 1. **Journal of natural products**, v. 62, n. 2, p. 332-334, 1999.
- ZELEFSKY, M. *et al.* Dose escalation with three-dimensional conformal radiation therapy affects the outcome in prostate cancer. **International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics**, v. 41, n. 3, p. 491-500, 1998.
- ZHAN, H. *et al.* Tumour-suppressive role of PTPN13 in hepatocellular carcinoma and its clinical significance. **Tumor Biology**, v. 37, n. 7, p. 9691-9698, 2016.
- ZHAN, M.; HAN, Z. C. Phosphatidylinositide 3-kinase AKT in radiation responses. **Histology and histopathology**, 2004.
- ZHANG, T. *et al.* Inhibition of P13 kinases enhances the sensitivity of non-small cell lung cancer cells to ionizing radiation. **Oncology reports**, v. 24, n. 6, p. 1683, 2010.
- ZHANG, X. *et al.* Androgen receptor variants occur frequently in castration resistant prostate cancer metastases. **PloS one**, v. 6, n. 11, p. e27970, 2011.
- ZHANG, Y. *et al.* The dermatomyositis-specific autoantigen Mi2 is a component of a complex containing histone deacetylase and nucleosome remodeling activities. **Cell**, v. 95, n. 2, p. 279-289, 1998.
- ZHAO, X. *et al.* The HECT-domain ubiquitin ligase Huwe1 controls neural differentiation and proliferation by destabilizing the N-Myc oncoprotein. **Nature cell biology**, v. 10, n. 6, p. 643-653, 2008.

ZHOU, B. *et al.* Overexpression of the structural maintenance of chromosome 4 protein is associated with tumor de-differentiation, advanced stage and vascular invasion of primary liver cancer. **Oncology reports**, v. 28, n. 4, p. 1263-1268, 2012.

ZHOU, H.; XIE, X.; TANG, Y. Engineering natural products using combinatorial biosynthesis and biocatalysis. **Current opinion in biotechnology**, v. 19, n. 6, p. 590-596, 2008.

ZHOU, H. *et al.* Anti-inflammatory and antiproliferative activities of trifolirhizin, a flavonoid from *Sophora flavescens* roots. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 57, n. 11, p. 4580-4585, 2009.

ZHOU, Zhihua *et al.* Methylation-mediated silencing of Dlg5 facilitates bladder cancer metastasis. **Experimental cell research**, v. 331, n. 2, p. 399-407, 2015.

ZHU, Beibei *et al.* Prohibitin and cofilin are intracellular effectors of transforming growth factor β signaling in human prostate cancer cells. **Cancer research**, v. 66, n. 17, p. 8640-8647, 2006.

ZHU, Di *et al.* The Cyclophilin A-CD147 complex promotes the proliferation and homing of multiple myeloma cells. **Nature medicine**, v. 21, n. 6, p. 572-580, 2015.

ZHU, Jinhong *et al.* Associations of PI3KR1 and mTOR polymorphisms with esophageal squamous cell carcinoma risk and gene-environment interactions in Eastern Chinese populations. **Scientific reports**, v. 5, p. 8250, 2015.

ZHU, M. L. *et al.* Tubulin-targeting chemotherapy impairs androgen receptor activity in prostate cancer. **Cancer research**, v. 70, n. 20, p. 7992-8002, 2010.

ZIEKER, D. *et al.* Phosphoglycerate kinase 1 a promoting enzyme for peritoneal dissemination in gastric cancer. **International journal of cancer**, v. 126, n. 6, p. 1513-1520, 2010.

ZIMMERMAN, W. C. *et al.* Mitosis-specific anchoring of γ tubulin complexes by pericentriolar controls spindle organization and mitotic entry. **Molecular biology of the cell**, v. 15, n. 8, p. 3642-3657, 2004.

ZYSS, D.; GERGELY, F. Centrosome function in cancer: guilty or innocent?. **Trends in cell biology**, v. 19, n. 7, p. 334-346, 2009.

APÊNDICE A - LISTA DE PROTEÍNAS QUANTIFICADAS NO TRATAMENTO COM PTC (+) EM 24 HORAS. DO TOTAL DE 137 PROTEÍNAS, 24 FORAM SUPEREXPRESSAS (UP-REGULATED), 28 SUBEXPRESSAS (DOWN-REGULATED) E 85 NÃO FORAM DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS (UNCHANGED).

Entrada	Peptídeos contados	Peptídeos Únicos	Nomes Proteínas	Gene	Comprimento	FoldChange	FoldLog2	Status
Q9P2N2	4	3	Rho GTPase-activating protein 28 (Rho-type GTPase-activating protein 28)	ARHGAP28	729	6,926623449	2,792152247	UP
P31942	4	3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3 (hnRNP H3) (Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein 2H9) (hnRNP 2H9)	HNRNPH3	346	4,717602175	2,238053764	UP
P0DMV8	19	9	Heat shock 70 kDa protein 1A (Heat shock 70 kDa protein 1) (HSP70-1) (HSP70.1)	HSPA1A	641	4,560218834	2,189103058	UP
Q5T200	22	12	Zinc finger CCH domain-containing protein 13	ZC3H13	1668	4,115145159	2,040943321	UP
Q13263	8	5	Transcription intermediary factor 1-beta (TIF1-beta) (E3 SUMO-protein ligase TRIM28) (EC 6.3.2.-) (KRAB-associated protein 1) (KAP-1) (KRAB-interacting protein 1) (KRIP-1) (Nuclear corepressor KAP-1) (RING finger protein 96) (Tripartite motif-containing protein 28)	TRIM28	835	4,071193697	2,025451863	UP
Q4G0P3	17	13	Hydrocephalus-inducing protein homolog	HYDIN	5121	3,979471786	1,992576948	UP
P63261	60	9	Actin, cytoplasmic 2 (Gamma-actin) [Cleaved into: Actin, cytoplasmic 2, N-terminally processed]	ACTG1	375	3,696763871	1,886262895	UP
Q32Q12	15	12	Nucleoside diphosphate kinase (EC 2.7.4.6)	NME1-NME2	292	3,528415566	1,819020487	UP
Q9BUF5	11	1	Tubulin beta-6 chain (Tubulin beta class V)	TUBB6	446	3,420887055	1,774370473	UP
P26038	12	6	Moesin (Membrane-organizing extension spike protein)	MSN	577	3,220883322	1,687456399	UP
E7EPJ7	8	7	Triple functional domain protein (Fragment)	TRIO	2546	3,130434344	1,646362843	UP
Q86UP2	5	2	Kinectin (CG-1 antigen) (Kinesin receptor)	KTN1	1357	2,913417547	1,542712481	UP
Q71D13	12	1	Histone H3.2 (Histone H3/m) (Histone H3(o))	HIST2H3A	136	2,829796911	1,500698517	UP
P17066	15	4	Heat shock 70 kDa protein 6 (Heat shock 70 kDa protein B)	HSPA6	643	2,511758968	1,328698028	UP
Q8N2C7	5	3	Protein unc-80 homolog	UNC80	3258	2,399032127	1,262452478	UP
Q2MIP5	6	3	Kinesin-like protein KIF7	KIF7	1343	2,354132589	1,235195578	UP
P07237	5	4	Protein disulfide-isomerase (PDI) (EC 5.3.4.1) (Cellular thyroid hormone-binding protein) (Prolyl 4-hydroxylase subunit beta) (p55)	P4HB	508	2,343428231	1,228620612	UP
Q8NI35	6	2	InaD-like protein (InaD) protein (hINADL) (Pals 1-associated tight junction protein) (Protein associated to tight junctions)	INADL	1801	2,2200182	1,150571504	UP

Q9HCK8	4	3	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 8 (CHD-8) (EC 3.6.4.12) (ATP-dependent helicase CHD8) (Helicase with SNF2 domain 1)	CHD8	2581	2,164275976	1,113884475	UP
Q7Z6Z7	10	8	E3 ubiquitin-protein ligase HUWE1 (EC 6.3.2.-) (ARF-binding protein 1) (ARF-BP1) (HECT, UBA and WWE domain-containing protein 1) (Homologous to E6AP carboxyl terminus homologous protein 9) (HectH9) (Large structure of UREB1) (LASU1) (Mcl-1 ubiquitin ligase E3) (Mule) (Upstream regulatory element-binding protein 1) (URE-B1) (URE-binding protein 1)	HUWE1	4374	2,147734049	1,102815357	UP
Q13315	16	12	Serine-protein kinase ATM (EC 2.7.11.1) (Ataxia telangiectasia mutated) (A-T mutated)	ATM	3056	2,134019392	1,095573286	UP
H0YNP5	12	1	Annexin (Fragment)	ANXA2	175	2,121613759	1,085162037	UP
K7EK07	12	1	Histone H3 (Fragment)	H3F3B	132	2,119761784	1,083902146	UP
P17987	4	4	T-complex protein 1 subunit alpha (TCP-1-alpha) (CCT-alpha)	TCP1	556	2,101911725	1,071702081	UP
O14795	7	4	Protein unc-13 homolog B (Munc13-2) (munc13)	UNC13B	1591	1,938592081	0,955009263	UNCHANGED
Q9BV73	30	18	Centrosome-associated protein CEP250 (250 kDa centrosomal protein) (Cep250) (Centrosomal Nek2-associated protein 1) (C-Nap1) (Centrosomal protein 2)	CEP250	2442	1,899898583	0,925922409	UNCHANGED
Q8WUM4	5	4	Programmed cell death 6-interacting protein (PDCD6-interacting protein) (ALG-2-interacting protein 1) (ALG-2-interacting protein X) (Hp95)	PDCD6IP	868	1,89394009	0,921390695	UNCHANGED
Q16777	26	14	Histone H2A type 2-C (Histone H2A-GL101) (Histone H2A(q))	HIST2H2AC	129	1,889275199	0,917832866	UNCHANGED
Q14315	5	4	Filamin-C (FLN-C) (FLNc) (ABP-280-like protein) (ABP-L) (Actin-binding-like protein) (Filamin-2) (Gamma-filamin)	FLNC	2725	1,860448746	0,895650646	UNCHANGED
Q5TEC6	10	2	Histone H3	HIST2H3PS2	136	1,831287051	0,872857949	UNCHANGED
Q86XA9	8	3	HEAT repeat-containing protein 5A	HEATR5A	2040	1,813578894	0,858839506	UNCHANGED
P10412	9	1	Histone H1.4 (Histone H1b) (Histone H1s-4)	HIST1H1E	219	1,782898521	0,83422459	UNCHANGED
Q9UPV9	6	4	Trafficking kinesin-binding protein 1 (106 kDa O-GlcNAc transferase-interacting protein)	TRAK1	953	1,76933098	0,823203951	UNCHANGED
Q9UG01	8	4	Intraflagellar transport protein 172 homolog	IFT172	1749	1,749219119	0,806711023	UNCHANGED
P14618	35	22	Pyruvate kinase PKM (EC 2.7.1.40) (Cytosolic thyroid hormone-binding protein) (CTHBP) (Opa-interacting protein 3) (OIP-3) (Pyruvate kinase 2/3) (Pyruvate kinase muscle isozyme) (Thyroid hormone-binding protein 1) (THBPL) (Tumor M2-PK) (p58)	PKM	531	1,730137203	0,7908886451	UNCHANGED
H7BY63	4	2	Protein FAM184A	FAM184A	936	1,69199102	0,758721911	UNCHANGED
E7EPU2	6	4	Disco-interacting protein 2 homolog C	DIP2C	1537	1,674649808	0,74385944	UNCHANGED

P61978	7	1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP K) (Transformation up-regulated nuclear protein) (TUNP)	HNRNPK	463	1,591659225	0,670531487	UNCHANGED
B1AJZ9	6	1	Forkhead-associated domain-containing protein 1 (FHA domain-containing protein 1)	FHAD1	1412	1,575241413	0,655572945	UNCHANGED
Q96JB5	4	2	CDK5 regulatory subunit-associated protein 3 (CDK5 activator-binding protein C53) (LXXLL/leucine-zipper-containing ARF-binding protein) (Protein HSF-27)	CDK5RAP3	506	1,574837397	0,655202877	UNCHANGED
Q5VT06	11	7	Centrosome-associated protein 350 (Cep350) (Centrosome-associated protein of 350 kDa)	CEP350	3117	1,567392131	0,648366159	UNCHANGED
J3QKN0	4	3	Polyubiquitin-B (Fragment)	UBB	206	1,567388235	0,648362573	UNCHANGED
P11137	12	7	Microtubule-associated protein 2 (MAP-2)	MAP2	1827	1,566139018	0,647212279	UNCHANGED
Q96T76	4	3	MMS19 nucleotide excision repair protein homolog (hMMS19) (MET18 homolog) (MMS19-like protein)	MMS19	1030	1,565890633	0,646983454	UNCHANGED
P18615	6	3	Negative elongation factor E (NELF-E) (RNA-binding protein RD)	NELFE	380	1,514662241	0,598996119	UNCHANGED
F8VVM2	4	2	Phosphate carrier protein, mitochondrial	SLC25A3	324	1,498568253	0,583584794	UNCHANGED
P11532	20	11	Dystrophin	DMD	3685	1,482441594	0,567975266	UNCHANGED
A0A087WTT1	5	2	Polyadenylate-binding protein (PABP)	PABPC1	522	1,455844981	0,541856745	UNCHANGED
Q8WYP5	7	5	Protein ELYS (Embryonic large molecule derived from yolk sac) (Protein MEL-28) (Putative AT-hook-containing transcription factor 1)	AHCTF1	2266	1,448409381	0,5344469426	UNCHANGED
Q96J17	10	6	Spatacsin (Colorectal carcinoma-associated protein) (Spastic paraplegia 11 protein)	SPG11	2443	1,442186976	0,528258219	UNCHANGED
A0A0C4DG17	5	5	40S ribosomal protein SA (37 kDa laminin receptor precursor) (37/67 kDa laminin receptor) (67 kDa laminin receptor) (Laminin receptor 1) (Laminin-binding protein precursor p40)	RPSA	300	1,432696833	0,51873336	UNCHANGED
P06733	47	32	Alpha-enolase (EC 4.2.1.11) (2-phospho-D-glycerate hydro-lyase) (C-myc promoter-binding protein) (Enolase 1) (MIPB-1) (Non-neural enolase) (NNE) (Phosphopyruvate hydratase) (Plasminogen-binding protein)	ENO1	434	1,423435462	0,509377084	UNCHANGED
M0QXS5	4	3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L (Fragment)	HNRNPL	530	1,391492028	0,476632643	UNCHANGED
Q9C0D5	4	3	Protein TANC1 (Tetratricopeptide repeat, ankyrin repeat and coiled-coil domain-containing protein 1)	TANC1	1861	1,387091114	0,472062557	UNCHANGED
Q12802	9	4	A-kinase anchor protein 13 (AKAP-13) (AKAP-Lbc) (Breast cancer nuclear receptor-binding auxiliary protein) (Guanine nucleotide exchange factor Lbc) (Human thyroid-anchoring protein 31) (Lymphoid blast crisis oncogene) (LBC oncogene) (Non-oncogenic Rho GTPase-specific GTP exchange factor) (Protein kinase A-anchoring protein 13) (PRKA13) (p47)	AKAP13	2813	1,368316038	0,452401486	UNCHANGED

P07737	8	4	Profilin-1 (Epididymis tissue protein Li 184a) (Profilin I)	PFN1	140	1,362513759	0,446270799	UNCHANGED
P22626	16	10	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 (hnRNP A2/B1)	HNRNPA2B1	353	1,355445721	0,438767342	UNCHANGED
P04406	33	23	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (EC 1.2.1.12) (Peptidyl-cysteine S-nitrosylase GAPDH) (EC 2.6.99.-)	GAPDH	335	1,355067375	0,438364585	UNCHANGED
Q9P219	5	4	Protein Daple (Coiled-coil domain-containing protein 88C) (Dvl-associating protein with a high frequency of leucine residues) (hDaple) (Hook-related protein 2) (HKRP2)	CCDC88C	2028	1,334605596	0,416413458	UNCHANGED
P09382	5	3	Galectin-1 (Gal-1) (14 kDa laminin-binding protein) (HLBP14) (14 kDa lectin) (Beta-galactoside-binding lectin L-14-1) (Galaptin) (HBL) (HPL) (Lactose-binding lectin 1) (Lectin galactoside-binding soluble 1) (Putative MAPK-activating protein PM12) (S-Lac lectin 1)	LGALS1	135	1,326964431	0,4081297	UNCHANGED
Q92817	6	2	Envoplakin (210 kDa cornified envelope precursor protein) (210 kDa paraneoplastic pemphigus antigen) (p210)	EVPL	2033	1,300838173	0,379441499	UNCHANGED
P02549	8	6	Spectrin alpha chain, erythrocytic 1 (Erythroid alpha-spectrin)	SPTA1	2419	1,300560388	0,379133389	UNCHANGED
POCG39	32	2	POTE ankyrin domain family member J	POTEJ	1038	1,297109973	0,37533008	UNCHANGED
Q96Q05	7	4	Trafficking protein particle complex subunit 9 (NIK- and IKBKB-binding protein) (Tularik gene 1 protein)	TRAPPC9	1148	1,285345799	0,362156542	UNCHANGED
Q7Z406	5	2	Myosin-14 (Myosin heavy chain 14) (Myosin heavy chain, non-muscle IIc) (Non-muscle myosin heavy chain IIc) (NMHC II-C)	MYH14	1995	1,227972418	0,296278156	UNCHANGED
Q06830	18	3	Peroxiredoxin-1 (EC 1.11.1.15) (Natural killer cell-enhancing factor A) (NKEF-A) (Proliferation-associated gene protein) (PAG) (Thioredoxin peroxidase 2) (Thioredoxin-dependent peroxide reductase 2)	PRDX1	199	1,121108405	0,164925785	UNCHANGED
Q6S8J3	33	1	POTE ankyrin domain family member E (ANKRD26-like family C member 1A) (Prostate, ovary, testis-expressed protein on chromosome 2) (POTE-2)	POTEE	1075	1,100755386	0,138493903	UNCHANGED
Q92547	6	2	DNA topoisomerase 2-binding protein 1 (DNA topoisomerase II-beta-binding protein 1) (TopBP1) (DNA topoisomerase II-binding protein 1)	TOPBP1	1522	1,08545699	0,118302562	UNCHANGED
P38646	12	7	Stress-70 protein, mitochondrial (75 kDa glucose-regulated protein) (GRP-75) (Heat shock 70 kDa protein 9) (Mortalin) (MOT) (Peptide-binding protein 74) (PBP74)	HSPA9	679	1,084564826	0,117116288	UNCHANGED
Q96RL7	4	2	Vacuolar protein sorting-associated protein 13A (Chorea-acanthocytosis protein) (Chorein)	VPS13A	3174	1,080623428	0,111863866	UNCHANGED
Q8NF50	11	6	Dedicator of cytokinesis protein 8	DOCK8	2099	1,058941501	0,082622893	UNCHANGED
Q15049	4	4	Membrane protein MLC1	MLC1	377	0,981189894	-0,02739572	UNCHANGED
E7ETZ7	4	3	Histone-lysine N-methyltransferase 2E	KMT2E	1778	0,979517731	-0,029856487	UNCHANGED

Q15149	73	48	Plectin (PCN) (PLTN) (Hemidesmosomal protein 1) (HD1) (Plectin-1)	PLEC	4684	0,967067773	-0,048311096	UNCHANGED
Q70CQ2	9	6	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 34 (EC 3.4.19.12) (Deubiquitinating enzyme 34) (Ubiquitin thioesterase 34) (Ubiquitin-specific-processing protease 34)	USP34	3546	0,965638045	-0,050445578	UNCHANGED
Q92620	4	2	Pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase PRP16 (EC 3.6.4.13) (ATP-dependent RNA helicase DHX38) (DEAH box protein 38)	DHX38	1227	0,965530266	-0,050946741	UNCHANGED
P30405	5	3	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase F, mitochondrial (PPIase F) (EC 5.2.1.8) (Cyclophilin D) (CypD) (Cyclophilin F) (Mitochondrial cyclophilin) (Cyp-M) (Rotamase F)	PP1F	207	0,938147299	-0,092113636	UNCHANGED
P07205	9	4	Phosphoglycerate kinase 2 (EC 2.7.2.3) (Phosphoglycerate kinase, testis specific)	PGK2	417	0,92586719	-0,111122832	UNCHANGED
P49321	4	2	Nuclear autoantigenic sperm protein (NASP)	NASP	788	0,915746144	-0,126980374	UNCHANGED
P23246	5	3	Splicing factor, proline- and glutamine-rich (100 kDa DNA-pairing protein) (hPOMp100) (DNA-binding p52/p100 complex, 100 kDa subunit) (Polypyrimidine tract-binding protein-associated-splicing factor) (PSF) (PTB-associated-splicing factor)	SFPQ	707	0,902714237	-0,147658734	UNCHANGED
P38159	5	1	RNA-binding motif protein, X chromosome (Glycoprotein p43) (Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G) (hnRNP G) [Cleaved into: RNA-binding motif protein, X chromosome, N-terminally processed]	RBMX	391	0,898991607	-0,153620448	UNCHANGED
G3V5X7	5	2	Telomerase protein component 1	TEP1	2519	0,897681679	-0,155724143	UNCHANGED
P04075	23	16	Fructose-bisphosphate aldolase A (EC 4.1.2.13) (Lung cancer antigen NY-LU-1) (Muscle-type aldolase)	ALDOA	364	0,893732573	-0,162084889	UNCHANGED
K7EJU1	5	2	Glial fibrillary acidic protein (Fragment)	GFAP	248	0,886140437	-0,174392737	UNCHANGED
B4DY08	7	4	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2 (cDNA FLJ53542, highly similar to Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C)	HNRNPC	288	0,880635713	-0,183382742	UNCHANGED
P07954	4	3	Fumarate hydratase, mitochondrial (Fumarase) (EC 4.2.1.2)	FH	510	0,879474341	-0,185286608	UNCHANGED
A1KZ92	4	3	Peroxidasin-like protein (EC 1.11.1.7) (Cardiac peroxidase) (Vascular peroxidase 2) (polysomal ribonuclease 1) (PRM1)	PXDNL	1463	0,877061832	-0,18924954	UNCHANGED
Q9Y520	10	5	Protein PRRC2C (BAT2 domain-containing protein 1) (HBV X-transactivated gene 2 protein) (HBV XAg-transactivated protein 2) (HLA-B-associated transcript 2-like 2) (Proline-rich and coiled-coil-containing protein 2C)	PRRC2C	2896	0,873685985	-0,194813248	UNCHANGED
Q6ZT98	4	2	Tubulin polyglutamylase TTL7 (EC 6.-.-.-) (Testis development protein NYD-SP30) (Tubulin--tyrosine ligase-like protein 7)	TTL7	887	0,873102267	-0,195777447	UNCHANGED
E7EVA0	20	11	Microtubule-associated protein	MAP4	2297	0,871959119	-0,197667597	UNCHANGED

Q5THJ4	10	7	Vacuolar protein sorting-associated protein 13D	VPS13D	4388	0,824394254	-0,278593646	UNCHANGED
P08238	46	13	Heat shock protein HSP 90-beta (HSP 90) (Heat shock 84 kDa) (HSP84)	HSP90AB1	724	0,815486494	-0,294267112	UNCHANGED
Q99996	17	11	A-kinase anchor protein 9 (AKAP-9) (A-kinase anchor protein 350 kDa) (AKAP 350) (hgAKAP 350) (A-kinase anchor protein 450 kDa) (AKAP 450) (AKAP 120-like protein) (Centrosome- and Golgi-localized PKN-associated protein) (CG-NAP) (Protein hyperton) (Protein kinase A-anchoring protein 9) (PRKA9) (Protein yotiao)	AKAP9	3911	0,773204195	-0,37107863	UNCHANGED
P54652	19	5	Heat shock-related 70 kDa protein 2 (Heat shock 70 kDa protein 2)	HSPA2	639	0,756789215	-0,402036566	UNCHANGED
P10809	40	30	60 kDa heat shock protein, mitochondrial (60 kDa chaperonin) (Chaperonin 60) (CPN60) (Heat shock protein 60) (HSP-60) (Hsp60) (HuCHA60) (Mitochondrial matrix protein P1) (P60 lymphocyte protein)	HSPD1	573	0,754291551	-0,406805829	UNCHANGED
Q13535	13	9	Serine/threonine-protein kinase ATR (EC 2.7.11.1) (Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein) (FRAP-related protein 1)	ATR	2644	0,744143857	-0,426346546	UNCHANGED
O15014	5	3	Zinc finger protein 609	ZNF609	1411	0,738119213	-0,438074251	UNCHANGED
Q5T6W2	7	1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (Fragment)	HNRNPK	379	0,736614405	-0,441018485	UNCHANGED
Q96M86	6	4	Dynein heavy chain domain-containing protein 1 (Dynein heavy chain domain 1-like protein) (Protein CCDC35)	DNHDI	4753	0,703791354	-0,506780304	UNCHANGED
Q13838	5	2	Spliceosome RNA helicase DDX39B (EC 3.6.4.13) (56 kDa U2AF65-associated protein) (ATP-dependent RNA helicase p47) (DEAD box protein UAP56) (HLA-B-associated transcript 1 protein)	DDX39B	428	0,702002842	-0,510451224	UNCHANGED
P17480	4	2	Nucleolar transcription factor 1 (Autoantigen NOR-90) (Upstream-binding factor 1) (UBF-1)	UBTF	764	0,701517542	-0,511448916	UNCHANGED
Q99666	6	1	RANBP2-like and GRIP domain-containing protein 5/6 (Ran-binding protein 2-like 1/2) (RanBP2-like 1/2) (RanBP2L1) (RanBP2L2) (Sperm membrane protein BS-63)	RGPD5	1765	0,698746578	-0,517158782	UNCHANGED
Q9NR09	14	6	Baculoviral IAP repeat-containing protein 6 (EC 6.3.2.-) (BIR repeat-containing ubiquitin-conjugating enzyme) (BRUCE) (Ubiquitin-conjugating BIR domain enzyme apollon) (APOLLON)	BIRC6	4857	0,691956429	-0,531246898	UNCHANGED
P58876	19	2	Histone H2B type 1-D (HIRA-interacting protein 2) (Histone H2B-1 B) (Histone H2B.b) (H2B/b)	HIST1H2BD	126	0,688154837	-0,539194882	UNCHANGED
P14625	24	13	Endoplasmic reticulum glucose-regulated protein (GRP-94) (Heat shock protein 90 kDa beta member 1) (Tumor rejection antigen 1) (gp96 homolog)	HSP90B1	803	0,645499163	-0,631512871	UNCHANGED
Q86YP6	5	3	Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1 (Cullin-associated and neddylation-dissociated protein 1) (TBP-interacting protein of 120 kDa A) (TBP-interacting protein 120A) (p120 CAND1)	CAND1	1230	0,612631114	-0,706909454	UNCHANGED

F2Z2U4	15	9	Transformation/transcription domain-associated protein	TRRAP	3848	0,549935726	-0,862665082	UNCHANGED
Q9P2Z5	24	15	Dynein heavy chain 2, axonemal (Axonemal beta dynein heavy chain 2) (Ciliary dynein heavy chain 2) (Dynein heavy chain domain-containing protein 3)	DNAH2	4427	0,539352889	-0,890698583	UNCHANGED
P15144	4	4	Aminopeptidase N (AP-N) (hAPN) (EC 3.4.11.2) (Alanyl aminopeptidase) (Aminopeptidase M) (AP-M) (Microsomal aminopeptidase) (Myeloid plasma membrane glycoprotein CD13) (gp150) (CD antigen CD13)	ANPEP	967	0,518708745	-0,947003402	UNCHANGED
Q9NTJ3	4	3	Structural maintenance of chromosomes protein 4 (SMC protein 4) (SMC-4) (Chromosome-associated polypeptide C) (hCAP-C) (XCAP-C homolog)	SMC4	1288	0,496090788	-1,011323927	DOWN
P08758	5	2	Annexin A5 (Anchoring CII) (Annexin V) (Annexin-5) (Calphobindin I) (CBP-I) (Endonexin II) (Lipocortin V) (Placental anticoagulant protein 4) (PP4) (Placental anticoagulant protein 1) (PAP-I) (Thromboplastin inhibitor) (Vascular anticoagulant-alpha) (VAC-alpha)	ANXA5	320	0,45857996	-1,124754785	DOWN
Q9NYC9	13	8	Dynein heavy chain 9, axonemal (Axonemal beta dynein heavy chain 9) (Ciliary dynein heavy chain 9)	DNAH9	4486	0,420252306	-1,250672359	DOWN
Q15643	4	2	Thyroid receptor-interacting protein 11 (TR-interacting protein 11) (TRIP-11) (Clonal evolution-related gene on chromosome 14 protein) (Golgi-associated microtubule-binding protein 210) (GMAP-210) (Trip230)	TRIP11	1979	0,408869372	-1,2902881	DOWN
G3XAE9	5	3	KIAA0423, isoform CRA_a (Protein FAM179B)	FAM179B	1773	0,389865422	-1,35895189	DOWN
Q81WJ2	10	5	GRIP and coiled-coil domain-containing protein 2 (185 kDa Golgi coiled-coil protein) (GCC185) (CLL-associated antigen KW-11) (CTCL tumor antigen sel-1) (Ran-binding protein 2-like 4) (RanBP2L4) (Renal carcinoma antigen NY-REN-53)	GCC2	1684	0,369850503	-1,434985859	DOWN
P42338	6	4	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit beta isoform (PI3-kinase subunit beta) (PI3K-beta) (PI3Kbeta) (PtdIns-3-kinase subunit beta) (EC 2.7.1.153) (Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase 110 kDa catalytic subunit beta) (PtdIns-3-kinase subunit p110-beta) (p110beta)	PIK3CB	1070	0,369139225	-1,437763047	DOWN
Q14416	5	4	Metabotropic glutamate receptor 2 (mGluR2)	GRM2	872	0,365738601	-1,451115195	DOWN
A0A0C4DGK3	15	7	Nesprin-2	SYNE2	3541	0,351541431	-1,508233367	DOWN
Q709F0	5	2	Acyl-CoA dehydrogenase family member 11 (ACAD-11) (EC 1.3.99.-)	ACAD11	780	0,338133952	-1,564333212	DOWN
Q9UKX2	7	3	Myosin-2 (Myosin heavy chain 2) (Myosin heavy chain 2a) (MyHC-2a) (Myosin heavy chain IIa) (MyHC-IIa) (Myosin heavy chain, skeletal muscle, adult 2)	MYH2	1941	0,320566101	-1,641306224	DOWN
E9PK25	13	7	Cofilin-1	CFL1	204	0,319649432	-1,645437563	DOWN

Q12923	8	4	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 13 (EC 3.1.3.48) (Fas-associated protein-tyrosine phosphatase 1) (FAP-1) (PTP-BAS) (Protein-tyrosine phosphatase 1E) (PTP-E1) (hPTPE1) (Protein-tyrosine phosphatase PTP1)	PTPN13	2485	0,310889044	-1,685528321	DOWN
E9PBC6	21	1	Transforming acidic coiled-coil-containing protein 2	TACC2	2875	0,294985104	-1,761285991	DOWN
P15311	7	5	Ezrin (Cytovillin) (Villin-2) (p81)	EZR	586	0,28627548	-1,804523989	DOWN
P16144	4	4	Integrin beta-4 (GP150) (CD antigen CD104)	ITGB4	1822	0,275780488	-1,858407706	DOWN
P00558	34	25	Phosphoglycerate kinase 1 (EC 2.7.2.3) (Cell migration-inducing gene 10 protein) (Primer recognition protein 2) (PRP 2)	PGK1	417	0,271279349	-1,882148866	DOWN
P78527	9	6	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (DNA-PK catalytic subunit) (DNA-PKcs) (EC 2.7.11.1) (DNPK1) (p460)	PRKDC	4128	0,249833009	-2,000963991	DOWN
E7EMW7	11	9	E3 ubiquitin-protein ligase UBR5	UBR5	2792	0,233008087	-2,101548068	DOWN
Q92954	6	3	Proteoglycan 4 (Lubricin) (Megakaryocyte-stimulating factor) (Superficial zone proteoglycan) [Cleaved into: Proteoglycan 4 C-terminal part]	PRG4	1404	0,2111299412	-2,242639346	DOWN
P04083	8	5	Annexin A1 (Annexin I) (Annexin-1) (Calpactin ID) (Calpactin-2) (Chromobindin-9) (Lipocortin I) (Phospholipase A2 inhibitory protein) (p35)	ANXA1	346	0,20735219	-2,269844811	DOWN
E9PG32	5	2	Dynein heavy chain 12, axonemal	DNAH12	3960	0,176714968	-2,500503855	DOWN
O75643	4	2	U5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa helicase (EC 3.6.4.13) (Activating signal cointegrator 1 complex subunit 3-like 1) (BRR2 homolog) (U5 snRNP-specific 200 kDa protein) (U5-200KD)	SNRNP200	2136	0,172560259	-2,534827851	DOWN
P68133	38	1	Actin, alpha skeletal muscle (Alpha-actin-1)	ACTA1	377	0,171356916	-2,544923672	DOWN
Q12873	5	3	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 3 (CHD-3) (EC 3.6.4.12) (ATP-dependent helicase CHD3) (Mi-2 autoantigen 240 kDa protein) (Mi2-alpha) (Zinc finger helicase) (hZFH)	CHD3	2000	0,16555212	-2,594642612	DOWN
P62937	12	9	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A (PPIase A) (EC 5.2.1.8) (Cyclophilin A) (Cyclosporin A-binding protein) (Rotamase A) [Cleaved into: Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A, N-terminally processed]	PPIA	165	0,157181793	-2,669493984	DOWN
Q8TDM6	5	3	Disks large homolog 5 (Disks large protein P-dlg) (Placenta and prostate DLG)	DLG5	1919	0,139395816	-2,842740835	DOWN
P48643	11	5	T-complex protein 1 subunit epsilon (TCP-1-epsilon) (CCT-epsilon)	CCT5	541	0,110575012	-3,176902694	DOWN

Proteínas super-expressas (*up-regulated-UP*) valor de FoldLog2 > 1; proteínas sub-expressas (*down-regulated-DOWN*) valor de FoldLog2 < -1 e proteínas sem expressão diferencial (*unchanged - UNCHANGED*) valor de FoldLog2 no intervalo -1 < FoldLog2 < 1.

Tabela suplementar 1. Lista de proteínas quantificadas no tratamento com PTC (+) em 48 horas. Do total de 137 proteínas, 05 foram superexpressas (*up-regulated*), 13 subexpressas (*down-regulated*) e 119 não foram diferencialmente expressas (*unchanged*).

Entrada	Peptídeos contados	Peptídeos Únicos	Nomes Proteínas	Gene	Comprimento	FoldChange	FoldLog2	Status
P15311	7	5	Ezrin (Cytovillin) (Villin-2) (p81)	EZR	586	8,889239667	3,152060025	UP
Q13263	8	5	Transcription intermediary factor 1-beta (TIF1-beta) (E3 SUMO-protein ligase TRIM28) (EC 6.3.2.-) (KRAB-associated protein 1) (KAP-1) (KRAB-interacting protein 1) (KRIP-1) (Nuclear corepressor KAP-1) (RING finger protein 96) (Tripartite motif-containing protein 28)	TRIM28	835	7,421831747	2,891775295	UP
A1KZ92	4	3	Peroxidase-like protein (EC 1.1.1.7) (Cardiac peroxidase) (Vascular peroxidase 2) (polysomal ribonuclease 1) (PRM1)	PXDNL	1463	4,648126984	2,216649483	UP
P49321	4	2	Nuclear autoantigenic sperm protein (NASP)	NASP	788	2,151294779	1,105205222	UP
Q9BV73	30	18	Centrosome-associated protein CEP250 (250 kDa centrosomal protein) (Cep250) (Centrosomal Nek2-associated protein 1) (C-Nap1) (Centrosomal protein 2)	CEP250	2442	2,077507816	1,054853905	UP
Q99666	6	1	RANBP2-like and GRIP domain-containing protein 5/6 (Ran-binding protein 2-like 1/2) (RanBP2-like 1/2) (RanBP2L1) (RanBP2L2) (Sperm membrane protein BS-63)	RGPD5	1765	1,978094107	0,984111063	UNCHANGED
Q5TEC6	10	2	Histone H3	HIST2H3PS2	136	1,714054875	0,777413298	UNCHANGED
P04406	33	23	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (EC 1.2.1.12) (Peptidyl-cysteine S-nitrosylase GAPDH) (EC 2.6.99.-)	GAPDH	335	1,649085695	0,721666371	UNCHANGED
Q7Z406	5	2	Myosin-14 (Myosin heavy chain 14) (Myosin heavy chain, non-muscle IIc) (Non-muscle myosin heavy chain IIc) (NMHC II-C)	MYH14	1995	1,640733938	0,71434131	UNCHANGED
P11532	20	11	Dystrophin	DMD	3685	1,584780234	0,664282792	UNCHANGED
Q96T76	4	3	MMS19 nucleotide excision repair protein homolog (hMMS19) (MET18 homolog) (MMS19-like protein)	MMS19	1030	1,545954222	0,628497599	UNCHANGED
Q96RL7	4	2	Vacuolar protein sorting-associated protein 13A (Chorea-acanthocytosis protein) (Chorein)	VPS13A	3174	1,522829713	0,606754625	UNCHANGED
E7EVA0	20	11	Microtubule-associated protein	MAP4	2297	1,501445667	0,586352269	UNCHANGED
Q15643	4	2	Thyroid receptor-interacting protein 11 (TR-interacting protein 11) (TRIP-11) (Clonal evolution-related gene on chromosome 14 protein) (Golgi-associated microtubule-binding protein 210) (GMAP-210) (Trip230)	TRIP11	1979	1,492977648	0,578192566	UNCHANGED
K7EK07	12	1	Histone H3 (Fragment)	H3F3B	132	1,362835	0,446610904	UNCHANGED
Q15049	4	4	Membrane protein MLC1	MLC1	377	1,353630957	0,436834468	UNCHANGED

P10412	9	1	Histone H1.4 (Histone H1b) (Histone H1s-4)	HISTH1E	219	1,352492846	0,435620963	UNCHANGED
Q32Q12	15	12	Nucleoside diphosphate kinase (EC 2.7.4.6)	NME1-NME2	292	1,227158966	0,295322148	UNCHANGED
P09382	5	3	Galectin-1 (Gal-1) (14 kDa laminin-binding protein) (HLBP14) (14 kDa lectin) (Beta-galactoside-binding lectin L-14-I) (Galaptin) (HBL) (HPL) (Lactose-binding lectin 1) (Lectin galactoside-binding soluble 1) (Putative MAPK-activating protein PM12) (S-Lac lectin 1)	LGALS1	135	1,199924308	0,262943403	UNCHANGED
P54652	19	5	Heat shock-related 70 kDa protein 2 (Heat shock 70 kDa protein 2)	HSPA2	639	1,188350158	0,248960002	UNCHANGED
P02549	8	6	Spectrin alpha chain, erythrocytic 1 (Erythroid alpha-spectrin)	SPTA1	2419	1,185839072	0,245908238	UNCHANGED
B4DY08	7	4	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2 (cDNA FLJ53542, highly similar to Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C)	HNRNPC	288	1,181415966	0,240517014	UNCHANGED
P22626	16	10	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 (hnRNP A2/B1)	HNRNPA2B1	353	1,149732856	0,201298685	UNCHANGED
Q92817	6	2	Envoplakin (210 kDa cornified envelope precursor protein) (210 kDa paraneoplastic pemphigus antigen) (p210)	EVPL	2033	1,126626298	0,172009053	UNCHANGED
P42338	6	4	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit beta isoform (PI3-kinase subunit beta) (PI3K-beta) (PI3Kbeta) (PtdIns-3-kinase subunit beta) (EC 2.7.1.153) (Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase 110 kDa catalytic subunit beta) (PtdIns-3-kinase subunit p110-beta) (p110beta)	PIK3CB	1070	1,100894071	0,138675659	UNCHANGED
F8VVM2	4	2	Phosphate carrier protein, mitochondrial	SLC25A3	324	1,100876218	0,138652262	UNCHANGED
J3QKN0	4	3	Polyubiquitin-B (Fragment)	UBB	206	1,085665444	0,118579594	UNCHANGED
Q16777	26	14	Histone H2A type 2-C (Histone H2A-GL101) (Histone H2A/q)	HIST2H2AC	129	1,085418512	0,11825142	UNCHANGED
Q9UG01	8	4	Intraflagellar transport protein 172 homolog	IFT172	1749	1,082415854	0,114254876	UNCHANGED
P30405	5	3	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase F, mitochondrial (PPIase F) (EC 5.2.1.8) (Cyclophilin D) (Cyp-D) (CypD) (Cyclophilin F) (Mitochondrial cyclophilin) (Cyp-M) (Rotamase F)	PPIF	207	1,074914129	0,104221413	UNCHANGED
Q8N2C7	5	3	Protein unc-80 homolog	UNC80	3258	1,0740879	0,103112064	UNCHANGED
Q9P225	24	15	Dynein heavy chain 2, axonemal (Axonemal beta dynein heavy chain 2) (Ciliary dynein heavy chain 2) (Dynein heavy chain domain-containing protein 3)	DNAH2	4427	1,070580469	0,098393238	UNCHANGED
Q12873	5	3	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 3 (CHD-3) (EC 3.6.4.12) (ATP-dependent helicase CHD3) (Mi-2 autoantigen 240 kDa protein) (Mi2-alpha) (Zinc finger helicase) (hZFH)	CHD3	2000	1,059956567	0,084005149	UNCHANGED
Q9BUIF5	11	1	Tubulin beta-6 chain (Tubulin beta class V)	TUBB6	446	1,058474452	0,081986448	UNCHANGED
Q12923	8	4	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 13 (EC 3.1.3.48) (Fas-associated protein-tyrosine phosphatase 1) (FAP-1) (PTP-	PTPN13	2485	1,053094087	0,074634337	UNCHANGED

H7BY63	4	2	BAS) (Protein-tyrosine phosphatase 1E) (PTP-E1) (hPTPE1) (Protein-tyrosine phosphatase PTPL1)	FAM184A	936	1,036350044	0,051511379	UNCHANGED
Q9HCK8	4	3	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 8 (CHD-8) (EC 3.6.4.12) (ATP-dependent helicase CHD8) (Helicase with SNF2 domain 1)	CHD8	2581	1,034815089	0,049372995	UNCHANGED
Q5VT06	11	7	Centrosome-associated protein 350 (Cep350) (Centrosome-associated protein of 350 kDa)	CEP350	3117	1,033454624	0,047475046	UNCHANGED
Q2MIP5	6	3	Kinesin-like protein KIF7	KIF7	1343	1,02879841	0,040960318	UNCHANGED
E9PK25	13	7	Cofilin-1	CFL1	204	1,022882221	0,032640036	UNCHANGED
Q9UIKX2	7	3	Myosin-2 (Myosin heavy chain 2) (Myosin heavy chain 2a) (MyHC-2a) (Myosin heavy chain IIa) (MyHC-IIa) (Myosin heavy chain, skeletal muscle, adult 2)	MYH2	1941	1,011099156	0,015924485	UNCHANGED
P07205	9	4	Phosphoglycerate kinase 2 (EC 2.7.2.3) (Phosphoglycerate kinase, testis specific)	PGK2	417	1,009217683	0,01323739	UNCHANGED
Q14315	5	4	Filamin-C (FLN-C) (FLNc) (ABP-280-like protein) (ABP-L) (Actin-binding-like protein) (Filamin-2) (Gamma-filamin)	FLNC	2725	1,004419088	0,006361351	UNCHANGED
P31942	4	3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3 (hnRNP H3) (Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein 2H9) (hnRNP 2H9) 60 kDa heat shock protein, mitochondrial (60 kDa chaperonin)	HNRNPH3	346	1,00123837	0,001785485	UNCHANGED
P10809	40	30	(Chaperonin 60) (CPN60) (Heat shock protein 60) (HSP-60) (Hsp60) (HuCHA60) (Mitochondrial matrix protein P1) (P60 lymphocyte protein)	HSPD1	573	1,00071332	0,001028737	UNCHANGED
Q6ZT98	4	2	Tubulin polyglutamylase TTLL7 (EC 6.-.-.-) (Testis development protein NYD-SP30) (Tubulin--tyrosine ligase-like protein 7)	TTLL7	887	0,997320892	-0,003870323	UNCHANGED
Q7Z6Z7	10	8	E3 ubiquitin-protein ligase HUWE1 (EC 6.3.2.-) (ARF-binding protein 1) (ARF-BP1) (HECT, UBA and WWE domain-containing protein 1) (Homologous to E6AP carboxyl terminus homologous protein 9) (HectH9) (Large structure of URB1) (LASU1) (Mcl-1 ubiquitin ligase E3) (Mule) (Upstream regulatory element-binding protein 1) (URE-B1) (URE-binding protein 1)	HUWE1	4374	0,994867815	-0,007423243	UNCHANGED
P38646	12	7	Stress-70 protein, mitochondrial (75 kDa glucose-regulated protein) (GRP-75) (Heat shock 70 kDa protein 9) (Mortalin) (MOT) (Peptide-binding protein 74) (PBP74)	HSPA9	679	0,994798255	-0,007524118	UNCHANGED
O15014	5	3	Zinc finger protein 609	ZNF609	1411	0,994229298	-0,008349477	UNCHANGED
Q92620	4	2	Pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase PRP16 (EC 3.6.4.13) (ATP-dependent RNA helicase DHX38) (DEAH box protein 38)	DHX38	1227	0,992217894	-0,011271119	UNCHANGED
P68133	38	1	Actin, alpha skeletal muscle (Alpha-actin-1)	ACTA1	377	0,991650382	-0,012096523	UNCHANGED

P07954	4	3	Fumarate hydratase, mitochondrial (Fumarase) (EC 4.2.1.2)	FH	510	0,98802652	-0,017378328	UNCHANGED
P16144	4	4	Integrin beta-4 (GPI50) (CD antigen CD104)	ITGB4	1822	0,987737176	-0,017800884	UNCHANGED
Q4G0P3	17	13	Hydrocephalus-inducing protein homolog	HYDIN	5121	0,986824563	-0,019134468	UNCHANGED
E7EMW7	11	9	E3 ubiquitin-protein ligase UBR5	UBR5	2792	0,984562349	-0,022445524	UNCHANGED
A0A087WT T1	5	2	Polyadenylate-binding protein (PABP)	PABPC1	522	0,975092277	-0,036389341	UNCHANGED
G3V5X7	5	2	Telomerase protein component 1	TEP1	2519	0,968031893	-0,046873516	UNCHANGED
Q13535	13	9	Serine/threonine-protein kinase ATR (EC 2.7.11.1) (Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein) (FRAP-related protein 1)	ATR	2644	0,967412669	-0,047796663	UNCHANGED
Q96M86	6	4	Dynein heavy chain domain-containing protein 1 (Dynein heavy chain domain 1-like protein) (Protein CCDC35)	DNHDI	4753	0,966624359	-0,048972744	UNCHANGED
A0A0C4DG 17	5	5	40S ribosomal protein SA (37 kDa laminin receptor precursor) (37/67 kDa laminin receptor) (67 kDa laminin receptor) (Laminin receptor 1) (Laminin-binding protein precursor p40)	RPSA	300	0,962084266	-0,055764835	UNCHANGED
H0YNP5	12	1	Annexin (Fragment)	ANXA2	175	0,95989542	-0,05905086	UNCHANGED
Q6S8J3	33	1	POTE ankyrin domain family member E (ANKRD26-like family C member 1A) (Prostate, ovary, testis-expressed protein on chromosome 2) (POTE-2)	POTEE	1075	0,95631713	-0,064438976	UNCHANGED
Q13838	5	2	Spliceosome RNA helicase DDX39B (EC 3.6.4.13) (56 kDa U2AF65-associated protein) (ATP-dependent RNA helicase p47) (DEAD box protein UAP56) (HLA-B-associated transcript 1 protein)	DDX39B	428	0,955471195	-0,065715715	UNCHANGED
P11137	12	7	Microtubule-associated protein 2 (MAP-2)	MAP2	1827	0,955417296	-0,0657971	UNCHANGED
P78527	9	6	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (DNA-PK catalytic subunit) (DNA-PKcs) (EC 2.7.11.1) (DNPK1) (p460)	PRKDC	4128	0,953808431	-0,06822856	UNCHANGED
B1AJZ9	6	1	Forkhead-associated domain-containing protein 1 (FHA domain-containing protein 1)	FHAD1	1412	0,952410022	-0,070345293	UNCHANGED
Q8NF50	11	6	Dedicator of cytokinesis protein 8	DOCK8	2099	0,949193846	-0,075225348	UNCHANGED
P14625	24	13	Endoplasmic (94 kDa glucose-regulated protein) (GRP-94) (Heat shock protein 90 kDa beta member 1) (Tumor rejection antigen 1) (gp96 homolog)	HSP90B1	803	0,948479321	-0,076311775	UNCHANGED
P61978	7	1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP K) (Transformation up-regulated nuclear protein) (TUNP)	HNRNPK	463	0,947539937	-0,077741344	UNCHANGED
P00558	34	25	Phosphoglycerate kinase 1 (EC 2.7.2.3) (Cell migration-inducing gene 10 protein) (Primer recognition protein 2) (PRP 2)	PGK1	417	0,946394883	-0,079485822	UNCHANGED
P07237	5	4	Protein disulfide-isomerase (PDI) (EC 5.3.4.1) (Cellular thyroid hormone-binding protein) (Prolyl 4-hydroxylase subunit beta) (p55)	P4HIB	508	0,945924214	-0,080203493	UNCHANGED

P0DMV8	19	9	Heat shock 70 kDa protein 1A (Heat shock 70 kDa protein 1) (HSP70-1) (HSP70.1)	HSPA1A	641	0,939607663	-0,089869615	UNCHANGED
Q9Y520	10	5	Protein PRRC2C (BAT2 domain-containing protein 1) (HBV X-transactivated gene 2 protein) (HBV XAg-transactivated protein 2) (HLA-B-associated transcript 2-like 2) (Proline-rich and coiled-coil-containing protein 2C)	PRRC2C	2896	0,93774717	-0,092729091	UNCHANGED
Q96J17	10	6	Spatacsin (Colorectal carcinoma-associated protein) (Spastic paraplegia 11 protein)	SPG11	2443	0,935939864	-0,095512258	UNCHANGED
Q13315	16	12	Serine-protein kinase ATM (EC 2.7.11.1) (Ataxia telangiectasia mutated) (A-T mutated)	ATM	3056	0,934630185	-0,097532463	UNCHANGED
P58876	19	2	Histone H2B type 1-D (HIRA-interacting protein 2) (Histone H2B.1 B) (Histone H2B.b) (H2B/b)	HIST1H2BD	126	0,927691675	-0,1082827	UNCHANGED
Q70CQ2	9	6	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 34 (EC 3.4.19.12) (Deubiquitinating enzyme 34) (Ubiquitin thioesterase 34) (Ubiquitin-specific-processing protease 34)	USP34	3546	0,924877705	-0,112665481	UNCHANGED
Q8WUM4	5	4	Programmed cell death 6-interacting protein (PDCD6-interacting protein) (ALG-2-interacting protein 1) (ALG-2-interacting protein X) (Hp95)	PDCD6IP	868	0,924062267	-0,113938025	UNCHANGED
P07737	8	4	Profilin-1 (Epididymis tissue protein Li 184a) (Profilin I)	PFN1	140	0,923147482	-0,115366943	UNCHANGED
Q9UPV9	6	4	Trafficking kinesin-binding protein 1 (106 kDa O-GlcNAc transferase-interacting protein)	TRAK1	953	0,921566055	-0,117840518	UNCHANGED
Q92547	6	2	DNA topoisomerase 2-binding protein 1 (DNA topoisomerase II-beta-binding protein 1) (TopBP1) (DNA topoisomerase II-binding protein 1)	TOPBP1	1522	0,921144367	-0,118500814	UNCHANGED
P15144	4	4	Aminopeptidase N (AP-N) (hAPN) (EC 3.4.11.2) (Alanyl aminopeptidase) (Aminopeptidase M) (AP-M) (Microsomal aminopeptidase) (Myeloid plasma membrane glycoprotein CD13) (gp150) (CD antigen CD13)	ANPEP	967	0,92009545	-0,120144562	UNCHANGED
Q9NR09	14	6	Baculoviral IAP repeat-containing protein 6 (EC 6.3.2.-) (BIR repeat-containing ubiquitin-conjugating enzyme) (BRUCE) (Ubiquitin-conjugating BIR domain enzyme apollon) (APOLLON)	BIRC6	4857	0,915961868	-0,126640556	UNCHANGED
P62937	12	9	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A (PPIase A) (EC 5.2.1.8) (Cyclophilin A) (Cyclosporin A-binding protein) (Rotamase A) [Cleaved into: Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A, N-terminally processed]	PPIA	165	0,911566811	-0,133579695	UNCHANGED
Q8TDM6	5	3	Disks large homolog 5 (Disks large protein P-dlg) (Placenta and prostate DLG)	DLG5	1919	0,908417285	-0,138572937	UNCHANGED
P18615	6	3	Negative elongation factor E (NELF-E) (RNA-binding protein RD)	NELFE	380	0,903533989	-0,146349222	UNCHANGED
G3XAE9	5	3	KIAA0423, isoform CRA_a (Protein FAMI79B)	FAMI79B	1773	0,903309026	-0,146708471	UNCHANGED
O75643	4	2	U5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa helicase (EC 3.6.4.13)	SNRNP200	2136	0,901012383	-0,150381162	UNCHANGED

P08238	46	13	(Activating signal cointegrator 1 complex subunit 3-like 1) (BRR2 homolog) (U5 snRNP-specific 200 kDa protein) (U5-200KD)	HSP90AB1	724	0,900939427	-0,150497983	UNCHANGED
P48643	11	5	Heat shock protein HSP 90-beta (HSP 90) (Heat shock 84 kDa) (HSP 84) (HSP84)	CCT5	541	0,897137904	-0,156598329	UNCHANGED
P17987	4	4	T-complex protein 1 subunit epsilon (TCP-1-epsilon)(CCT-epsilon)	TCPI	556	0,896791782	-0,157155038	UNCHANGED
P26038	12	6	Moessin (Membrane-organizing extension spike protein)	MSN	577	0,893319258	-0,162752231	UNCHANGED
Q15149	73	48	Plectin (PCN) (PLTN) (Hemidesmosomal protein 1) (HD1) (Plectin-1)	PLEC	4684	0,892666089	-0,163807474	UNCHANGED
Q5T200	22	12	Zinc finger CCCH domain-containing protein 13	ZC3H13	1668	0,887219479	-0,172637055	UNCHANGED
Q8WYP5	7	5	Protein ELYS (Embryonic large molecule derived from yolk sac) (Protein MEL-28) (Putative AT-hook-containing transcription factor 1)	AHCTF1	2266	0,886160603	-0,174359906	UNCHANGED
Q8NI35	6	2	InaD-like protein (Inadl protein) (hINADL) (Pals1-associated tight junction protein) (Protein associated to tight junctions)	INADL	1801	0,879433912	-0,185352929	UNCHANGED
Q99996	17	11	A-kinase anchor protein 9 (AKAP-9) (A-kinase anchor protein 350 kDa) (AKAP 350) (hgAKAP 350) (A-kinase anchor protein 450 kDa) (AKAP 450) (AKAP 120-like protein) (Centrosome- and Golgi-localized PKN-associated protein) (CG-NAP) (Protein hyperion) (Protein kinase A-anchoring protein 9) (PRK-A9) (Protein yotiao)	AKAP9	3911	0,878890315	-0,186244965	UNCHANGED
Q5THJ4	10	7	Vacuolar protein sorting-associated protein 13D	VPS13D	4388	0,874867026	-0,192864341	UNCHANGED
Q9P2N2	4	3	Rho GTPase-activating protein 28 (Rho-type GTPase-activating protein 28)	ARHGAP28	729	0,873596245	-0,194961441	UNCHANGED
Q96Q05	7	4	Trafficking protein particle complex subunit 9 (NIK- and IKKB-binding protein) (Tularik gene 1 protein)	TRAPPC9	1148	0,870054404	-0,200822248	UNCHANGED
Q92954	6	3	Proteoglycan 4 (Lubricin) (Megakaryocyte-stimulating factor) (Superficial zone proteoglycan) [Cleaved into: Proteoglycan 4 C-terminal part]	PRG4	1404	0,868907341	-0,202725756	UNCHANGED
A0A0C4DGK3	15	7	Nesprin-2	SYNE2	3541	0,864297246	-0,210400532	UNCHANGED
P0CG39	32	2	POTE ankyrin domain family member J	POTEJ	1038	0,862483988	-0,213430421	UNCHANGED
P63261	60	9	Actin, cytoplasmic 2 (Gamma-actin) [Cleaved into: Actin, cytoplasmic 2, N-terminally processed]	ACTG1	375	0,857813193	-0,22126459	UNCHANGED
M0QXS5	4	3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L (Fragment)	HNRNPL	530	0,857505629	-0,221781953	UNCHANGED
E7EPU2	6	4	Disco-interacting protein 2 homolog C	DIP2C	1537	0,857026576	-0,222588153	UNCHANGED
Q5T6W2	7	1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (Fragment)	HNRNPK	379	0,855866993	-0,224541485	UNCHANGED

P08758	5	2	Annexin A5 (Anchoring CII) (Annexin V) (Annexin-5) (Calphobindin I) (CBP-I) (Endonexin II) (Lipocortin V) (Placental anticoagulant protein 4) (PP4) (Placental anticoagulant protein I) (PAP-I) (Thromboplastin inhibitor) (Vascular anticoagulant-alpha) (VAC-alpha)	ANXA5	320	0,85563427	-0,224933829	UNCHANGED
O14795	7	4	Protein unc-13 homolog B (Munc13-2) (munc13)	UNC13B	1591	0,849487118	-0,235336025	UNCHANGED
E7ETZ7	4	3	Histone-lysine N-methyltransferase 2E	KMT2E	1778	0,844225631	-0,2442299464	UNCHANGED
Q9P219	5	4	Protein Daple (Coiled-coil domain-containing protein 88C) (Dvl-associating protein with a high frequency of leucine residues) (hdDaple) (Hook-related protein 2) (HkRP2)	CCDC88C	2028	0,836551547	-0,257473655	UNCHANGED
Q06830	18	3	Peroxioredoxin-1 (EC 1.11.1.15) (Natural killer cell-enhancing factor A) (NKEF-A) (Proliferation-associated gene protein) (PAG) (Thioredoxin peroxidase 2) (Thioredoxin-dependent peroxide reductase 2)	PRDX1	199	0,831023912	-0,267038104	UNCHANGED
Q9NYC9	13	8	Dynein heavy chain 9, axonemal (Axonemal beta dynein heavy chain 9) (Ciliary dynein heavy chain 9)	DNAH9	4486	0,829845053	-0,26908611	UNCHANGED
E9PG32	5	2	Dynein heavy chain 12, axonemal	DNAH12	3960	0,822985458	-0,281061156	UNCHANGED
Q12802	9	4	A-kinase anchor protein 13 (AKAP-13) (AKAP-Lbc) (Breast cancer nuclear receptor-binding auxiliary protein) (Guanine nucleotide exchange factor Lbc) (Human thyroid-anchoring protein 31) (Lymphoid blast crisis oncogene) (LBC oncogene) (Non-oncogenic Rho GTPase-specific GTP exchange factor) (Protein kinase A-anchoring protein 13) (PRKAL3) (p47)	AKAP13	2813	0,822639378	-0,281667963	UNCHANGED
Q86VP6	5	3	Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1 (Cullin-associated and neddylation-dissociated protein 1) (TBP-interacting protein of 120 kDa A) (TBP-interacting protein 120A) (p120 CAND1)	CAND1	1230	0,804385423	-0,314041158	UNCHANGED
P17480	4	2	Nucleolar transcription factor 1 (Autoantigen NOR-90) (Upstream-binding factor 1) (UBF-1)	UBTF	764	0,790672437	-0,3388847962	UNCHANGED
Q9NTJ3	4	3	Structural maintenance of chromosomes protein 4 (SMC protein 4) (SMC-4) (Chromosome-associated polypeptide C) (hCAP-C) (XCAP-C homolog)	SMC4	1288	0,763870973	-0,388599125	UNCHANGED
K7EJU1	5	2	Glial fibrillary acidic protein (Fragment)	GFAP	248	0,760022703	-0,395885581	UNCHANGED
E7EPJ7	8	7	Triple functional domain protein (Fragment)	TRIO	2546	0,75797244	-0,399782702	UNCHANGED
Q8IWJ2	10	5	GRIP and coiled-coil domain-containing protein 2 (185 kDa Golgi coiled-coil protein) (GCC185) (CLL-associated antigen KW-11) (CTCL tumor antigen se1-1) (Ran-binding protein 2-like 4) (RanBP2L4) (Renal carcinoma antigen NY-REN-53)	GCC2	1684	0,733887443	-0,446369283	UNCHANGED
P38159	5	1	RNA-binding motif protein, X chromosome (Glycoprotein p43) (Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G) (hnRNP G) [Cleaved into: RNA-binding motif protein, X chromosome, N-terminally	RBMX	391	0,718929818	-0,476077153	UNCHANGED

processed]									
Q709F0	5	2	Acyl-CoA dehydrogenase family member 11 (ACAD-11) (EC 1.3.99.-)	ACAD11	780	0,654434508	-0,611679271	UNCHANGED	
Q86UP2	5	2	Kinectin (CG-1 antigen) (Kinesin receptor)	KTNI	1357	0,647545236	-0,626947116	UNCHANGED	
Q86XA9	8	3	HEAT repeat-containing protein 5A	HEATR5A	2040	0,496080389	-1,011354169	DOWN	
P06733	47	32	Alpha-enolase (EC 4.2.1.1) (2-phospho-D-glycerate hydro-lyase) (C-myc promoter-binding protein) (Enolase 1) (MBP-1) (MPB-1) (Non-neural enolase) (NNE) (Phosphopyruvate hydratase) (Plasminogen-binding protein)	ENO1	434	0,46829407	-1,094513324	DOWN	
E9PBC6	21	1	Transforming acidic coiled-coil-containing protein 2	TACC2	2875	0,461991701	-1,114061159	DOWN	
P04083	8	5	Annexin A1 (Annexin I) (Annexin-1) (Calpactin II) (Calpactin-2) (Chromobindin-9) (Lipocortin I) (Phospholipase A2 inhibitory protein) (p35)	ANXA1	346	0,412894336	-1,276155465	DOWN	
Q9C0D5	4	3	Protein TANC1 (Tetraatricopeptide repeat, ankyrin repeat and coiled-coil domain-containing protein 1)	TANC1	1861	0,288630144	-1,792706116	DOWN	
Q96JB5	4	2	CDK5 regulatory subunit-associated protein 3 (CDK5 activator-binding protein C53) (LXXLL/leucine-zipper-containing ARF-binding protein) (Protein HSF-27)	CDK5RAP3	506	0,151880608	-2,718990414	DOWN	
Q71DI3	12	1	Histone H3.2 (Histone H3(m) (Histone H3(o))	HIST2H3A	136	0,150959921	-2,727762525	DOWN	
P23246	5	3	Splicing factor, proline- and glutamine-rich (100 kDa DNA-pairing protein) (hPOMp100) (DNA-binding p52/p100 complex, 100 kDa subunit) (Polypyrimidine tract-binding protein-associated-splicing factor) (PSF) (PTB-associated-splicing factor)	SFPQ	707	0,12545358	-2,994774454	DOWN	
P17066	15	4	Heat shock 70 kDa protein 6 (Heat shock 70 kDa protein B)	HSPA6	643	0,124918671	-3,000938973	DOWN	
Q14416	5	4	Metabotropic glutamate receptor 2 (mGluR2)	GRM2	872	0,115479059	-3,114296841	DOWN	
F2Z2U4	15	9	Transformation/transcription domain-associated protein	TRRAP	3848	0,099107198	-3,334866341	DOWN	
P04075	23	16	Fructose-bisphosphate aldolase A (EC 4.1.2.13) (Lung cancer antigen NY-LU-1) (Muscle-type aldolase)	ALDOA	364	0,086732742	-3,527279469	DOWN	
P14618	35	22	Pyruvate kinase PKM (EC 2.7.1.40) (Cytosolic thyroid hormone-binding protein) (CTHBP) (Opa-interacting protein 3) (OIP-3) (Pyruvate kinase 2/3) (Pyruvate kinase muscle isozyme) (Thyroid hormone-binding protein 1) (THBP1) (Tumor M2-PK) (p58)	PKM	531	0,009347161	-6,741255985	DOWN	

Proteínas super-expressas (*up-regulated- UP*) valor de FoldLog2 > 1; proteínas sub-expressas (*down-regulated- DOWN*) valor de FoldLog2 < -1 e proteínas sem expressão diferencial (*unchanged - UNCHANGED*) valor de FoldLog2 no intervalo -1 < FoldLog2 < 1.

Tabela suplementar 2. Lista de proteínas quantificadas no tratamento com MON em 24 horas. Do total de 137 proteínas, 13 foram superexpressas (*up-regulated*), 16 subexpressas (*down-regulated*) e 108 não foram diferencialmente expressas (*unchanged*).

Entrada	Peptídeos contados	Peptídeos Únicos	Nomes Proteínas	Gene	Comprimento	FoldChange	FoldLog2	Status
Q9P2N2	4	3	Rho GTPase-activating protein 28 (Rho-type GTPase-activating protein 28)	ARHGAP28	729	5,817262304	2,540340358	UP
Q13263	8	5	Transcription intermediary factor 1-beta (TIF1-beta) (E3 SUMO-protein ligase TRIM28) (EC 6.3.2.-) (KRAB-associated protein 1) (KAP-1) (KRAB-interacting protein 1) (KRIP-1) (Nuclear corepressor KAP-1) (RING finger protein 96) (Tripartite motif-containing protein 28)	TRIM28	835	5,442957762	2,444390841	UP
P0DMV8	19	9	Heat shock 70 kDa protein 1A (Heat shock 70 kDa protein 1) (HSP70-1) (HSP70.1)	HSPA1A	641	4,040251504	2,014445103	UP
Q9BV73	30	18	Centrosome-associated protein CEP250 (250 kDa centrosomal protein) (Cep250) (Centrosomal Nek2-associated protein 1) (C-Nap1) (Centrosomal protein 2)	CEP250	2442	3,783710143	1,919801573	UP
P63261	60	9	Actin, cytoplasmic 2 (Gamma-actin) [Cleaved into: Actin, cytoplasmic 2, N-terminally processed]	ACTG1	375	2,774906856	1,472439346	UP
H0YNP5	12	1	Annexin (Fragment)	ANXA2	175	2,690781469	1,428025227	UP
P15311	7	5	Ezrin (Cytrovillin) (Villin-2) (p81)	EZR	586	2,497486405	1,320476825	UP
Q9C0D5	4	3	Protein TANC1 (Tetratricopeptide repeat, ankyrin repeat and coiled-coil domain-containing protein 1)	TANC1	1861	2,495491063	1,319323737	UP
O14795	7	4	Protein unc-13 homolog B (Munc13-2) (munc13)	UNC13B	1591	2,344631018	1,229360899	UP
Q9P219	5	4	Protein Daple (Coiled-coil domain-containing protein 88C) (Dvl-associating protein with a high frequency of leucine residues) (hDaple) (Hook-related protein 2) (HkRP2)	CCDC88C	2028	2,23067267	1,157478827	UP
Q92954	6	3	Proteoglycan 4 (Lubricin) (Megakaryocyte-stimulating factor) (Superficial zone proteoglycan) [Cleaved into: Proteoglycan 4 C-terminal part]	PRG4	1404	2,150618147	1,10475139	UP
Q71DI3	12	1	Histone H3.2 (Histone H3/m) (Histone H3/o)	HIST2H3A	136	2,052910415	1,037670672	UP
P22626	16	10	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 (hnRNP A2/B1)	HNRNPA2B1	353	2,001191221	1,000859029	UP
Q9NTJ3	4	3	Structural maintenance of chromosomes protein 4 (SMC protein 4) (SMC-4) (Chromosome-associated polypeptide C) (hCAP-C) (XCAP-C homolog)	SMC4	1288	1,957162922	0,968763856	UNCHANGED
P11137	12	7	Microtubule-associated protein 2 (MAP-2)	MAP2	1827	1,83582545	0,876428894	UNCHANGED
Q14315	5	4	Filamin-C (FLN-C) (FLNc) (ABP-280-like protein) (ABP-L) (Actin-binding-like protein) (Filamin-2) (Gamma-filamin)	FLNC	2725	1,777061151	0,829493327	UNCHANGED

A0A087WTT1	5	2	Polyadenylate-binding protein (PABP)	PABPC1	522	1,776725428	0,829220747	UNCHANGED
Q6S8J3	33	1	POTE ankyrin domain family member E (ANKRD26-like family C member 1A) (Prostate, ovary, testis-expressed protein on chromosome 2) (POTE-2)	POTEE	1075	1,676038534	0,745055318	UNCHANGED
E7EVA0	20	11	Microtubule-associated protein	MAP4	2297	1,586823578	0,66614174	UNCHANGED
Q9BUF5	11	1	Tubulin beta-6 chain (Tubulin beta class V)	TUBB6	446	1,546068766	0,628604489	UNCHANGED
Q8N2C7	5	3	Protein unc-80 homolog	UNC80	3258	1,485722718	0,571164889	UNCHANGED
P14618	35	22	Pyruvate kinase PKM (EC 2.7.1.40) (Cytosolic thyroid hormone-binding protein) (CTHBP) (Opa-interacting protein 3) (OIP-3) (Pyruvate kinase 2/3) (Pyruvate kinase muscle isozyme) (Thyroid hormone-binding protein 1) (THBP1) (Tumor M2-PK) (p58)	PKM	531	1,483560092	0,569063365	UNCHANGED
K7EJU1	5	2	Glial fibrillary acidic protein (Fragment)	GFAP	248	1,475978334	0,561671544	UNCHANGED
Q8WUM4	5	4	Programmed cell death 6-interacting protein (PDCD6-interacting protein) (ALG-2-interacting protein 1) (ALG-2-interacting protein X) (Hp95)	PDCD6IP	868	1,466288066	0,552168562	UNCHANGED
E7ETZ7	4	3	Histone-lysine N-methyltransferase 2E	KMT2E	1778	1,460857416	0,546815374	UNCHANGED
P17987	4	4	T-complex protein 1 subunit alpha (TCP-1-alpha) (CCT-alpha)	TCPI	556	1,460251615	0,54621698	UNCHANGED
Q12923	8	4	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 13 (EC 3.1.3.48) (Fas-associated protein-tyrosine phosphatase 1) (FAP-1) (PTP-BAS) (Protein-tyrosine phosphatase 1E) (PTP-E1) (hPTPE1) (Protein-tyrosine phosphatase PTPL1)	PTPN13	2485	1,450270532	0,536322044	UNCHANGED
Q13315	16	12	Serine-protein kinase ATM (EC 2.7.11.1) (Ataxia telangiectasia mutated) (A-T mutated)	ATM	3056	1,436019386	0,522075225	UNCHANGED
B1AJZ9	6	1	Forkhead-associated domain-containing protein 1 (FHA domain-containing protein 1)	FHAD1	1412	1,415398344	0,501208137	UNCHANGED
K7EK07	12	1	Histone H3 (Fragment)	H3F3B	132	1,383359936	0,46817658	UNCHANGED
E7EMW7	11	9	E3 ubiquitin-protein ligase UBR5	UBR5	2792	1,3656976	0,44963807	UNCHANGED
F8VVM2	4	2	Phosphate carrier protein, mitochondrial	SLC25A3	324	1,356007227	0,439304868	UNCHANGED
P18615	6	3	Negative elongation factor E (NELF-E) (RNA-binding protein RD)	NELFE	380	1,317148906	0,397418454	UNCHANGED
MOQX55	4	3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L (Fragment)	HNRNPL	530	1,31649357	0,396700475	UNCHANGED
Q92817	6	2	Envoplakin (210 kDa cornified envelope precursor protein) (210 kDa paraneoplastic pemphigus antigen) (p210)	EVPL	2033	1,300645596	0,379227905	UNCHANGED
Q32Q12	15	12	Nucleoside diphosphate kinase (EC 2.7.4.6)	NME1-NME2	292	1,271980862	0,347076964	UNCHANGED
Q8NI35	6	2	InaD-like protein (InaD protein) (hINADL) (Pals1-associated tight junction protein) (Protein associated to tight junctions)	INADL	1801	1,267395777	0,341867114	UNCHANGED

Q92547	6	2	DNA topoisomerase 2-binding protein 1 (DNA topoisomerase II-beta-binding protein 1) (TopBP1) (DNA topoisomerase II-binding protein 1)	TOPBP1	1522	1,262895011	0,336734707	UNCHANGED
Q7Z6Z7	10	8	E3 ubiquitin-protein ligase HUWE1 (EC 6.3.2.-) (ARF-binding protein 1) (ARF-BP1) (HECT, UBA and WWE domain-containing protein 1) (Homologous to E6AP carboxyl terminus homologous protein 9) (HectH9) (Large structure of URB1) (LASU1) (Mcl-1 ubiquitin ligase E3) (Mule) (Upstream regulatory element-binding protein 1) (URE-B1) (URE-binding protein 1)	HUWE1	4374	1,247947653	0,31955742	UNCHANGED
Q12873	5	3	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 3 (CHD-3) (EC 3.6.4.12) (ATP-dependent helicase CHD3) (Mi-2 autoantigen 240 kDa protein) (Mi2-alpha) (Zinc finger helicase) (hZFH)	CHD3	2000	1,247263647	0,318766455	UNCHANGED
Q81WJ2	10	5	GRIP and coiled-coil domain-containing protein 2 (185 kDa Golgi coiled-coil protein) (GCC185) (CLL-associated antigen KW-11) (CTCL tumor antigen se1-1) (Ran-binding protein 2-like 4) (RanBP2L4) (Renal carcinoma antigen NY-REN-53)	GCC2	1684	1,232326262	0,301384264	UNCHANGED
Q5T200	22	12	Zinc finger CCCH domain-containing protein 13	ZC3H13	1668	1,22204198	0,289293846	UNCHANGED
P16144	4	4	Integrin beta-4 (GP150) (CD antigen CD104)	ITGB4	1822	1,221717837	0,288911124	UNCHANGED
P61978	7	1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP K) (Transformation up-regulated nuclear protein) (TUNP)	HNRNPK	463	1,216676487	0,282945608	UNCHANGED
Q9HCK8	4	3	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 8 (CHD-8) (EC 3.6.4.12) (ATP-dependent helicase CHD8) (Helicase with SNF2 domain 1)	CHD8	2581	1,181825516	0,241017052	UNCHANGED
H7BY63	4	2	Protein FAM184A	FAM184A	936	1,175615797	0,233416651	UNCHANGED
B4DY08	7	4	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2 (cDNA FLJ53542, highly similar to Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C)	HNRNPC	288	1,168513508	0,224674412	UNCHANGED
P07237	5	4	Protein disulfide-isomerase (PDI) (EC 5.3.4.1) (Cellular thyroid hormone-binding protein) (Prolyl 4-hydroxylase subunit beta) (p55)	P4HB	508	1,166131653	0,221730673	UNCHANGED
Q2MIP5	6	3	Kinesin-like protein KIF7	KIF7	1343	1,149832785	0,201424072	UNCHANGED
P07205	9	4	Phosphoglycerate kinase 2 (EC 2.7.2.3) (Phosphoglycerate kinase, testis specific)	PGK2	417	1,143690458	0,193696637	UNCHANGED
P06733	47	32	Alpha-enolase (EC 4.2.1.11) (2-phospho-D-glycerate hydro-lyase) (C-myc promoter-binding protein) (Enolase 1) (MBP-1) (MPB-1) (Non-neural enolase) (NNE) (Phosphopyruvate hydratase) (Plasminogen-binding protein)	ENO1	434	1,142716959	0,192468105	UNCHANGED
P23246	5	3	Splicing factor, proline- and glutamine-rich (100 kDa DNA-pairing protein) (hPOMp100) (DNA-binding p52/p100 complex, 100 kDa subunit) (Polypyrimidine tract-binding protein-associated-splicing factor) (PSF) (PTB-associated-splicing factor)	SFPQ	707	1,142117028	0,191710485	UNCHANGED
P30405	5	3	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase F, mitochondrial (PPIase F) (EC	PPIF	207	1,140080259	0,189135391	UNCHANGED

5.2.1.8) (Cyclophilin D) (CypD) (Cyclophilin F) (Mitochondrial cyclophilin) (Cyp-M) (Rotamase F)									
Q12802	9	4	AKAP13	2813	1,135310387	0,183086776	UNCHANGED	A-kinase anchor protein 13 (AKAP-13) (AKAP-Lbc) (Breast cancer nuclear receptor-binding auxiliary protein) (Guanine nucleotide exchange factor Lbc) (Human thyroid-anchoring protein 31) (Lymphoid blast crisis oncogene) (LBC oncogene) (Non-oncogenic Rho GTPase-specific GTP exchange factor) (Protein kinase A-anchoring protein 13) (PRKA13) (p47)	
P26038	12	6	MSN	577	1,134382213	0,181906817	UNCHANGED	Moesin (Membrane-organizing extension spike protein)	
A0A0C4DG17	5	5	RPSA	300	1,132787051	0,179876679	UNCHANGED	40S ribosomal protein SA (37 kDa laminin receptor precursor) (37/67 kDa laminin receptor) (67 kDa laminin receptor) (Laminin receptor 1) (Laminin-binding protein precursor p40)	
Q6ZT98	4	2	TTL7	887	1,126697724	0,172100514	UNCHANGED	Tubulin polyglutamylase TTL7 (EC 6.-.-.-) (Testis development protein NYD-SP30) (Tubulin--tyrosine ligase-like protein 7)	
Q96T76	4	3	MMS19	1030	1,126625751	0,172008353	UNCHANGED	MMS19 nucleotide excision repair protein homolog (hMMS19) (MET18 homolog) (MMS19-like protein)	
E7EPJ7	8	7	TRIO	2546	1,120425323	0,164046496	UNCHANGED	Triple functional domain protein (Fragment)	
Q16777	26	14	HIST2H2AC	129	1,11832919	0,161344921	UNCHANGED	Histone H2A type 2-C (Histone H2A-GL101) (Histone H2A/q)	
Q86XA9	8	3	HEATR5A	2040	1,116803589	0,159375483	UNCHANGED	HEAT repeat-containing protein 5A	
P04075	23	16	ALDOA	364	1,103066877	0,141520261	UNCHANGED	Fructose-bisphosphate aldolase A (EC 4.1.2.13) (Lung cancer antigen NY-LU-1) (Muscle-type aldolase)	
Q9UPV9	6	4	TRAK1	953	1,094929043	0,130837378	UNCHANGED	Trafficking kinesin-binding protein 1 (106 kDa O-GlcNAc transferase-interacting protein)	
Q9UKX2	7	3	MYH2	1941	1,084806503	0,117437732	UNCHANGED	Myosin-2 (Myosin heavy chain 2) (Myosin heavy chain 2a) (MyHC-2a) (Myosin heavy chain IIa) (MyHC-IIa) (Myosin heavy chain, skeletal muscle, adult 2)	
Q06830	18	3	PRDX1	199	1,075390227	0,104860266	UNCHANGED	Peroxiredoxin-1 (EC 1.11.1.15) (Natural killer cell-enhancing factor A) (NKEF-A) (Proliferation-associated gene protein) (PAG) (Thioredoxin peroxidase 2) (Thioredoxin-dependent peroxide reductase 2)	
G3V5X7	5	2	TEP1	2519	1,070167511	0,097836636	UNCHANGED	Telomerase protein component 1	
P02549	8	6	SPTA1	2419	1,065337655	0,09131076	UNCHANGED	Spectrin alpha chain, erythrocytic 1 (Erythroid alpha-spectrin)	
P04406	33	23	GAPDH	335	1,042679705	0,060296052	UNCHANGED	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (EC 1.2.1.12) (Peptidyl-cysteine S-nitrosylase GAPDH) (EC 2.6.99.-)	
Q96JI7	10	6	SPG11	2443	1,029224365	0,041557515	UNCHANGED	Spatacsin (Colorectal carcinoma-associated protein) (Spastic paraplegia 11 protein)	
P10412	9	1	HIST1H1E	219	1,014515319	0,02079065	UNCHANGED	Histone H1.4 (Histone H1b) (Histone H1s-4)	
P38646	12	7	HSPA9	679	1,012395476	0,017772966	UNCHANGED	Stress-70 protein, mitochondrial (75 kDa glucose-regulated protein) (GRP-75) (Heat shock 70 kDa protein 9) (Mortalin) (MOT) (Peptide-	

binding protein 74) (PBP74)									
Q13838	5	2	Spliceosome RNA helicase DDX39B (EC 3.6.4.13) (56 kDa U2AF65-associated protein) (ATP-dependent RNA helicase p47) (DEAD box protein UAP56) (HLA-B-associated transcript 1 protein)	DDX39B	428	1,007766228	0,011161016	UNCHANGED	
Q9Y520	10	5	Protein PRRC2C (BAT2 domain-containing protein 1) (HBV X-transactivated gene 2 protein) (HBV XAg-transactivated protein 2) (HLA-B-associated transcript 2-like 2) (Proline-rich and coiled-coil-containing protein 2C)	PRRC2C	2896	1,006722741	0,009666409	UNCHANGED	
P78527	9	6	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (DNA-PK catalytic subunit) (DNA-PKcs) (EC 2.7.1.1) (DNPK1) (p460)	PRKDC	4128	0,983863644	-0,023469711	UNCHANGED	
Q7Z406	5	2	Myosin-14 (Myosin heavy chain 14) (Myosin heavy chain, non-muscle IIc) (Non-muscle myosin heavy chain IIc) (NMHC II-C)	MYH14	1995	0,98073121	-0,028070306	UNCHANGED	
Q96M86	6	4	Dynein heavy chain domain-containing protein 1 (Dynein heavy chain domain 1-like protein) (Protein CCDC35)	DNHDI	4753	0,979410535	-0,030014381	UNCHANGED	
P62937	12	9	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A (PPIase A) (EC 5.2.1.8) (Cyclophilin A) (Cyclosporin A-binding protein) (Rotamase A) [Cleaved into: Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A, N-terminally processed]	PPIA	165	0,976859538	-0,033776963	UNCHANGED	
Q4G0P3	17	13	Hydrocephalus-inducing protein homolog	HYDIN	5121	0,975364012	-0,035987352	UNCHANGED	
Q15643	4	2	Thyroid receptor-interacting protein 11 (TR-interacting protein 11) (TRIP-11) (Clonal evolution-related gene on chromosome 14 protein) (Golgi-associated microtubule-binding protein 210) (GMAP-210) (Trip230)	TRIP11	1979	0,968408073	-0,046312989	UNCHANGED	
P0CG39	32	2	POTE ankyrin domain family member J	POTEJ	1038	0,962008775	-0,055878041	UNCHANGED	
Q92620	4	2	Pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase PRP16 (EC 3.6.4.13) (ATP-dependent RNA helicase DHX38) (DEAH box protein 38)	DHX38	1227	0,948064894	-0,076942281	UNCHANGED	
Q5TEC6	10	2	Histone H3	HIST2H3PS2	136	0,947715882	-0,07747348	UNCHANGED	
J3QKN0	4	3	Polyubiquitin-B (Fragment)	UBB	206	0,942325171	-0,085703114	UNCHANGED	
Q9NR09	14	6	Baculoviral IAP repeat-containing protein 6 (EC 6.3.2.-) (BIR repeat-containing ubiquitin-conjugating enzyme) (BRUCE) (Ubiquitin-conjugating BIR domain enzyme apollon) (APOLLON)	BIRC6	4857	0,936011357	-0,09540206	UNCHANGED	
Q5T6W2	7	1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (Fragment)	HNRNPK	379	0,935785051	-0,095750912	UNCHANGED	
P11532	20	11	Dystrophin	DMD	3685	0,931450079	-0,102449645	UNCHANGED	
E7EPU2	6	4	Disco-interacting protein 2 homolog C	DIP2C	1537	0,92321114	-0,115267462	UNCHANGED	
Q15149	73	48	Plectin (PCN) (PLTN) (Hemidesmosomal protein 1) (HD1) (Plectin-1)	PLEC	4684	0,912994436	-0,131322027	UNCHANGED	
Q96JB5	4	2	CDK5 regulatory subunit-associated protein 3 (CDK5 activator-	CDK5RAP3	506	0,906995862	-0,140832126	UNCHANGED	

P58876	19	2	binding protein C53) (LXXLL/leucine-zipper-containing ARF-binding protein) (Protein HSF-27)	HIST1H2BD	126	0,902834635	-0,147466331	UNCHANGED
Q13535	13	9	Histone H2B type 1-D (HIRA-interacting protein 2) (Histone H2B.1 B) (Histone H2B.b) (H2B/b)	ATR	2644	0,885444159	-0,175526769	UNCHANGED
Q8TDM6	5	3	Serine/threonine-protein kinase ATR (EC 2.7.11.1) (Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein) (FRAP-related protein 1)	DLG5	1919	0,877789115	-0,188053714	UNCHANGED
P17066	15	4	Disks large homolog 5 (Disks large protein P-dlg) (Placenta and prostate DLG)	HSPA6	643	0,871539579	-0,198361912	UNCHANGED
Q9UG01	8	4	Heat shock 70 kDa protein 6 (Heat shock 70 kDa protein B')	IFT172	1749	0,862553642	-0,213313914	UNCHANGED
Q8WYP5	7	5	Intraflagellar transport protein 172 homolog	AHCTF1	2266	0,845105351	-0,242796896	UNCHANGED
P10809	40	30	Protein ELYS (Embryonic large molecule derived from yolk sac) (Protein MEL-28) (Putative AT-hook-containing transcription factor 1)	HSPD1	573	0,843318827	-0,245849932	UNCHANGED
P07954	4	3	60 kDa heat shock protein, mitochondrial (60 kDa chaperonin) (Chaperonin 60) (CPN60) (Heat shock protein 60) (HSP-60) (Hsp60) (HuCHA60) (Mitochondrial matrix protein P1) (P60 lymphocyte protein)	FH	510	0,808992763	-0,305801298	UNCHANGED
A1KZ92	4	3	Fumarate hydratase, mitochondrial (Fumarase) (EC 4.2.1.2)	PXDNL	1463	0,803878672	-0,314950321	UNCHANGED
Q8NF50	11	6	Peroxidasin-like protein (EC 1.1.1.7) (Cardiac peroxidase) (Vascular peroxidase 2) (polysomal ribonuclease 1) (PRM1)	DOCK8	2099	0,798972903	-0,32378152	UNCHANGED
Q14416	5	4	Dedicator of cytokinesis protein 8	GRM2	872	0,785955341	-0,347480756	UNCHANGED
P09382	5	3	Metabotropic glutamate receptor 2 (mGluR2)	LGALS1	135	0,785545662	-0,348232957	UNCHANGED
Q5VT06	11	7	Galactin-1 (Gal-1) (14 kDa laminin-binding protein) (HLBP14) (14 kDa lectin) (Beta-galactoside-binding lectin L-14-I) (Galaptin) (HBL) (HPL) (Lactose-binding lectin 1) (Lectin galactoside-binding soluble 1) (Putative MAPK-activating protein PM12) (S-Lac lectin 1)	CEP350	3117	0,766687612	-0,383289226	UNCHANGED
Q15049	4	4	Centrosome-associated protein 350 (Cep350) (Centrosome-associated protein of 350 kDa)	MLC1	377	0,754397274	-0,406603632	UNCHANGED
Q99996	17	11	Membrane protein MLC1	AKAP9	3911	0,751989454	-0,411215666	UNCHANGED
G3XAE9	5	3	A-kinase anchor protein 9 (AKAP-9) (A-kinase anchor protein 350 kDa) (AKAP 350) (hgAKAP 350) (A-kinase anchor protein 450 kDa) (AKAP 450) (AKAP 120-like protein) (Centrosome- and Golgi-localized PKN-associated protein) (CG-NAP) (Protein hyperton) (Protein kinase A-anchoring protein 9) (PRKA9) (Protein yotiao)	FAM179B	1773	0,711240038	-0,491591555	UNCHANGED
P14625	24	13	KIAA0423, isoform CRA_a (Protein FAM179B)	HSP90B1	803	0,698599622	-0,517462232	UNCHANGED
			Endoplasmic reticulum glucose-regulated protein (GRP-94) (Heat shock protein 90 kDa beta member 1) (Tumor rejection antigen 1) (gp96 homolog)					

Q86VP6	5	3	Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1 (Cullin-associated and neddylation-dissociated protein 1) (TBP-interacting protein of 120 kDa A) (TBP-interacting protein 120A) (p120 CAND1)	CAND1	1230	0,693550171	-0,527927846	UNCHANGED
Q9P225	24	15	Dynein heavy chain 2, axonemal (Axonemal beta dynein heavy chain 2) (Ciliary dynein heavy chain 2) (Dynein heavy chain domain-containing protein 3)	DNAH2	4427	0,691196541	-0,532832098	UNCHANGED
P48643	11	5	T-complex protein 1 subunit epsilon (TCP-1-epsilon) (CCT-epsilon)	CCT5	541	0,691105739	-0,533021636	UNCHANGED
O15014	5	3	Zinc finger protein 609	ZNF609	1411	0,675158753	-0,566701325	UNCHANGED
P38159	5	1	RNA-binding motif protein, X chromosome (Glycoprotein p43) (Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G) (hnRNP G) [Cleaved into: RNA-binding motif protein, X chromosome, N-terminally processed]	RBMX	391	0,674303044	-0,568530984	UNCHANGED
P54652	19	5	Heat shock-related 70 kDa protein 2 (Heat shock 70 kDa protein 2)	HSPA2	639	0,661554173	-0,596068796	UNCHANGED
Q99666	6	1	RANBP2-like and GRIP domain-containing protein 5/6 (Ran-binding protein 2-like 1/2) (RanBP2-like 1/2) (RanBP2L1) (RanBP2L2) (Sperm membrane protein BS-63)	RGPD5	1765	0,656161395	-0,607877379	UNCHANGED
Q96RL7	4	2	Vacuolar protein sorting-associated protein 13A (Chorea-acanthocytosis protein) (Chorein)	VPS13A	3174	0,648642551	-0,624504426	UNCHANGED
Q86UP2	5	2	Kinectin (CG-1 antigen) (Kinesin receptor)	KTN1	1357	0,612424378	-0,707396383	UNCHANGED
P31942	4	3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3 (hnRNP H3) (Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein 2H9) (hnRNP 2H9)	HNRNPH3	346	0,580791604	-0,783907497	UNCHANGED
F2Z2U4	15	9	Transformation/transcription domain-associated protein	TRRAP	3848	0,563800694	-0,82674284	UNCHANGED
P15144	4	4	Aminopeptidase N (AP-N) (hAPN) (EC 3.4.11.2) (Alanyl aminopeptidase) (Aminopeptidase M) (AP-M) (Microsomal aminopeptidase) (Myeloid plasma membrane glycoprotein CD13) (gp150) (CD antigen CD13)	ANPEP	967	0,55976495	-0,837106939	UNCHANGED
P08238	46	13	Heat shock protein HSP 90-beta (HSP 90) (Heat shock 84 kDa) (HSP 84) (HSP84)	HSP90ABI	724	0,530613297	-0,914267266	UNCHANGED
Q5THJ4	10	7	Vacuolar protein sorting-associated protein 13D	VPS13D	4388	0,529218856	-0,91806363	UNCHANGED
Q96Q05	7	4	Trafficking protein particle complex subunit 9 (NIK- and IKKB-binding protein) (Tularik gene 1 protein)	TRAPPC9	1148	0,500070207	-0,999797438	UNCHANGED
Q9NYC9	13	8	Dynein heavy chain 9, axonemal (Axonemal beta dynein heavy chain 9) (Ciliary dynein heavy chain 9)	DNAH9	4486	0,497508916	-1,007205713	DOWN
Q709F0	5	2	AcyI-CoA dehydrogenase family member 11 (ACAD-11) (EC 1.3.99.-)	ACAD11	780	0,429925345	-1,217841931	DOWN
P42338	6	4	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit beta isoform (PI3-kinase subunit beta) (PI3K-beta) (PI3Kbeta) (PtdIns-3-kinase subunit beta) (EC 2.7.1.153) (Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase 110 kDa catalytic subunit beta) (PtdIns-3-	PIK3CB	1070	0,331778816	-1,591706323	DOWN

kinase subunit p110-beta) (p110beta)									
P07737	8	4	4	Profilin-1 (Epididymis tissue protein Li 184a) (Profilin I)	PFN1	140	0,293503229	-1,768551717	DOWN
P49321	4	2	2	Nuclear autoantigenic sperm protein (NASP)	NASP	788	0,275552519	-1,859600779	DOWN
E9PBC6	21	1	1	Transforming acidic coiled-coil-containing protein 2	TACC2	2875	0,252529173	-1,985478034	DOWN
Q70CQ2	9	6	6	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 34 (EC 3.4.19.12) (Deubiquitinating enzyme 34) (Ubiquitin thioesterase 34) (Ubiquitin-specific-processing protease 34)	USP34	3546	0,24898436	-2,005872971	DOWN
P08758	5	2	2	Annexin A5 (Anchoring CII) (Annexin V) (Annexin-5) (Calphobindin I) (CBP-I) (Endonexin II) (Lipocortin V) (Placental anticoagulant protein 4) (PP4) (Placental anticoagulant protein I) (PAP-I) (Thromboplastin inhibitor) (Vascular anticoagulant-alpha) (VAC-alpha)	ANXA5	320	0,229227116	-2,125150382	DOWN
O75643	4	2	2	U5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa helicase (EC 3.6.4.13) (Activating signal cointegrator 1 complex subunit 3-like 1) (BRR2 homolog) (U5 snRNP-specific 200 kDa protein) (U5-200KD)	SNRNP200	2136	0,213579642	-2,227153954	DOWN
E9PK25	13	7	7	Cofilin-1	CFL1	204	0,18042858	-2,470500213	DOWN
A0A0C4DGK3	15	7	7	Nesprin-2	SYNE2	3541	0,16940297	-2,561468929	DOWN
P00558	34	25	25	Phosphoglycerate kinase 1 (EC 2.7.2.3) (Cell migration-inducing gene 10 protein) (Primer recognition protein 2) (PRP 2)	PGK1	417	0,166210067	-2,588920325	DOWN
P17480	4	2	2	Nucleolar transcription factor 1 (Autoantigen NOR-90) (Upstream-binding factor 1) (UBF-1)	UBTF	764	0,158006187	-2,661947042	DOWN
P68133	38	1	1	Actin, alpha skeletal muscle (Alpha-actin-1)	ACTA1	377	0,130219531	-2,940982252	DOWN
P04083	8	5	5	Annexin A1 (Annexin I) (Annexin-1) (Calpactin II) (Calpactin-2) (Chromobindin-9) (Lipocortin I) (Phospholipase A2 inhibitory protein) (p35)	ANXA1	346	0,127209673	-2,974719723	DOWN
E9PG32	5	2	2	Dynein heavy chain 12, axonemal	DNAH12	3960	0,117631119	-3,087658321	DOWN

Proteínas super-expressas (*up-regulated- UP*) valor de FoldLog2 > 1; proteínas sub-expressas (*down-regulated- DOWN*) valor de FoldLog2 < -1 e proteínas sem expressão diferencial (*unchanged - UNCHANGED*) valor de FoldLog2 no intervalo -1 < FoldLog2 < 1.

Tabela suplementar 3. Lista de Proteínas quantificadas no tratamento com MON em 48 horas. Do total de 137 proteínas, 06 foram superexpressas (*up-regulated*), 15 subexpressas (*down-regulated*) e 116 não foram diferencialmente expressas (*unchanged*)

Entrada	Peptídeos contados	Peptídeos Únicos	Nomes Proteínas	Gene	Comprimento	FoldChange	FoldLog2	Status
P11532	20	11	Dystrophin	DMD	3685	7,692414059	2,943436421	UP
P58876	19	2	Histone H2B type 1-D (HIRA-interacting protein 2) (Histone H2B.1 B) (Histone H2B.b) (H2B/b)	HIST1H2BD	126	6,064153495	2,600306271	UP
A1KZ92	4	3	Peroxidasin-like protein (EC 1.11.1.7) (Cardiac peroxidase) (Vascular peroxidase 2) (polysomal ribonuclease 1) (PRMI) Transcription intermediary factor 1-beta (TIF1-beta) (E3 SUMO-protein ligase TRIM28) (EC 6.3.2.-) (KRAB-associated protein 1) (KAP-1) (KRAB-interacting protein 1) (KRIP-1) (Nuclear corepressor KAP-1) (RING finger protein 96) (Tripartite motif-containing protein 28)	PXDNL	1463	4,745747574	2,246635366	UP
Q13263	8	5	Nuclear autoantigenic sperm protein (NASP)	TRIM28	835	4,212743505	2,074760079	UP
P49321	4	2	Myosin-14 (Myosin heavy chain 14) (Myosin heavy chain, non-muscle IIc) (Non-muscle myosin heavy chain IIc) (NMHC II-C)	NASP	788	2,698970845	1,432409392	UP
Q7Z406	5	2	Zinc finger protein 609	MYH14	1995	2,590631764	1,373303963	UP
O15014	5	3	Aminopeptidase N (AP-N) (hAPN) (EC 3.4.11.2) (Alanyl aminopeptidase) (Aminopeptidase M) (AP-M) (Microsomal aminopeptidase) (Myeloid plasma membrane glycoprotein CD13) (gp150) (CD antigen CD13)	ZNF609	1411	1,956262867	0,968100241	UNCHANGED
P15144	4	4	Centrosome-associated protein CEP250 (250 kDa centrosomal protein) (Cep250) (Centrosomal Nek2-associated protein 1) (C-Nap1) (Centrosomal protein 2)	ANPEP	967	1,955167369	0,967292113	UNCHANGED
Q9BV73	30	18	Heat shock-related 70 kDa protein 2 (Heat shock 70 kDa protein 2)	CEP250	2442	1,910318527	0,933813214	UNCHANGED
P54652	19	5	Phosphoglycerate kinase 2 (EC 2.7.2.3) (Phosphoglycerate kinase, testis specific)	HSPA2	639	1,817229354	0,861740515	UNCHANGED
P07205	9	4	RNA-binding motif protein, X chromosome (Glycoprotein p43) (Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G) (hnRNP G) [Cleaved into: RNA-binding motif protein, X chromosome, N-terminally processed]	PGK2	417	1,797927294	0,846334681	UNCHANGED
P38159	5	1	Histone H3 (Fragment)	RBMX	391	1,647332528	0,720131805	UNCHANGED
K7EK07	12	1	Negative elongation factor E (NELF-E) (RNA-binding protein RD)	H3F3B	132	1,610448696	0,687462702	UNCHANGED
P18615	6	3	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (EC	NELFE	380	1,605501639	0,683024138	UNCHANGED
P04406	33	23		GAPDH	335	1,544098388	0,626764683	UNCHANGED

1.2.1.12) (Peptidyl-cysteine S-nitrosylase GAPDH) (EC 2.6.99.-)							
P17480	4	2	UBTF	764	1,540560551	0,623455388	UNCHANGED
P10412	9	1	HIST1H1E	219	1,483562782	0,569065981	UNCHANGED
Q9HCK8	4	3	CHD8	2581	1,472729007	0,558491988	UNCHANGED
Q8WUM4	5	4	PDCD6IP	868	1,423943413	0,509891815	UNCHANGED
Q5TEC6	10	2	HIST2H3PS2	136	1,375941872	0,460419523	UNCHANGED
P16144	4	4	ITGB4	1822	1,368872105	0,45298766	UNCHANGED
P15311	7	5	EZR	586	1,362798434	0,446572195	UNCHANGED
Q709F0	5	2	ACAD11	780	1,359858075	0,443456089	UNCHANGED
M0QXS5	4	3	HNRNPL	530	1,27438483	0,349800999	UNCHANGED
E7EVA0	20	11	MAP4	2297	1,256365135	0,329255812	UNCHANGED
Q9UKX2	7	3	MYH2	1941	1,229166309	0,297680129	UNCHANGED
Q5VT06	11	7	CEP350	3117	1,229082716	0,297582011	UNCHANGED
B4DY08	7	4	HNRNPC	288	1,208580253	0,273313275	UNCHANGED
P02549	8	6	SPTA1	2419	1,206555619	0,270894421	UNCHANGED
Q9UG01	8	4	IFT172	1749	1,18385984	0,243498287	UNCHANGED
Q8NI35	6	2	INADL	1801	1,183835612	0,243468761	UNCHANGED
P22626	16	10	HNRNP A2/B1	353	1,171803646	0,228730844	UNCHANGED
P61978	7	1	HNRNPK	463	1,14616927	0,196820122	UNCHANGED
O75643	4	2	SNRNP200	2136	1,129359854	0,175505253	UNCHANGED

					protein) (U5-200KD)								
Q96M86	6	4	4753	1,12805632	Dynein heavy chain domain-containing protein 1 (Dynein heavy chain domain 1-like protein) (Protein CCDC35)	DNHD1	4753	1,12805632	0,173839098	UNCHANGED			
Q12873	5	3	2000	1,118265226	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 3 (CHD-3) (EC 3.6.4.12) (ATP-dependent helicase CHD3) (Mi-2 autoantigen 240 kDa protein) (Mi2-alpha) (Zinc finger helicase) (hZFH)	CHD3	2000	1,118265226	0,161262401	UNCHANGED			
Q16777	26	14	129	1,111243901	Histone H2A type 2-C (Histone H2A-GL101) (Histone H2A/q)	HIST2H2AC	129	1,111243901	0,152175501	UNCHANGED			
Q13838	5	2	428	1,10506986	Spliceosome RNA helicase DDX39B (EC 3.6.4.13) (56 kDa U2AF65-associated protein) (ATP-dependent RNA helicase p47) (DEAD box protein UAP56) (HLA-B-associated transcript 1 protein)	DDX39B	428	1,10506986	0,144137576	UNCHANGED			
Q70CQ2	9	6	3546	1,10362726	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 34 (EC 3.4.19.12) (Deubiquitinating enzyme 34) (Ubiquitin thioesterase 34) (Ubiquitin-specific-processing protease 34)	USP34	3546	1,10362726	0,142252997	UNCHANGED			
E9PK25	13	7	204	1,09471942	Cofilin-1	CFL1	204	1,09471942	0,13056115	UNCHANGED			
Q9Y520	10	5	2896	1,091387649	Protein PRRC2C (BAT2 domain-containing protein 1) (HBV X-transactivated gene 2 protein) (HBV XAg-transactivated protein 2) (HLA-B-associated transcript 2-like 2) (Proline-rich and coiled-coil-containing protein 2C)	PRRC2C	2896	1,091387649	0,126163622	UNCHANGED			
P31942	4	3	346	1,090909164	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3 (hnRNP H3) (Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein 2H9) (hnRNP 2H9)	HNRNPH3	346	1,090909164	0,125530979	UNCHANGED			
P78527	9	6	4128	1,081376045	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (DNA-PK catalytic subunit) (DNA-PKcs) (EC 2.7.11.1) (DNPK1) (p460)	PRKDC	4128	1,081376045	0,112868303	UNCHANGED			
Q7Z6Z7	10	8	4374	1,073375666	E3 ubiquitin-protein ligase HUWE1 (EC 6.3.2.-) (ARF-binding protein 1) (ARF-BP1) (HECT, UBA and WWE domain-containing protein 1) (Homologous to E6AP carboxyl terminus homologous protein 9) (HectH9) (Large structure of UREB1) (LASU1) (Mcl-1 ubiquitin ligase E3) (Mu1e) (Upstream regulatory element-binding protein 1) (URE-B1) (URE-binding protein 1)	HUWE1	4374	1,073375666	0,102155087	UNCHANGED			
Q5T6W2	7	1	379	1,073300598	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (Fragment)	HNRNPK	379	1,073300598	0,102054187	UNCHANGED			
H7BY63	4	2	936	1,067626326	Protein FAM184A	FAM184A	936	1,067626326	0,094406786	UNCHANGED			
F8VVM2	4	2	324	1,065516094	Phosphate carrier protein, mitochondrial	SLC25A3	324	1,065516094	0,091552385	UNCHANGED			
Q92817	6	2	2033	1,048718096	Envoplakin (210 kDa cornified envelope precursor protein) (210 kDa paraneoplastic pemphigus antigen) (p210)	EVPL	2033	1,048718096	0,068626922	UNCHANGED			

Q9P225	24	15	Dynein heavy chain 2, axonemal (Axonemal beta dynein heavy chain 2) (Ciliary dynein heavy chain 2) (Dynein heavy chain domain-containing protein 3)	DNAH2	4427	1,048266531	0,068005581	UNCHANGED
Q96RL7	4	2	Vacuolar protein sorting-associated protein 13A (Chorea-acanthocytosis protein) (Chorein)	VPS13A	3174	1,042339678	0,0598255	UNCHANGED
Q5T200	22	12	Zinc finger CCCH domain-containing protein 13	ZC3H13	1668	1,03868002	0,05475128	UNCHANGED
P42338	6	4	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit beta isoform (PI3-kinase subunit beta) (PI3K-beta) (PI3Kbeta) (PtdIns-3-kinase subunit beta) (EC 2.7.1.153) (Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase 110 kDa catalytic subunit beta) (PtdIns-3-kinase subunit p110-beta) (p110beta)	PIK3CB	1070	1,014481529	0,020742597	UNCHANGED
Q6S8J3	33	1	POTE ankyrin domain family member E (ANKRD26-like family C member 1A) (Prostate, ovary, testis-expressed protein on chromosome 2) (POTE-2)	POTE	1075	1,006800607	0,009777991	UNCHANGED
P09382	5	3	Galectin-1 (Gal-1) (14 kDa laminin-binding protein) (HLBP14) (14 kDa lectin) (Beta-galactoside-binding lectin L-14-I) (Galaptin) (HBL) (HPL) (Lactose-binding lectin 1) (Lectin galactoside-binding soluble 1) (Putative MAPK-activating protein PM12) (S-Lac lectin 1)	LGALS1	135	0,998093589	-0,002752994	UNCHANGED
Q8N2C7	5	3	Protein unc-80 homolog	UNC80	3258	0,996158245	-0,005553155	UNCHANGED
P38646	12	7	Stress-70 protein, mitochondrial (75 kDa glucose-regulated protein) (GRP-75) (Heat shock 70 kDa protein 9) (Mortalin) (MOT) (Peptide-binding protein 74) (PBP74)	HSPA9	679	0,994805455	-0,0007513677	UNCHANGED
Q2M1P5	6	3	Kinesin-like protein KIF7	KIF7	1343	0,992313669	-0,011131868	UNCHANGED
A0A087WTT1	5	2	Polyadenylate-binding protein (PABP)	PABPC1	522	0,986365722	-0,01980543	UNCHANGED
A0A0C4DG17	5	5	40S ribosomal protein SA (37 kDa laminin receptor precursor) (37/67 kDa laminin receptor) (67 kDa laminin receptor) (Laminin receptor 1) (Laminin-binding protein precursor p40)	RPSA	300	0,97917228	-0,030365379	UNCHANGED
G3V5X7	5	2	Telomerase protein component 1	TEP1	2519	0,976334678	-0,03455232	UNCHANGED
P0DMV8	19	9	Heat shock 70 kDa protein 1A (Heat shock 70 kDa protein 1) (HSP70-1) (HSP70.1)	HSPA1A	641	0,970610132	-0,043036175	UNCHANGED
J3QKN0	4	3	Polyubiquitin-B (Fragment)	UBB	206	0,963760788	-0,053252991	UNCHANGED
Q13535	13	9	Serine/threonine-protein kinase ATR (EC 2.7.1.1) (Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein) (FRAP-related protein 1)	ATR	2644	0,958074077	-0,061790888	UNCHANGED
Q92954	6	3	Proteoglycan 4 (Lubricin) (Megakaryocyte-stimulating factor) (Superficial zone proteoglycan) [Cleaved into:	PRG4	1404	0,95251143	-0,07019169	UNCHANGED

Proteoglycan 4 C-terminal part]									
E7EMW7	11	9	E3 ubiquitin-protein ligase UBR5	UBR5	2792	0,9455319	-0,080801962	UNCHANGED	
B1AJZ9	6	1	Forkhead-associated domain-containing protein 1 (FHA domain-containing protein 1)	FHAD1	1412	0,94417452	-0,082874545	UNCHANGED	
A0A0C4DGK3	15	7	Nesprin-2	SYNE2	3541	0,9444040867	-0,083078781	UNCHANGED	
P00558	34	25	Phosphoglycerate kinase 1 (EC 2.7.2.3) (Cell migration-inducing gene 10 protein) (Primer recognition protein 2) (PRP 2)	PGK1	417	0,9433386283	-0,084079471	UNCHANGED	
G3XAE9	5	3	KIAA0423, isoform CRA_a (Protein FAMI79B)	FAMI79B	1773	0,941314199	-0,087251737	UNCHANGED	
P07237	5	4	Protein disulfide-isomerase (PDI) (EC 5.3.4.1) (Cellular thyroid hormone-binding protein) (Prolyl 4-hydroxylase subunit beta) (p55)	P4HB	508	0,934524603	-0,097695449	UNCHANGED	
P48643	11	5	T-complex protein 1 subunit epsilon (TCP-1-epsilon) (CCT-epsilon)	CCT5	541	0,933670088	-0,09901523	UNCHANGED	
P10809	40	30	60 kDa heat shock protein, mitochondrial (60 kDa chaperonin) (Chaperonin 60) (CPN60) (Heat shock protein 60) (HSP-60) (Hsp60) (HuCHA60) (Mitochondrial matrix protein P1) (P60 lymphocyte protein)	HSPD1	573	0,929345205	-0,10571351	UNCHANGED	
Q9NYC9	13	8	Dynein heavy chain 9, axonemal (Axonemal beta dynein heavy chain 9) (Ciliary dynein heavy chain 9)	DNAH9	4486	0,928811452	-0,106542334	UNCHANGED	
P11137	12	7	Microtubule-associated protein 2 (MAP-2)	MAP2	1827	0,927406732	-0,108725896	UNCHANGED	
Q12802	9	4	A-kinase anchor protein 13 (AKAP-13) (AKAP-Lbc) (Breast cancer nuclear receptor-binding auxiliary protein) (Guanine nucleotide exchange factor Lbc) (Human thyroid-anchoring protein 31) (Lymphoid blast crisis oncogene) (LBC oncogene) (Non-oncogenic Rho GTPase-specific GTP exchange factor) (Protein kinase A-anchoring protein 13) (PRKA13) (p47)	AKAP13	2813	0,92513156	-0,112269553	UNCHANGED	
Q14315	5	4	Filamin-C (FLN-C) (FLNc) (ABP-280-like protein) (ABP-L) (Actin-binding-like protein) (Filamin-2) (Gamma-filamin)	FLNC	2725	0,924767907	-0,112836763	UNCHANGED	
Q6ZT98	4	2	Tubulin polyglutamylase TTL7 (EC 6.-.-) (Testis development protein NYD-SP30) (Tubulin--tyrosine ligase-like protein 7)	TTL7	887	0,918569701	-0,122538898	UNCHANGED	
Q15049	4	4	Membrane protein MLC1	MLC1	377	0,91851803	-0,122620053	UNCHANGED	
Q32Q12	15	12	Nucleoside diphosphate kinase (EC 2.7.4.6)	NME1-NME2	292	0,918252814	-0,123036682	UNCHANGED	
Q8TDM6	5	3	Disks large homolog 5 (Disks large protein P-dlg) (Placenta and prostate DLG)	DLG5	1919	0,914070425	-0,129622772	UNCHANGED	

P07737	8	4	Profilin-1 (Epididymis tissue protein Li 184a) (Profilin I)	PFN1	140	0,912048776	-0,132817113	UNCHANGED
P08238	46	13	Heat shock protein HSP 90-beta (HSP 90) (Heat shock 84 kDa) (HSP 84) (HSP84)	HSP90AB1	724	0,9109629	-0,134535795	UNCHANGED
Q92620	4	2	Pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase PRP16 (EC 3.6.4.13) (ATP-dependent RNA helicase DHX38) (DEAH box protein 38)	DHX38	1227	0,902227473	-0,148436878	UNCHANGED
H0YNP5	12	1	Annexin (Fragment)	ANXA2	175	0,899183921	-0,153311858	UNCHANGED
Q9NR09	14	6	Baculoviral IAP repeat-containing protein 6 (EC 6.3.2.-) (BIR repeat-containing ubiquitin-conjugating enzyme) (BRUCE) (Ubiquitin-conjugating BIR domain enzyme apollon) (APOLLON)	BIRC6	4857	0,894237259	-0,161270436	UNCHANGED
Q96Q05	7	4	Trafficking protein particle complex subunit 9 (NIK- and IKKB-binding protein) (Tularik gene 1 protein)	TRAPPC9	1148	0,8929713	-0,163314286	UNCHANGED
P26038	12	6	Moesin (Membrane-organizing extension spike protein)	MSN	577	0,890790229	-0,166842362	UNCHANGED
P17987	4	4	T-complex protein 1 subunit alpha (TCP-1-alpha) (CCT-alpha)	TCPI1	556	0,885186067	-0,175947351	UNCHANGED
P08758	5	2	Annexin A5 (Anchorin CII) (Annexin V) (Annexin-5) (Calphobindin I) (CBP-I) (Endonexin II) (Lipocortin V) (Placental anticoagulant protein 4) (PP4) (Placental anticoagulant protein 1) (PAP-I) (Thromboplastin inhibitor) (Vascular anticoagulant-alpha) (VAC-alpha)	ANXA5	320	0,87846189	-0,186948394	UNCHANGED
Q96T76	4	3	MMS19 nucleotide excision repair protein homolog (hMMS19) (MET18 homolog) (MMS19-like protein)	MMS19	1030	0,855446801	-0,225249957	UNCHANGED
Q9P2N2	4	3	Rho GTPase-activating protein 28 (Rho-type GTPase-activating protein 28)	ARHGAP28	729	0,846421073	-0,240552549	UNCHANGED
P07954	4	3	Fumarate hydratase, mitochondrial (Fumarase) (EC 4.2.1.2)	FH	510	0,843964781	-0,2447453	UNCHANGED
Q06830	18	3	Peroxiredoxin-1 (EC 1.11.1.15) (Natural killer cell-enhancing factor A) (NKEF-A) (Proliferation-associated gene protein) (PAG) (Thioredoxin peroxidase 2) (Thioredoxin-dependent peroxidase 2)	PRDX1	199	0,838281306	-0,254493638	UNCHANGED
K7EJU1	5	2	Glial fibrillary acidic protein (Fragment)	GFAP	248	0,83699386	-0,256711055	UNCHANGED
Q15149	73	48	Plectin (PCN) (PLTN) (Hemidesmosomal protein 1) (HD1) (Plectin-1)	PLEC	4684	0,836896014	-0,256879719	UNCHANGED
P14625	24	13	Endoplasmic reticulum glucose-regulated protein (GRP-94) (Heat shock protein 90 kDa beta member 1) (Tumor rejection antigen 1) (gp96 homolog)	HSP90B1	803	0,83652177	-0,257525009	UNCHANGED
P30405	5	3	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase F, mitochondrial (PPIase F) (EC 5.2.1.8) (Cyclophilin D) (Cyp-D) (CypD) (Cyclophilin F) (Mitochondrial cyclophilin) (Cyp-M)	PPIF	207	0,82263843	-0,281669625	UNCHANGED

(Rotamase F)							
Protein ID	Accession	Length	Domain	Gene	Score	Change	
P0CG39	32	2	POTE ankyrin domain family member J	POTEJ	1038	0,81820498 -0,289465777	UNCHANGED
Q12923	8	4	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 13 (EC 3.1.3.48) (Fas-associated protein-tyrosine phosphatase 1) (FAP-1) (PTP-BAS) (Protein-tyrosine phosphatase 1E) (PTP-E1) (hPTE1) (Protein-tyrosine phosphatase PTPLE1)	PTPN13	2485	0,815567562 -0,294123699	UNCHANGED
Q15643	4	2	Thyroid receptor-interacting protein 11 (TR-interacting protein 11) (TRIP-11) (Clonal evolution-related gene on chromosome 14 protein) (Golgi-associated microtubule-binding protein 210) (GMAP-210) (Trip230)	TRIP11	1979	0,812571461 -0,299433399	UNCHANGED
Q13315	16	12	Serine-protein kinase ATM (EC 2.7.11.1) (Ataxia telangiectasia mutated) (A-T mutated)	ATM	3056	0,810943786 -0,302326183	UNCHANGED
P63261	60	9	Actin, cytoplasmic 2 (Gamma-actin) [Cleaved into: Actin, cytoplasmic 2, N-terminally processed]	ACTG1	375	0,810102376 -0,303823857	UNCHANGED
P62937	12	9	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A (PPIase A) (EC 5.2.1.8) (Cyclophilin A) (Cyclosporin A-binding protein) (Rotamase A) [Cleaved into: Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A, N-terminally processed]	PPIA	165	0,808724738 -0,306279352	UNCHANGED
P68133	38	1	Actin, alpha skeletal muscle (Alpha-actin-1)	ACTA1	377	0,797362551 -0,326692246	UNCHANGED
E7ETZ7	4	3	Histone-lysine N-methyltransferase 2E	KMT2E	1778	0,792274941 -0,335926923	UNCHANGED
Q81W12	10	5	GRIP and coiled-coil domain-containing protein 2 (185 kDa Golgi coiled-coil protein) (GCC185) (CLL-associated antigen KW-11) (CTCL tumor antigen se1-1) (Ran-binding protein 2-like 4) (RanBP2L4) (Renal carcinoma antigen NY-REN-53)	GCC2	1684	0,781932093 -0,354884773	UNCHANGED
Q9P219	5	4	Protein Daple (Coiled-coil domain-containing protein 88C) (Dvl-associating protein with a high frequency of leucine residues) (hDaple) (Hook-related protein 2) (HkRP2)	CCDC88C	2028	0,779075579 -0,360164803	UNCHANGED
Q8NF50	11	6	Dedicator of cytokinesis protein 8	DOCK8	2099	0,775026057 -0,367683279	UNCHANGED
Q9NTJ3	4	3	Structural maintenance of chromosomes protein 4 (SMC protein 4) (SMC-4) (Chromosome-associated polypeptide C) (hCAP-C) (XCAP-C homolog)	SMC4	1288	0,769021558 -0,378904054	UNCHANGED
Q99996	17	11	A-kinase anchor protein 9 (AKAP-9) (A-kinase anchor protein 350 kDa) (AKAP 350) (hgAKAP 350) (A-kinase anchor protein 450 kDa) (AKAP 450) (AKAP 120-like protein) (Centrosome- and Golgi-localized PKN-associated protein) (CG-NAP) (Protein hyperion) (Protein kinase A-anchoring protein 9) (PRKA9) (Protein yotiao)	AKAP9	3911	0,748064297 -0,418765819	UNCHANGED
Q9BUF5	11	1	Tubulin beta-6 chain (Tubulin beta class V)	TUBB6	446	0,744155562 -0,426323853	UNCHANGED

O14795	7	4	Protein unc-13 homolog B (Munc13-2) (munc13)	UNC13B	1591	0,737265253	-0,439744329	UNCHANGED
Q5THJ4	10	7	Vacuolar protein sorting-associated protein 13D	VPS13D	4388	0,737244297	-0,439785338	UNCHANGED
E9PG32	5	2	Dynein heavy chain 12, axonemal	DNAH12	3960	0,721767878	-0,470393157	UNCHANGED
Q99666	6	1	RANBP2-like and GRIP domain-containing protein 5/6 (Ran-binding protein 2-like 1/2) (RanBP2-like 1/2) (RanBP2L1) (RanBP2L2) (Sperm membrane protein BS-63)	RGPD5	1765	0,717801852	-0,47834245	UNCHANGED
Q92547	6	2	DNA topoisomerase 2-binding protein 1 (DNA topoisomerase II-beta-binding protein 1) (TopBP1) (DNA topoisomerase II-binding protein 1)	TOPBP1	1522	0,691724454	-0,531730634	UNCHANGED
E7EPU2	6	4	Disco-interacting protein 2 homolog C	DIP2C	1537	0,653603872	-0,613511565	UNCHANGED
Q86VP6	5	3	Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1 (Cullin-associated and neddylation-dissociated protein 1) (TBP-interacting protein of 120 kDa A) (TBP-interacting protein 120A) (p120 CAND1)	CAND1	1230	0,640406761	-0,642939555	UNCHANGED
Q9UPV9	6	4	Trafficking kinesin-binding protein 1 (106 kDa O-GlcNAc transferase-interacting protein)	TRAK1	953	0,637136889	-0,650324726	UNCHANGED
E7EPI7	8	7	Triple functional domain protein (Fragment)	TRIO	2546	0,579472525	-0,787187836	UNCHANGED
Q96J17	10	6	Spatacsin (Colorectal carcinoma-associated protein) (Spastic paraplegia 11 protein)	SPG11	2443	0,538142531	-0,893939763	UNCHANGED
P06733	47	32	Alpha-enolase (EC 4.2.1.11) (2-phospho-D-glycerate hydro-lyase) (C-myc promoter-binding protein) (Enolase 1) (MBP-1) (MPB-1) (Non-neural enolase) (NNE) (Phosphopyruvate hydratase) (Plasminogen-binding protein)	ENO1	434	0,509589968	-0,972591219	UNCHANGED
Q86UP2	5	2	Kinectin (CG-1 antigen) (Kinesin receptor)	KTNI	1357	0,452766207	-1,143161811	DOWN
Q86XA9	8	3	HEAT repeat-containing protein 5A	HEATR5A	2040	0,446657797	-1,162738149	DOWN
E9PBC6	21	1	Transforming acidic coiled-coil-containing protein 2	TACC2	2875	0,393507868	-1,345535613	DOWN
P04083	8	5	Annexin A1 (Annexin I) (Annexin-1) (Calpactin II) (Calpactin-2) (Chromobindin-9) (Lipocortin I) (Phospholipase A2 inhibitory protein) (p35)	ANXA1	346	0,381913428	-1,388682449	DOWN
Q96JB5	4	2	CDK5 regulatory subunit-associated protein 3 (CDK5 activator-binding protein C53) (LXXLL/leucine-zipper-containing ARF-binding protein) (Protein HSF-27)	CDK5RAP3	506	0,293682404	-1,767671266	DOWN
Q8WYP5	7	5	Protein ELYS (Embryonic large molecule derived from yolk sac) (Protein MEL-28) (Putative AT-hook-containing transcription factor 1)	AHCTF1	2266	0,192908777	-2,374009311	DOWN
F2Z2U4	15	9	Transformation/transcription domain-associated protein	TRRAP	3848	0,154618833	-2,693212041	DOWN
Q9C0D5	4	3	Protein TANC1 (Tetratricopeptide repeat, ankyrin repeat and coiled-coil domain-containing protein 1)	TANC1	1861	0,140880679	-2,827454327	DOWN

Q71D13	12	1	Histone H3.2 (Histone H3/m) (Histone H3/o)	HIST2H3A	136	0,136716182	-2,870744077	DOWN
P23246	5	3	Splicing factor, proline- and glutamine-rich (100 kDa DNA-pairing protein) (hPOMp100) (DNA-binding p52/p100 complex, 100 kDa subunit) (Polypyrimidine tract-binding protein-associated-splicing factor) (PSF) (PTB-associated-splicing factor)	SFPQ	707	0,132430734	-2,916690122	DOWN
Q14416	5	4	Metabotropic glutamate receptor 2 (mGluR2)	GRM2	872	0,128748989	-2,957366993	DOWN
Q4G0P3	17	13	Hydrocephalus-inducing protein homolog	HYDIN	5121	0,121277755	-3,043613139	DOWN
P17066	15	4	Heat shock 70 kDa protein 6 (Heat shock 70 kDa protein B')	HSPA6	643	0,119870815	-3,060447641	DOWN
P04075	23	16	Fructose-bisphosphate aldolase A (EC 4.1.2.13) (Lung cancer antigen NY-LU-1) (Muscle-type aldolase)	ALDOA	364	0,116521228	-3,101335287	DOWN
P14618	35	22	Pyruvate kinase PKM (EC 2.7.1.40) (Cytosolic thyroid hormone-binding protein) (CTHBP) (Opa-interacting protein 3) (OIP-3) (Pyruvate kinase 2/3) (Pyruvate kinase muscle isozyme) (Thyroid hormone-binding protein 1) (THBP1) (Tumor M2-PK) (p58)	PKM	531	0,009598112	-6,703033593	DOWN

Proteínas super-expressas (*up-regulated- UP*) valor de FoldLog2 > 1; proteínas sub-expressas (*down-regulated- DOWN*) valor de FoldLog2 < -1 e proteínas sem expressão diferencial (*unchanged - UNCHANGED*) valor de FoldLog2 no intervalo -1 < FoldLog2 < 1.

Tabela suplementar 4. Lista de proteínas quantificadas no tratamento com NOC em 24 horas. Do total de 137 proteínas, 25 foram superexpressas (*up-regulated*), 31 subexpressas (*down-regulated*) e 81 não foram diferencialmente expressas (*unchanged*).

Entrada	Peptídeos contados	Peptídeos Únicos	Nomes Proteínas	Gene	Comprimento	FoldChange	FoldLog2	Status
P22626	16	10	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 (hnRNP A2/B1)	HNRNPA2B1	353	6,115593073	2,612492414	UP
F2Z2U4	15	9	Transformation/transcription domain-associated protein	TRRAP	3848	5,008590654	2,324404707	UP
Q4G0P3	17	13	Hydrocephalus-inducing protein homolog	HYDIN	5121	4,377875377	2,130230886	UP
Q9BUF5	11	1	Tubulin beta-6 chain (Tubulin beta class V)	TUBB6	446	4,128236688	2,045525689	UP
Q32Q12	15	12	Nucleoside diphosphate kinase (EC 2.7.4.6)	NME1-NME2	292	4,044123886	2,015827193	UP
E7EPJ7	8	7	Triple functional domain protein (Fragment)	TRIO	2546	3,789500948	1,922007867	UP
Q9BV73	30	18	Centrosome-associated protein CEP250 (250 kDa centrosomal protein) (Cep250) (Centrosomal Nek2-associated protein 1) (C-Nap1) (Centrosomal protein 2)	CEP250	2442	3,717455461	1,894315457	UP
P26038	12	6	Moesin (Membrane-organizing extension spike protein)	MSN	577	3,55606487	1,830281642	UP
Q8WUM4	5	4	Programmed cell death 6-interacting protein (PDCD6-interacting protein) (ALG-2-interacting protein 1) (ALG-2-interacting protein X) (Hp95)	PDCD6IP	868	3,456114212	1,789150894	UP
Q96T76	4	3	MMS19 nucleotide excision repair protein homolog (hMMS19) (MET18 homolog) (MMS19-like protein)	MMS19	1030	3,246900024	1,699062963	UP
Q7Z6Z7	10	8	E3 ubiquitin-protein ligase HUWE1 (EC 6.3.2.-) (ARF-binding protein 1) (ARF-BP1) (HECT, UBA and WWE domain-containing protein 1) (Homologous to E6AP carboxyl terminus homologous protein 9) (HectH9) (Large structure of UREB1) (LASU1) (Mcl-1 ubiquitin ligase E3) (Mule) (Upstream regulatory element-binding protein 1) (URE-B1) (URE-binding protein 1)	HUWE1	4374	2,990042885	1,580166177	UP
Q15049	4	4	Membrane protein MLC1	MLC1	377	2,979841426	1,575235559	UP
Q8N2C7	5	3	Protein unc-80 homolog	UNC80	3258	2,648290343	1,4050613	UP
Q709F0	5	2	Acyl-CoA dehydrogenase family member 11 (ACAD-11) (EC 1.3.99.-)	ACAD11	780	2,630266771	1,39520913	UP
Q71DI3	12	1	Histone H3.2 (Histone H3/m) (Histone H3/o)	HIST2H3A	136	2,578163334	1,366343665	UP
P63261	60	9	Actin, cytoplasmic 2 (Gamma-actin) [Cleaved into: Actin, cytoplasmic 2, N-terminally processed]	ACTG1	375	2,510105542	1,327748026	UP
Q13315	16	12	Serine-protein kinase ATM (EC 2.7.1.1) (Ataxia telangiectasia mutated) (A-T mutated)	ATM	3056	2,322485643	1,215669678	UP
Q16777	26	14	Histone H2A type 2-C (Histone H2A-GL101) (Histone H2A,q)	HIST2H2AC	129	2,260470592	1,176623149	UP

Q2M1P5	6	3	Kinesin-like protein KIF7	KIF7	1343	2,248775223	1,169139463	UP
P17066	15	4	Heat shock 70 kDa protein 6 (Heat shock 70 kDa protein B)	HSPA6	643	2,244708548	1,166528138	UP
P38646	12	7	Stress-70 protein, mitochondrial (75 kDa glucose-regulated protein) (GRP-75) (Heat shock 70 kDa protein 9) (Mortalin) (MOT) (Peptide-binding protein 74) (PBP74)	HSPA9	679	2,235504318	1,160600332	UP
Q5T200	22	12	Zinc finger CCH domain-containing protein 13	ZC3H13	1668	2,166079334	1,115086084	UP
Q14315	5	4	Filamin-C (FLN-C) (FLNc) (ABP-280-like protein) (ABP-L) (Actin-binding-like protein) (Filamin-2) (Gamma-filamin)	FLNC	2725	2,147672679	1,102774132	UP
P02549	8	6	Spectrin alpha chain, erythrocytic 1 (Erythroid alpha-spectrin)	SPTA1	2419	2,076228576	1,053965281	UP
P17987	4	4	T-complex protein 1 subunit alpha (TCP-1-alpha) (CCT-alpha)	TCP1	556	2,071273516	1,050518077	UP
K7EK07	12	1	Histone H3 (Fragment)	H3F3B	132	1,997642198	0,998298202	UNCHANGED
Q5TEC6	10	2	Histone H3	HIST2H3PS2	136	1,990213553	0,992923243	UNCHANGED
Q8NI35	6	2	InaD-like protein (Inadl protein) (hINADL) (Pals1-associated tight junction protein) (Protein associated to tight junctions)	INADL	1801	1,953284738	0,965902272	UNCHANGED
P30405	5	3	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase F, mitochondrial (PPIase F) (EC 5.2.1.8) (Cyclophilin D) (Cyp-D) (CypD) (Cyclophilin F) (Mitochondrial cyclophilin) (Cyp-M) (Rotamase F)	PIPF	207	1,9495356	0,9631305	UNCHANGED
P61978	7	1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP K) (Transformation up-regulated nuclear protein) (TUNP)	HNRNPK	463	1,903454772	0,92862029	UNCHANGED
O14795	7	4	Protein unc-13 homolog B (Munc13-2) (munc13)	UNC13B	1591	1,868301891	0,901727593	UNCHANGED
H7BY63	4	2	Protein FAM184A	FAM184A	936	1,847650678	0,885692023	UNCHANGED
Q9HCK8	4	3	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 8 (CHD-8) (EC 3.6.4.12) (ATP-dependent helicase CHD8) (Helicase with SNF2 domain 1)	CHD8	2581	1,825438022	0,868242686	UNCHANGED
Q86XA9	8	3	HEAT repeat-containing protein 5A	HEATR5A	2040	1,810670439	0,856523984	UNCHANGED
Q92817	6	2	Envoplakin (210 kDa cornified envelope precursor protein) (210 kDa paraneoplastic pemphigus antigen) (p210)	EVPL	2033	1,804900067	0,851918961	UNCHANGED
Q8WYP5	7	5	Protein ELYS (Embryonic large molecule derived from yolk sac) (Protein MEL-28) (Putative AT-hook-containing transcription factor 1)	AHC TF1	2266	1,789130313	0,839258471	UNCHANGED
Q12802	9	4	A-kinase anchor protein 13 (AKAP-13) (AKAP-Lbc) (Breast cancer nuclear receptor-binding auxiliary protein) (Guanine nucleotide exchange factor Lbc) (Human thyroid-anchoring protein 31) (Lymphoid blast crisis oncogene) (LBC oncogene) (Non-oncogenic Rho GTPase-specific GTP exchange factor) (Protein kinase A-anchoring protein 13) (PRKA13) (p47)	AKAP13	2813	1,781835587	0,833364223	UNCHANGED
P10412	9	1	Histone H1.4 (Histone H1b) (Histone H1s-4)	HIST1H1E	219	1,771584963	0,825040657	UNCHANGED

P11532	20	11	Dystrophin	DMD	3685	1,759487791	0,815155504	UNCHANGED
H0YNP5	12	1	Annexin (Fragment)	ANXA2	175	1,750186315	0,807508511	UNCHANGED
P0CG39	32	2	POTE ankyrin domain family member J	POTEJ	1038	1,685644489	0,753300064	UNCHANGED
Q9UG01	8	4	Intraflagellar transport protein 172 homolog	IFT172	1749	1,68137984	0,74964568	UNCHANGED
Q5VT06	11	7	Centrosome-associated protein 350 (Cep350) (Centrosome-associated protein of 350 kDa)	CEP350	3117	1,59234229	0,671150491	UNCHANGED
Q9UPV9	6	4	Trafficking kinesin-binding protein 1 (106 kDa O-GlcNAc transferase-interacting protein)	TRAK1	953	1,57896368	0,658977986	UNCHANGED
A0A0C4DG17	5	5	40S ribosomal protein SA (37 kDa laminin receptor precursor) (37/67 kDa laminin receptor) (67 kDa laminin receptor) (Laminin receptor 1) (Laminin-binding protein precursor p40)	RPSA	300	1,534309633	0,617589657	UNCHANGED
Q9P2N2	4	3	Rho GTPase-activating protein 28 (Rho-type GTPase-activating protein 28)	ARHGAP28	729	1,500996882	0,58592098	UNCHANGED
Q9C0D5	4	3	Protein TANC1 (Tetratricopeptide repeat, ankyrin repeat and coiled-coil domain-containing protein 1)	TANC1	1861	1,4864376	0,5718589	UNCHANGED
Q9NR09	14	6	Baculoviral IAP repeat-containing protein 6 (EC 6.3.2.-) (BIR repeat-containing ubiquitin-conjugating enzyme) (BRUCE) (Ubiquitin-conjugating BIR domain enzyme apollon) (APOLLON)	BIRC6	4857	1,482843499	0,568366342	UNCHANGED
P04406	33	23	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (EC 1.2.1.12) (Peptidyl-cysteine S-nitrosylase GAPDH) (EC 2.6.99.-)	GAPDH	335	1,390395036	0,475494836	UNCHANGED
M0QXS5	4	3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L (Fragment)	HNRNPL	530	1,362459473	0,446213317	UNCHANGED
P49321	4	2	Nuclear autoantigenic sperm protein (NASP)	NASP	788	1,343345327	0,425830218	UNCHANGED
P09382	5	3	Galactin-1 (Gal-1) (14 kDa laminin-binding protein) (HLBP14) (14 kDa lectin) (Beta-galactoside-binding lectin L-14-1) (Galaptin) (HBL) (HPL) (Lactose-binding lectin 1) (Lectin galactoside-binding soluble 1) (Putative MAPK-activating protein PM12) (S-Lac lectin 1)	LGALS1	135	1,314090453	0,394064584	UNCHANGED
J3QKN0	4	3	Polyubiquitin-B (Fragment)	UBB	206	1,293804265	0,371619374	UNCHANGED
P18615	6	3	Negative elongation factor E (NELF-E) (RNA-binding protein RD)	NELFE	380	1,29035562	0,367768725	UNCHANGED
Q06830	18	3	Peroxioredoxin-1 (EC 1.1.1.15) (Natural killer cell-enhancing factor A) (NKEF-A) (Proliferation-associated gene protein) (PAG) (Thioredoxin peroxidase 2) (Thioredoxin-dependent peroxide reductase 2)	PRDX1	199	1,212378311	0,277839948	UNCHANGED
Q86UP2	5	2	Kinectin (CG-1 antigen) (Kinesin receptor)	KTNI	1357	1,207952535	0,272563767	UNCHANGED
P07737	8	4	Profilin-1 (Epididymis tissue protein Li 184a) (Profilin 1)	PFN1	140	1,197439554	0,259952831	UNCHANGED
Q12873	5	3	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 3 (CHD-3) (EC 3.6.4.12) (ATP-dependent helicase CHD3) (Mi-2 autoantigen 240 kDa protein) (Mi2-alpha) (Zinc finger helicase) (hZFH)	CHD3	2000	1,186906021	0,247205707	UNCHANGED

Q96Q05	7	4	Trafficking protein particle complex subunit 9 (NIK- and IKKB-binding protein) (Tularik gene 1 protein)	TRAPPC9	1148	1,177377447	0,235576898	UNCHANGED
Q15149	73	48	Plectin (PCN) (PLTN) (Hemidesmosomal protein 1) (HD1) (Plectin-1)	PLEC	4684	1,153634071	0,206185678	UNCHANGED
A0A087WT T1	5	2	Polyadenylate-binding protein (PABP)	PABPC1	522	1,151872142	0,203980586	UNCHANGED
P07954	4	3	Fumarate hydratase, mitochondrial (Fumarase) (EC 4.2.1.2)	FH	510	1,150457586	0,202207796	UNCHANGED
Q92547	6	2	DNA topoisomerase 2-binding protein 1 (DNA topoisomerase II-beta-binding protein 1) (TopBP1) (DNA topoisomerase II-binding protein 1)	TOPBP1	1522	1,145948594	0,196542327	UNCHANGED
P15144	4	4	Aminopeptidase N (AP-N) (hAPN) (EC 3.4.11.2) (Alanyl aminopeptidase) (Aminopeptidase M) (AP-M) (Microsomal aminopeptidase) (Mycloid plasma membrane glycoprotein CD13) (gp150) (CD antigen CD13)	ANPEP	967	1,144234161	0,194382322	UNCHANGED
P58876	19	2	Histone H2B type 1-D (HIRA-interacting protein 2) (Histone H2B.1 B) (Histone H2B.b) (H2B/b)	HIST1H2BD	126	1,126149487	0,171398346	UNCHANGED
Q7Z406	5	2	Myosin-14 (Myosin heavy chain 14) (Myosin heavy chain, non-muscle IIc) (Non-muscle myosin heavy chain IIc) (NMHC II-C)	MYH14	1995	1,108687335	0,148852563	UNCHANGED
Q6S8J3	33	1	POTE ankyrin domain family member E (ANKRD26-like family C member 1A) (Prostate, ovary, testis-expressed protein on chromosome 2) (POTE-2)	POTEE	1075	1,086024628	0,111905682	UNCHANGED
Q96J17	10	6	Spatacsin (Colorectal carcinoma-associated protein) (Spastic paraplegia 11 protein)	SPG11	2443	1,085040988	0,117749542	UNCHANGED
Q96RL7	4	2	Vacuolar protein sorting-associated protein 13A (Chorea-acanthocytosis protein) (Chorein)	VPS13A	3174	1,06962871	0,097110095	UNCHANGED
Q9P219	5	4	Protein Daple (Coiled-coil domain-containing protein 88C) (Dvl-associating protein with a high frequency of leucine residues) (hDaple) (Hook-related protein 2) (HRRP2)	CCDC88C	2028	1,027013927	0,038455746	UNCHANGED
P38159	5	1	RNA-binding motif protein, X chromosome (Glycoprotein p43) (Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G) (hnRNP G) [Cleaved into: RNA-binding motif protein, X chromosome, N-terminally processed]	RBMX	391	1,018427406	0,026343148	UNCHANGED
Q8NF50	11	6	Dedicator of cytokinesis protein 8	DOCK8	2099	0,994160476	-0,008449347	UNCHANGED
Q70CQ2	9	6	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 34 (EC 3.4.19.12) (Deubiquitinating enzyme 34) (Ubiquitin thioesterase 34) (Ubiquitin-specific-processing protease 34)	USP34	3546	0,993800571	-0,008971723	UNCHANGED
A1KZ92	4	3	Peroxidasin-like protein (EC 1.1.1.7) (Cardiac peroxidase) (Vascular peroxidase 2) (polyosomal ribonuclease 1) (PRM1)	PXDNL	1463	0,98188022	-0,026381054	UNCHANGED
Q9Y520	10	5	Protein PRRC2C (BAT2 domain-containing protein 1) (HBV X-transactivated gene 2 protein) (HBV XAg-transactivated protein 2) (HLA-B-associated transcript 2-like 2) (Proline-rich and coiled-coil-	PRRC2C	2896	0,971762914	-0,04132372	UNCHANGED

containing protein 2C)								
Q96JB5	4	2	CDK5 regulatory subunit-associated protein 3 (CDK5 activator-binding protein C53) (LXXLL/leucine-zipper-containing ARF-binding protein) (Protein HSF-27)	CDK5RAP3	506	0,969323079	-0,044950494	UNCHANGED
P07205	9	4	Phosphoglycerate kinase 2 (EC 2.7.2.3) (Phosphoglycerate kinase, testis specific)	PGK2	417	0,967152073	-0,048185341	UNCHANGED
Q92620	4	2	Pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase PRP16 (EC 3.6.4.13) (ATP-dependent RNA helicase DHX38) (DEAH box protein 38)	DHX38	1227	0,965717725	-0,050326538	UNCHANGED
E7EVA0	20	11	Microtubule-associated protein	MAP4	2297	0,963484728	-0,053666296	UNCHANGED
P23246	5	3	Splicing factor, proline- and glutamine-rich (100 kDa DNA-pairing protein) (hPOMP100) (DNA-binding p52/p100 complex, 100 kDa subunit) (Polypyrimidine tract-binding protein-associated-splicing factor) (PSF) (PTB-associated-splicing factor)	SFPQ	707	0,962093749	-0,055750613	UNCHANGED
B4DY08	7	4	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2 (cDNA FLJ53542, highly similar to Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C)	HNRNPC	288	0,936006244	-0,095409941	UNCHANGED
P04075	23	16	Fructose-bisphosphate aldolase A (EC 4.1.2.13) (Lung cancer antigen NY-LU-1) (Muscle-type aldolase)	ALDOA	364	0,92331542	-0,115104514	UNCHANGED
E7EPU2	6	4	Disco-interacting protein 2 homolog C	DIP2C	1537	0,889787582	-0,168467131	UNCHANGED
P10809	40	30	60 kDa heat shock protein, mitochondrial (60 kDa chaperonin) (Chaperonin 60) (CPN60) (Heat shock protein 60) (HSP-60) (Hsp60) (HuCHA60) (Mitochondrial matrix protein P1) (P60 lymphocyte protein)	HSPD1	573	0,865445183	-0,208485653	UNCHANGED
Q86VP6	5	3	Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1 (Cullin-associated and neddylation-dissociated protein 1) (TBP-interacting protein of 120 kDa A) (TBP-interacting protein 120A) (p120 CAND1)	CAND1	1230	0,845771585	-0,241660003	UNCHANGED
Q96M86	6	4	Dynein heavy chain domain-containing protein 1 (Dynein heavy chain domain 1-like protein) (Protein CCDC35)	DNHD1	4753	0,842452806	-0,247332225	UNCHANGED
Q6ZT98	4	2	Tubulin polyglutamylase TTL7 (EC 6.-.-) (Testis development protein NYD-SF30) (Tubulin--tyrosine ligase-like protein 7)	TTL7	887	0,832108489	-0,265156458	UNCHANGED
K7EJU1	5	2	Glial fibrillary acidic protein (Fragment)	GFAP	248	0,811462987	-0,301402804	UNCHANGED
Q99996	17	11	A-kinase anchor protein 9 (AKAP-9) (A-kinase anchor protein 350 kDa) (AKAP 350) (hgAKAP 350) (A-kinase anchor protein 450 kDa) (AKAP 450) (AKAP 120-like protein) (Centrosome- and Golgi-localized PKN-associated protein) (CG-NAP) (Protein hypertion) (Protein kinase A-anchoring protein 9) (PRKA9) (Protein yotiao)	AKAP9	3911	0,809000067	-0,305787198	UNCHANGED
Q5T6W2	7	1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (Fragment)	HNRNPK	379	0,804218792	-0,314340047	UNCHANGED
E7ETZ7	4	3	Histone-lysine N-methyltransferase 2E	KMT2E	1778	0,796205002	-0,328788161	UNCHANGED

P54652	19	5	Heat shock-related 70 kDa protein 2 (Heat shock 70 kDa protein 2)	HSPA2	639	0,755365579	-0,404753051	UNCHANGED
P08238	46	13	Heat shock protein HSP 90-beta (HSP 90) (Heat shock 84 kDa) (HSP 84) (HSP84)	HSP90AB1	724	0,747752094	-0,419368049	UNCHANGED
Q99666	6	1	RANBP2-like and GRIP domain-containing protein 5/6 (Ran-binding protein 2-like 1/2) (RanBP2-like 1/2) (RanBP2L1) (RanBP2L2) (Sperm membrane protein BS-63)	RGPD5	1765	0,724592136	-0,464758947	UNCHANGED
Q13838	5	2	Spliceosome RNA helicase DDX39B (EC 3.6.4.13) (56 kDa U2AF65-associated protein) (ATP-dependent RNA helicase p47) (DEAD box protein UAP56) (HLA-B-associated transcript 1 protein)	DDX39B	428	0,720842099	-0,472244825	UNCHANGED
P17480	4	2	Nucleolar transcription factor 1 (Autoantigen NOR-90) (Upstream-binding factor 1) (UBF-1)	UBTF	764	0,707998025	-0,49818276	UNCHANGED
O15014	5	3	Zinc finger protein 609	ZNF609	1411	0,706624815	-0,500983681	UNCHANGED
Q13535	13	9	Serine/threonine-protein kinase ATR (EC 2.7.11.1) (Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein) (FRAP-related protein 1)	ATR	2644	0,683850271	-0,548247614	UNCHANGED
G3V5X7	5	2	Telomerase protein component 1	TEP1	2519	0,682038897	-0,552074075	UNCHANGED
P14625	24	13	Endoplasmic reticulum chaperone protein 94 kDa glucose-regulated protein (GRP-94) (Heat shock protein 90 kDa beta member 1) (Tumor rejection antigen 1) (gp96 homolog)	HSP90B1	803	0,669289908	-0,579296835	UNCHANGED
E9PBC6	21	1	Transforming acidic coiled-coil-containing protein 2	TACC2	2875	0,575085016	-0,798152847	UNCHANGED
Q9P225	24	15	Dynein heavy chain 2, axonemal (Axonemal beta dynein heavy chain 2) (Ciliary dynein heavy chain 2) (Dynein heavy chain domain-containing protein 3)	DNAH2	4427	0,573193436	-0,802906007	UNCHANGED
P04083	8	5	Annexin A1 (Annexin I) (Annexin-1) (Calpactin II) (Calpactin-2) (Chromobindin-9) (Lipocortin 1) (Phospholipase A2 inhibitory protein) (p35)	ANXA1	346	0,562598888	-0,829821395	UNCHANGED
P31942	4	3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3 (hnRNP H3) (Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein 2H9) (hnRNP 2H9)	HNRNPH3	346	0,544971056	-0,875748485	UNCHANGED
P0DMV8	19	9	Heat shock 70 kDa protein 1A (Heat shock 70 kDa protein 1) (HSP70-1) (HSP70.1)	HSPA1A	641	0,524923243	-0,929821616	UNCHANGED
Q13263	8	5	Transcription intermediary factor 1-beta (TIF1-beta) (E3 SUMO-protein ligase TRIM28) (EC 6.3.2.-) (KRAB-associated protein 1) (KAP-1) (KRAB-interacting protein 1) (KRIP-1) (Nuclear corepressor KAP-1) (RING finger protein 96) (Tripartite motif-containing protein 28)	TRIM28	835	0,502697193	-0,992238463	UNCHANGED
Q9NTJ3	4	3	Structural maintenance of chromosomes protein 4 (SMC protein 4) (SMC-4) (Chromosome-associated polypeptide C) (hCAP-C) (XCAP-C homolog)	SMC4	1288	0,469356495	-1,09124397	DOWN
Q9NYC9	13	8	Dynein heavy chain 9, axonemal (Axonemal beta dynein heavy chain 9) (Ciliary dynein heavy chain 9)	DNAH9	4486	0,462035086	-1,113925684	DOWN

G3XAE9	5	3	KIAA0423, isoform CRA_a (Protein FAMI79B)	FAMI79B	1773	0,459735506	-1,121124003	DOWN
Q8IWIJ	10	5	GRIP and coiled-coil domain-containing protein 2 (185 kDa Golgi coiled-coil protein) (GCC185) (CLL-associated antigen KW-11) (CTCL tumor antigen sel-1) (Ran-binding protein 2-like 4) (RanBP2L4) (Renal carcinoma antigen NY-REN-53)	GCC2	1684	0,431631746	-1,212127118	DOWN
Q9UKX2	7	3	Myosin-2 (Myosin heavy chain 2) (Myosin heavy chain 2a) (MyHC-2a) (Myosin heavy chain IIa) (MyHC-IIa) (Myosin heavy chain, skeletal muscle, adult 2)	MYH2	1941	0,411182733	-1,27988852	DOWN
Q15643	4	2	Thyroid receptor-interacting protein 11 (TR-interacting protein 11) (TRIP-11) (Clonal evolution-related gene on chromosome 14 protein) (Golgi-associated microtubule-binding protein 210) (GMAP-210) (Trip230)	TRIP11	1979	0,387564291	-1,367492444	DOWN
P14618	35	22	Pyruvate kinase PKM (EC 2.7.1.40) (Cytosolic thyroid hormone-binding protein) (CTHBP) (Opa-interacting protein 3) (OIP-3) (Pyruvate kinase 2/3) (Pyruvate kinase muscle isozyme) (Thyroid hormone-binding protein 1) (THBP1) (Tumor M2-PK) (p58)	PKM	531	0,386716352	-1,370652325	DOWN
P11137	12	7	Microtubule-associated protein 2 (MAP-2)	MAP2	1827	0,355047286	-1,493916918	DOWN
E9PK25	13	7	Cofilin-1	CFL1	204	0,345971715	-1,531274001	DOWN
P42338	6	4	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit beta isoform (PI3-kinase subunit beta) (PI3K-beta) (PI3Kbeta) (PtdIns-3-kinase subunit beta) (EC 2.7.1.153) (Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase 110 kDa catalytic subunit beta) (PtdIns-3-kinase subunit p110-beta) (p110beta)	PIK3CB	1070	0,322936287	-1,630678535	DOWN
P07237	5	4	Protein disulfide-isomerase (PDI) (EC 5.3.4.1) (Cellular thyroid hormone-binding protein) (Prolyl 4-hydroxylase subunit beta) (p55)	P4HB	508	0,314294712	-1,669810098	DOWN
P16144	4	4	Integrin beta-4 (GP150) (CD antigen CD104)	ITGB4	1822	0,304046768	-1,717634842	DOWN
Q12923	8	4	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 13 (EC 3.1.3.48) (Fas-associated protein-tyrosine phosphatase 1) (FAP-1) (PTP-BAS) (Protein-tyrosine phosphatase 1E) (PTP-E1) (hPTPE1) (Protein-tyrosine phosphatase PTPL1)	PTPN13	2485	0,296898657	-1,751957525	DOWN
P15311	7	5	Ezrin (Cytovillin) (Villin-2) (p81)	EZR	586	0,272021235	-1,878208815	DOWN
Q14416	5	4	Metabotropic glutamate receptor 2 (mGluR2)	GRM2	872	0,270530193	-1,886138479	DOWN
E9PG32	5	2	Dynein heavy chain 12, axonemal	DNAH12	3960	0,270455693	-1,886535828	DOWN
Q8TDM6	5	3	Disks large homolog 5 (Disks large protein P-dlg) (Placenta and prostate DLG)	DLG5	1919	0,263854413	-1,922185981	DOWN
P08758	5	2	Annexin A5 (Anchorin CII) (Annexin V) (Annexin-5) (Calphobindin I) (CBP-I) (Endonexin II) (Lipocortin V) (Placental anticoagulant protein 4) (PP4) (Placental anticoagulant protein I) (PAP-I) (Thromboplastin inhibitor) (Vascular anticoagulant-alpha) (VAC-	ANXA5	320	0,242642473	-2,043095987	DOWN

alpha)										
P00558	34	25		Phosphoglycerate kinase 1 (EC 2.7.2.3) (Cell migration-inducing gene 10 protein) (Primer recognition protein 2) (PRP 2)	PGK1	417	0,230913279	-2,114576956		DOWN
O75643	4	2		U5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa helicase (EC 3.6.4.13) (Activating signal cointegrator 1 complex subunit 3-like 1) (BRR2 homolog) (U5 snRNP-specific 200 kDa protein) (U5-200KD)	SNRNP200	2136	0,22843474	-2,130146023		DOWN
Q92954	6	3		Proteoglycan 4 (Lubricin) (Megakaryocyte-stimulating factor) (Superficial zone proteoglycan) [Cleaved into: Proteoglycan 4 C-terminal part]	PRG4	1404	0,227862887	-2,133762132		DOWN
E7EMW7	11	9		E3 ubiquitin-protein ligase UBR5	UBR5	2792	0,217018433	-2,20411051		DOWN
F8VVM2	4	2		Phosphate carrier protein, mitochondrial	SLC25A3	324	0,206220125	-2,277742962		DOWN
A0A0C4DG K3	15	7		Nesprin-2	SYNE2	3541	0,205272785	-2,284385729		DOWN
B1AJZ9	6	1		Forkhead-associated domain-containing protein 1 (FHA domain-containing protein 1)	FHADI	1412	0,200984883	-2,314841104		DOWN
Q5THJ4	10	7		Vacuolar protein sorting-associated protein 13D	VPS13D	4388	0,188431711	-2,40788632		DOWN
P06733	47	32		Alpha-enolase (EC 4.2.1.11) (2-phospho-D-glycerate hydro-lyase) (C-myc promoter-binding protein) (Enolase 1) (MBP-1) (MPB-1) (Non-neutral enolase) (NNE) (Phosphopyruvate hydratase) (Plasminogen-binding protein)	ENO1	434	0,184217451	-2,440518362		DOWN
P68133	38	1		Actin, alpha skeletal muscle (Alpha-actin-1)	ACTA1	377	0,181671904	-2,460592771		DOWN
P62937	12	9		Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A (PPIase A) (EC 5.2.1.8) (Cyclophilin A) (Cyclosporin A-binding protein) (Rotamase A) [Cleaved into: Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A, N-terminally processed]	PPIA	165	0,162508436	-2,621413484		DOWN
P78527	9	6		DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (DNA-PK catalytic subunit) (DNA-PKcs) (EC 2.7.11.1) (DNPK1) (p460)	PRKDC	4128	0,160556581	-2,638846291		DOWN
P48643	11	5		T-complex protein 1 subunit epsilon (TCP-1-epsilon) (CCT-epsilon)	CCT5	541	0,130927856	-2,933156022		DOWN

Proteínas super-expressas (*up-regulated- UP*) valor de FoldLog2 > 1; proteínas sub-expressas (*down-regulated- DOWN*) valor de FoldLog2 < -1 e proteínas sem expressão diferencial (*unchanged - UNCHANGED*) valor de FoldLog2 no intervalo -1 < FoldLog2 < 1.

Tabela suplementar 5. Lista de proteínas quantificadas no tratamento com NOC em 48 horas. Do total de 137 proteínas, 05 foram superexpressas (*up-regulated*), 16 subexpressas (*down-regulated*) e 116 não foram diferencialmente expressas (*unchanged*).

Entrada	Peptídeos contados	Peptídeos Únicos	Nomes Proteínas	Gene	Comprimento	FoldChange	FoldLog2	Status
P49321	4	2	Nuclear autoantigenic sperm protein (NASP)	NASP	788	6,674002777	2,738552287	UP
P58876	19	2	Histone H2B type 1-D (HIRA-interacting protein 2) (Histone H2B.1 B) (Histone H2B.b) (H2B/b)	HIST1H2BD	126	5,963562434	2,576174406	UP
A1KZ92	4	3	Peroxidasin-like protein (EC 1.1.1.17) (Cardiac peroxidase) (Vascular peroxidase 2) (polysomal ribonuclease 1) (PRM1)	PXDNL	1463	4,487021491	2,165758094	UP
Q96T76	4	3	MMS19 nucleotide excision repair protein homolog (hMMS19) (MET18 homolog) (MMS19-like protein)	MMS19	1030	2,102323733	1,071984844	UP
P16144	4	4	Integrin beta-4 (GP150) (CD antigen CD104)	ITGB4	1822	2,04283554	1,030573063	UP
P42338	6	4	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit beta isoform (PI3-kinase subunit beta) (PI3K-beta) (PI3Kbeta) (PtdIns-3-kinase subunit beta) (EC 2.7.1.153) (Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase 110 kDa catalytic subunit beta) (PtdIns-3-kinase subunit p110-beta) (p110beta)	PIK3CB	1070	1,962207044	0,972477277	UNCHANGED
P17987	4	4	T-complex protein 1 subunit alpha (TCP-1-alpha) (CCT-alpha)	TCP1	556	1,764693152	0,819417347	UNCHANGED
K7EJU1	5	2	Glial fibrillary acidic protein (Fragment)	GFAP	248	1,740233839	0,799281177	UNCHANGED
E7ETZ7	4	3	Histone-lysine N-methyltransferase 2E	KMT2E	1778	1,693673428	0,760155723	UNCHANGED
P15144	4	4	Aminopeptidase N (AP-N) (hAPN) (EC 3.4.11.2) (Alanyl aminopeptidase) (Aminopeptidase M) (AP-M) (Microsomal aminopeptidase) (Myeloid plasma membrane glycoprotein CD13) (gp150) (CD antigen CD13)	ANPEP	967	1,692086806	0,758803582	UNCHANGED
Q32Q12	15	12	Nucleoside diphosphate kinase (EC 2.7.4.6)	NME1-NME2	292	1,676105355	0,745112836	UNCHANGED
P54652	19	5	Heat shock-related 70 kDa protein 2 (Heat shock 70 kDa protein 2)	HSPA2	639	1,512748772	0,597172414	UNCHANGED
Q15049	4	4	Membrane protein MLC1	MLC1	377	1,438818269	0,524884383	UNCHANGED
P31942	4	3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3 (hnRNP H3) (Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein 2H9) (hnRNP 2H9)	HNRNPH3	346	1,425704906	0,5111675402	UNCHANGED
Q96JI7	10	6	Spatacsin (Colorectal carcinoma-associated protein) (Spastic paraplegia 11 protein)	SPG11	2443	1,419001955	0,504876577	UNCHANGED
Q99666	6	1	RANBP2-like and GRIP domain-containing protein 5/6 (Ran-binding protein 2-like 1/2) (RanBP2-like 1/2)	RGPD5	1765	1,389617884	0,474688226	UNCHANGED

(RanBP2L1) (RanBP2L2) (Sperm membrane protein BS-63)								
Q8TDM6	5	3		DLG5	1919	1,338275891	0,420375564	UNCHANGED
Disks large homolog 5 (Disks large protein P-dlg) (Placenta and prostate DLG)								
Transcription intermediary factor 1-beta (TIF1-beta) (E3 SUMO-protein ligase TRIM28) (EC 6.3.2.-) (KRAB-associated protein 1) (KAP-1) (KRAB-interacting protein 1) (KRIP-1) (Nuclear corepressor KAP-1) (RING finger protein 96) (Tripartite motif-containing protein 28)								
Q13263	8	5		TRIM28	835	1,331487617	0,413039011	UNCHANGED
E9PK25								
	13	7		CFL1	204	1,300862254	0,379468206	UNCHANGED
Annexin A5 (Anchorin CII) (Annexin V) (Annexin-5) (Calphobindin I) (CBP-I) (Endonexin II) (Lipocortin V) (Placental anticoagulant protein 4) (PP4) (Placental anticoagulant protein I) (PAP-I) (Thromboplastin inhibitor) (Vascular anticoagulant-alpha) (VAC-alpha)								
P08758	5	2		ANXA5	320	1,287627035	0,364714774	UNCHANGED
Q92817								
	6	2		EVPL	2033	1,277346111	0,353149492	UNCHANGED
Envoplakin (210 kDa cornified envelope precursor protein) (210 kDa paraneoplastic pemphigus antigen) (p210)								
Q5VT06	11	7		CEP350	3117	1,267604704	0,342104919	UNCHANGED
Centrosome-associated protein 350 (Cep350) (Centrosome-associated protein of 350 kDa)								
Q5THJ4	10	7		VPS13D	4388	1,266654258	0,341022785	UNCHANGED
Vacuolar protein sorting-associated protein 13D								
P10412	9	1		HIST1H1E	219	1,246728238	0,31814702	UNCHANGED
Histone H1.4 (Histone H1b) (Histone H1s-4)								
H0YNP5	12	1		ANXA2	175	1,239584985	0,309857185	UNCHANGED
Annexin (Fragment)								
Q7Z406	5	2		MYH14	1995	1,224989123	0,29276894	UNCHANGED
Myosin-14 (Myosin heavy chain 14) (Myosin heavy chain, non-muscle IIc) (Non-muscle myosin heavy chain IIc) (NMHC II-C)								
K7EK07	12	1		H3F3B	132	1,208379262	0,27307333	UNCHANGED
Histone H3 (Fragment)								
P00558	34	25		PGK1	417	1,183789467	0,243412525	UNCHANGED
Phosphoglycerate kinase 1 (EC 2.7.2.3) (Cell migration-inducing gene 10 protein) (Primer recognition protein 2) (PRP 2)								
Q8WUM4	5	4		PDCD6IP	868	1,179570266	0,238261361	UNCHANGED
Programmed cell death 6-interacting protein (PDCD6-interacting protein) (ALG-2-interacting protein 1) (ALG-2-interacting protein X) (Hp95)								
Q8N2C7	5	3		UNC80	3258	1,172540025	0,22963717	UNCHANGED
Protein unc-80 homolog								
Galectin-1 (Gal-1) (14 kDa laminin-binding protein) (HLBP14) (14 kDa lectin) (Beta-galactoside-binding lectin L-14-1) (Galaplin) (HBL) (HPL) (Lactose-binding lectin 1) (Lectin galactoside-binding soluble 1) (Putative MAPK-activating protein PM12) (S-Lac lectin 1)								
P09382	5	3		LGALS1	135	1,169413385	0,22578501	UNCHANGED
P26038								
	12	6		MSN	577	1,161939204	0,216534584	UNCHANGED
Moesin (Membrane-organizing extension spike protein)								

P07205	9	4	Phosphoglycerate kinase 2 (EC 2.7.2.3) (Phosphoglycerate kinase, testis specific)	PGK2	417	1,160797707	0,215116575	UNCHANGED
Q9UJKX2	7	3	Myosin-2 (Myosin heavy chain 2) (Myosin heavy chain 2a) (MyHC-2a) (Myosin heavy chain IIa) (MyHC-IIa) (Myosin heavy chain, skeletal muscle, adult 2)	MYH2	1941	1,156397914	0,209637912	UNCHANGED
Q9BV73	30	18	Centrosome-associated protein CEP250 (250 kDa centrosomal protein) (Cep250) (Centrosomal Nek2-associated protein 1) (C-Nap1) (Centrosomal protein 2)	CEP250	2442	1,154483288	0,207247289	UNCHANGED
P48643	11	5	T-complex protein 1 subunit epsilon (TCP-1-epsilon) (CCT-epsilon)	CCT5	541	1,152639815	0,20494176	UNCHANGED
Q9NYC9	13	8	Dynein heavy chain 9, axonemal (Axonemal beta dynein heavy chain 9) (Ciliary dynein heavy chain 9)	DNAH9	4486	1,150820913	0,202663344	UNCHANGED
Q13315	16	12	Serine-protein kinase ATM (EC 2.7.1.1) (Ataxia telangiectasia mutated) (A-T mutated)	ATM	3056	1,143461732	0,193408084	UNCHANGED
Q8NF50	11	6	Dedicator of cytokinesis protein 8	DOCK8	2099	1,137237332	0,185533364	UNCHANGED
Q7Z6Z7	10	8	E3 ubiquitin-protein ligase HUWE1 (EC 6.3.2.-) (ARF-binding protein 1) (ARF-BP1) (HECT, UBA and WWE domain-containing protein 1) (Homologous to EgAP carboxyl terminus homologous protein 9) (HectH9) (Large structure of UREB1) (LASU1) (Mcl-1 ubiquitin ligase E3) (Mule) (Upstream regulatory element-binding protein 1) (URE-B1) (URE-binding protein 1)	HUWE1	4374	1,129641074	0,175864452	UNCHANGED
Q9HCK8	4	3	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 8 (CHD-8) (EC 3.6.4.12) (ATP-dependent helicase CHD8) (Helicase with SNF2 domain 1)	CHD8	2581	1,129069062	0,175133735	UNCHANGED
P22626	16	10	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 (hnRNP A2/B1)	HNRNPA2B1	353	1,125770652	0,170912944	UNCHANGED
Q99996	17	11	A-kinase anchor protein 9 (AKAP-9) (A-kinase anchor protein 350 kDa) (AKAP 350) (hgAKAP 350) (A-kinase anchor protein 450 kDa) (AKAP 450) (AKAP 120-like protein) (Centrosome- and Golgi-localized PKN-associated protein) (CG-NAP) (Protein hyperion) (Protein kinase A-anchoring protein 9) (PRKA9) (Protein_yotiao)	AKAP9	3911	1,121352104	0,165239355	UNCHANGED
Q15149	73	48	Plectin (PCN) (PLTN) (Hemidesmosomal protein 1) (HD1) (Plectin-1)	PLEC	4684	1,121027605	0,164821805	UNCHANGED
G3V5X7	5	2	Telomerase protein component 1	TEP1	2519	1,120271854	0,16384887	UNCHANGED
P17480	4	2	Nucleolar transcription factor 1 (Autoantigen NOR-90) (Upstream-binding factor 1) (UBF-1)	UBTF	764	1,116024366	0,158368526	UNCHANGED
Q9UPV9	6	4	Trafficking kinesin-binding protein 1 (106 kDa O-GlcNAc transferase-interacting protein)	TRAK1	953	1,113396419	0,154967348	UNCHANGED

P18615	6	3	Negative elongation factor E (NELF-E) (RNA-binding protein RD)	NELFE	380	1,110158077	0,150765118	UNCHANGED
B1AJZ9	6	1	Forkhead-associated domain-containing protein 1 (FHA domain-containing protein 1)	FHAD1	1412	1,108826732	0,149033944	UNCHANGED
Q12873	5	3	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 3 (CHD-3) (EC 3.6.4.12) (ATP-dependent helicase CHD3) (Mi-2 autoantigen 240 kDa protein) (Mi2-alpha) (Zinc finger helicase) (hZFH)	CHD3	2000	1,105617063	0,144851786	UNCHANGED
O15014	5	3	Zinc finger protein 609	ZNF609	1411	1,10509073	0,144164822	UNCHANGED
Q92954	6	3	Proteoglycan 4 (Lubricin) (Megakaryocyte-stimulating factor) (Superficial zone proteoglycan) [Cleaved into: Proteoglycan 4 C-terminal part]	PRG4	1404	1,104334242	0,143176889	UNCHANGED
Q8NI35	6	2	InaD-like protein (Inadl protein) (hINADL) (Pals 1-associated tight junction protein) (Protein associated to tight junctions)	INADL	1801	1,099256436	0,136527979	UNCHANGED
P61978	7	1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP K) (Transformation up-regulated nuclear protein) (TUNP)	HNRNPK	463	1,094545238	0,130331582	UNCHANGED
Q06830	18	3	Peroxiredoxin-1 (EC 1.11.1.15) (Natural killer cell-enhancing factor A) (NKEF-A) (Proliferation-associated gene protein) (PAG) (Thioredoxin peroxidase 2) (Thioredoxin-dependent peroxide reductase 2)	PRDX1	199	1,080992265	0,1123562	UNCHANGED
P62937	12	9	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A (PPIase A) (EC 5.2.1.8) (Cyclophilin A) (Cyclosporin A-binding protein) (Rotamase A) [Cleaved into: Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A, N-terminally processed]	PPIA	165	1,070783257	0,098666486	UNCHANGED
Q92620	4	2	Pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase PRP16 (EC 3.6.4.13) (ATP-dependent RNA helicase DHX38) (DEAH box protein 38)	DHX38	1227	1,069360463	0,096748242	UNCHANGED
P04406	33	23	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (EC 1.2.1.12) (Peptidyl-cysteine S-nitrosylase GAPDH) (EC 2.6.99.-)	GAPDH	335	1,066594253	0,093011459	UNCHANGED
Q14315	5	4	Filamin-C (FLN-C) (FLNc) (ABP-280-like protein) (ABP-L) (Actin-binding-like protein) (Filamin-2) (Gamma-filamin)	FLNC	2725	1,06405765	0,089576318	UNCHANGED
P08238	46	13	Heat shock protein HSP 90-beta (HSP 90) (Heat shock 84 kDa) (HSP 84) (HSP84)	HSP90AB1	724	1,062185745	0,087036073	UNCHANGED
P0DMV8	19	9	Heat shock 70 kDa protein 1A (Heat shock 70 kDa protein 1) (HSP70-1) (HSP70.1)	HSPA1A	641	1,058359728	0,081830072	UNCHANGED
Q9UG01	8	4	Intraflagellar transport protein 172 homolog	IFT172	1749	1,034796014	0,049346402	UNCHANGED
P07737	8	4	Profilin-1 (Epididymis tissue protein L1 184a) (Profilin I)	PFN1	140	1,032193202	0,045713034	UNCHANGED
Q5T200	22	12	Zinc finger CCHC domain-containing protein 13	ZC3H13	1668	1,03098884	0,044028717	UNCHANGED

O14795	7	4	Protein unc-13 homolog B (Munc13-2) (munc13)	UNC13B	1591	1,027622469	0,039310341	UNCHANGED
Q96Q05	7	4	Trafficking protein particle complex subunit 9 (NIK- and IKKB-binding protein) (Tularik gene 1 protein)	TRAPPC9	1148	1,026357436	0,037533247	UNCHANGED
Q81WJ2	10	5	GRIP and coiled-coil domain-containing protein 2 (185 kDa Golgi coiled-coil protein) (GCC185) (CLL-associated antigen KW-1) (CTCL tumor antigen se1-1) (Ran-binding protein 2-like 4) (RanBP2L4) (Renal carcinoma antigen NY-REN-53)	GCC2	1684	1,019324867	0,027613923	UNCHANGED
Q12923	8	4	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 13 (EC 3.1.3.48) (Fas-associated protein-tyrosine phosphatase 1) (FAP-1) (PTP-BAS) (Protein-tyrosine phosphatase 1E) (PTP-EI) (hPTPE1) (Protein-tyrosine phosphatase PTPPL1)	PTPN13	2485	1,019249826	0,02750771	UNCHANGED
P38646	12	7	Stress-70 protein, mitochondrial (75 kDa glucose-regulated protein) (GRP-75) (Heat shock 70 kDa protein 9) (Mortalin) (MOT) (Peptide-binding protein 74) (PBPF74)	HSPA9	679	1,017621395	0,025200909	UNCHANGED
Q9BUIF5	11	1	Tubulin beta-6 chain (Tubulin beta class V)	TUBB6	446	1,013963953	0,020006365	UNCHANGED
P0CG39	32	2	POTE ankyrin domain family member J	POTEJ	1038	1,011521335	0,016526749	UNCHANGED
A0A087WT T1	5	2	Polyadenylate-binding protein (PABP)	PABPC1	522	1,005477459	0,007880739	UNCHANGED
Q9P219	5	4	Protein Daple (Coiled-coil domain-containing protein 88C) (Dvl-associating protein with a high frequency of leucine residues) (hDaple) (Hook-related protein 2) (HkRP2)	CCDC88C	2028	1,005279507	0,007596683	UNCHANGED
Q9P2N2	4	3	Rho GTPase-activating protein 28 (Rho-type GTPase-activating protein 28)	ARHGAP28	729	1,00351954	0,005068708	UNCHANGED
M0QXS5	4	3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L (Fragment)	HNRNPL	530	1,000168417	0,000242954	UNCHANGED
E9PG32	5	2	Dynein heavy chain 12, axonemal	DNAH12	3960	0,998637544	-0,001966949	UNCHANGED
Q9NR09	14	6	Baculoviral IAP repeat-containing protein 6 (EC 6.3.2.-) (BIR repeat-containing ubiquitin-conjugating enzyme) (BRUCE) (Ubiquitin-conjugating BIR domain enzyme apollon) (APOLLON)	BIRC6	4857	0,997493889	-0,003620092	UNCHANGED
Q5T6W2	7	1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (Fragment)	HNRNPK	379	0,99707908	-0,004220163	UNCHANGED
J3QKN0	4	3	Polyubiquitin-B (Fragment)	UBB	206	0,994306138	-0,008237982	UNCHANGED
P15311	7	5	Ezrin (Cytovillin) (Villin-2) (p81)	EZR	586	0,987656473	-0,017918764	UNCHANGED
Q9P225	24	15	Dynein heavy chain 2, axonemal (Axonemal beta dynein heavy chain 2) (Ciliary dynein heavy chain 2) (Dynein heavy chain domain-containing protein 3)	DNAH2	4427	0,983337211	-0,024241857	UNCHANGED
P07237	5	4	Protein disulfide-isomerase (PDI) (EC 5.3.4.1) (Cellular thyroid hormone-binding protein) (Prolyl 4-hydroxylase	P4HB	508	0,982726638	-0,025137932	UNCHANGED

subunit beta) (p55)								
P11532	20	11	Dystrophin	DMD	3685	0,981150726	-0,027453311	UNCHANGED
Q2M1P5	6	3	Kinesin-like protein KIF7	KIF7	1343	0,967887647	-0,047088506	UNCHANGED
P10809	40	30	60 kDa heat shock protein, mitochondrial (60 kDa chaperonin) (Chaperonin 60) (CPN60) (Heat shock protein 60) (HSP-60) (Hsp60) (Hsc60) (Hsc70) (Mitochondrial matrix protein P1) (P60 lymphocyte protein)	HSPD1	573	0,965540529	-0,050591277	UNCHANGED
E7EPU2	6	4	Disco-interacting protein 2 homolog C	DIP2C	1537	0,957789637	-0,062219268	UNCHANGED
Q13838	5	2	Spliceosome RNA helicase DDX39B (EC 3.6.4.13) (56 kDa U2AF65-associated protein) (ATP-dependent RNA helicase p47) (DEAD box protein UAP56) (HLA-B-associated transcript 1 protein)	DDX39B	428	0,954660928	-0,06693968	UNCHANGED
Q9Y520	10	5	Protein PRRC2C (BAT2 domain-containing protein 1) (HBV X-transactivated gene 2 protein) (HBV XAg-transactivated protein 2) (HLA-B-associated transcript 2-like 2) (Proline-rich and coiled-coil-containing protein 2C)	PRRC2C	2896	0,953254474	-0,069066698	UNCHANGED
Q92547	6	2	DNA topoisomerase 2-binding protein 1 (DNA topoisomerase II-beta-binding protein 1) (TopBP1) (DNA topoisomerase II-binding protein 1)	TOPBP1	1522	0,948856679	-0,075737905	UNCHANGED
B4DY08	7	4	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2 (cDNA FLJ53542, highly similar to Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C)	HNRNPC	288	0,945184895	-0,081331521	UNCHANGED
Q96RL7	4	2	Vacuolar protein sorting-associated protein 13A (Chorea-acanthocytosis protein) (Chorein)	VPS13A	3174	0,944260512	-0,082743156	UNCHANGED
Q96M86	6	4	Dynein heavy chain domain-containing protein 1 (Dynein heavy chain domain 1-like protein) (Protein CCDC35)	DNHDI	4753	0,939620312	-0,089850194	UNCHANGED
P30405	5	3	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase F, mitochondrial (PPIase F) (EC 5.2.1.8) (Cyclophilin D) (CypD) (CypD) (Cyclophilin F) (Mitochondrial cyclophilin) (Cyp-M) (Rotamase F)	PPIF	207	0,939201017	-0,090494124	UNCHANGED
Q13535	13	9	Serine/threonine-protein kinase ATR (EC 2.7.11.1) (Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein) (FRAP-related protein 1)	ATR	2644	0,938544328	-0,091503208	UNCHANGED
Q6ZT98	4	2	Tubulin polyglutamylase TLL7 (EC 6.-.-.-) (Testis development protein NYD-SP30) (Tubulin--tyrosine ligase-like protein 7)	TLL7	887	0,9364729	-0,094690848	UNCHANGED
A0A0C4DG17	5	5	40S ribosomal protein SA (37 kDa laminin receptor precursor) (37/67 kDa laminin receptor) (67 kDa laminin receptor) (Laminin receptor 1) (Laminin-binding protein precursor p40)	RPSA	300	0,93605615	-0,095333022	UNCHANGED

Q5TEC6	10	2	Histone H3	HIST2H3PS2	136	0,918333703	-0,122909601	UNCHANGED
O75643	4	2	U5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa helicase (EC 3.6.4.13) (Activating signal cointegrator 1 complex subunit 3-like 1) (BRR2 homolog) (U5 snRNP-specific 200 kDa protein) (U5-200KD)	SNRNP200	2136	0,917588297	-0,124081104	UNCHANGED
P11137	12	7	Microtubule-associated protein 2 (MAP-2)	MAP2	1827	0,91193589	-0,13299569	UNCHANGED
Q16777	26	14	Histone H2A type 2-C (Histone H2A-GL101) (Histone H2A/q)	HIST2H2AC	129	0,905673246	-0,142937454	UNCHANGED
Q70CQ2	9	6	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 34 (EC 3.4.19.12) (Deubiquitinating enzyme 34) (Ubiquitin thioesterase 34) (Ubiquitin-specific-processing protease 34)	USP34	3546	0,896071717	-0,158313893	UNCHANGED
Q6S8J3	33	1	POTE ankyrin domain family member E (ANKRD26-like family C member 1A) (Prostate, ovary, testis-expressed protein on chromosome 2) (POTE-2)	POTEE	1075	0,894078956	-0,161525854	UNCHANGED
P14625	24	13	Endoplasmic (94 kDa glucose-regulated protein) (GRP-94) (Heat shock protein 90 kDa beta member 1) (Tumor rejection antigen 1) (gp96 homolog)	HSP90B1	803	0,893120236	-0,163073684	UNCHANGED
P78527	9	6	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (DNA-PK catalytic subunit) (DNA-PKcs) (EC 2.7.11.1) (DNPK1) (p460)	PRKDC	4128	0,892443835	-0,164166717	UNCHANGED
Q86VP6	5	3	Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1 (Cullin-associated and neddylation-dissociated protein 1) (TBP-interacting protein of 120 kDa A) (TBP-interacting protein 120A) (p120 CAND1)	CAND1	1230	0,884117929	-0,177689278	UNCHANGED
H7BY63	4	2	Protein FAM184A	FAM184A	936	0,881771784	-0,181522783	UNCHANGED
G3XAE9	5	3	KIAA0423, isoform CRA_a (Protein FAM179B)	FAM179B	1773	0,877139455	-0,189121863	UNCHANGED
P63261	60	9	Actin, cytoplasmic 2 (Gamma-actin) [Cleaved into: Actin, cytoplasmic 2, N-terminally processed]	ACTG1	375	0,841614016	-0,248769364	UNCHANGED
P68133	38	1	Actin, alpha skeletal muscle (Alpha-actin-1)	ACTA1	377	0,835612571	-0,259093898	UNCHANGED
Q12802	9	4	A-kinase anchor protein 13 (AKAP-13) (AKAP-Lbc) (Breast cancer nuclear receptor-binding auxiliary protein) (Guanine nucleotide exchange factor Lbc) (Human thyroid-anchoring protein 31) (Lymphoid blast crisis oncogene) (LBC oncogene) (Non-oncogenic Rho GTPase-specific GTP exchange factor) (Protein kinase A-anchoring protein 13) (PRKA13) (p47)	AKAP13	2813	0,829827092	-0,269117336	UNCHANGED
Q9NTJ3	4	3	Structural maintenance of chromosomes protein 4 (SMC protein 4) (SMC-4) (Chromosome-associated polypeptide C) (hCAP-C) (XCAP-C homolog)	SMC4	1288	0,807369163	-0,308699609	UNCHANGED

Q71D13	12	1	Histone H3.2 (Histone H3/m) (Histone H3/o)	HIST2H3A	136	0,75478611	-0,405860221	UNCHANGED
P38159	5	1	RNA-binding motif protein, X chromosome (Glycoprotein p43) (Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G) (hnRNP G) [Cleaved into: RNA-binding motif protein, X chromosome, N-terminally processed]	RBMX	391	0,754339682	-0,406713773	UNCHANGED
P02549	8	6	Spectrin alpha chain, erythrocytic 1 (Erythroid alpha-spectrin)	SPTA1	2419	0,740385056	-0,433652318	UNCHANGED
F8VVM2	4	2	Phosphate carrier protein, mitochondrial	SLC25A3	324	0,726902952	-0,460165331	UNCHANGED
Q15643	4	2	Thyroid receptor-interacting protein 11 (TR-interacting protein 11) (TRIP-11) (Clonal evolution-related gene on chromosome 14 protein) (Golgi-associated microtubule-binding protein 210) (GMAP-210) (Trip230)	TRIP11	1979	0,694377841	-0,526207185	UNCHANGED
Q4G0P3	17	13	Hydrocephalus-inducing protein homolog	HYDIN	5121	0,675364309	-0,566262156	UNCHANGED
A0A0C4DGK3	15	7	Nesprin-2	SYNE2	3541	0,587528148	-0,767270124	UNCHANGED
P06733	47	32	Alpha-enolase (EC 4.2.1.11) (2-phospho-D-glycerate hydro-lyase) (C-myc promoter-binding protein) (Enolase 1) (MBP-1) (MPB-1) (Non-neural enolase) (NNE) (Phosphopyruvate hydratase) (Plasminogen-binding protein)	ENO1	434	0,581385852	-0,782432132	UNCHANGED
P04083	8	5	Annexin A1 (Annexin I) (Annexin-1) (Calpactin II) (Calpactin-2) (Chromobindin-9) (Lipocortin I) (Phospholipase A2 inhibitory protein) (p35)	ANXA1	346	0,5414652	-0,885059476	UNCHANGED
Q86XA9	8	3	HEAT repeat-containing protein 5A	HEATR5A	2040	0,530275632	-0,915185642	UNCHANGED
Q86UP2	5	2	Kinectin (CG-1 antigen) (Kinesin receptor)	KTN1	1357	0,38575596	-1,374239647	DOWN
E7EVA0	20	11	Microtubule-associated protein	MAP4	2297	0,360541321	-1,471763479	DOWN
E9PBC6	21	1	Transforming acidic coiled-coil-containing protein 2	TACC2	2875	0,322890143	-1,630884695	DOWN
Q709F0	5	2	Acyl-CoA dehydrogenase family member 11 (ACAD-11) (EC 1.3.99.-)	ACAD11	780	0,281158187	-1,830546039	DOWN
Q96JB5	4	2	CDK5 regulatory subunit-associated protein 3 (CDK5 activator-binding protein C53) (LXXLL/leucine-zipper-containing ARF-binding protein) (Protein HSF-27)	CDK5RAP3	506	0,2533885	-1,980577046	DOWN
E7EMW7	11	9	E3 ubiquitin-protein ligase UBR5	UBR5	2792	0,208962071	-2,258686998	DOWN
P07954	4	3	Fumarate hydratase, mitochondrial (Fumarase) (EC 4.2.1.2)	FH	510	0,2071185847	-2,271185847	DOWN
Q8WYP5	7	5	Protein ELYS (Embryonic large molecule derived from yolk sac) (Protein MEL-28) (Putative AT-hook-containing transcription factor 1)	AHCTF1	2266	0,2034322	-2,297380045	DOWN
E7EPJ7	8	7	Triple functional domain protein (Fragment)	TRIO	2546	0,1576109	-2,665560787	DOWN

P17066	15	4	Heat shock 70 kDa protein 6 (Heat shock 70 kDa protein B')	HSPA6	643	0,135653171	-2,882005319	DOWN
Q14416	5	4	Metabotropic glutamate receptor 2 (mGluR2)	GRM2	872	0,118713294	-3,074446594	DOWN
P23246	5	3	Splicing factor, proline- and glutamine-rich (100 kDa DNA-pairing protein) (hPOMp100) (DNA-binding p52/p100 complex, 100 kDa subunit) (Polypyrimidine tract-binding protein-associated-splicing factor) (PSF) (PTB-associated-splicing factor)	SFPQ	707	0,115879916	-3,109297553	DOWN
F2Z2U4	15	9	Transformation/transcription domain-associated protein	TRRAP	3848	0,096065735	-3,379834246	DOWN
Q9C0D5	4	3	Protein TANC1 (Tetratricopeptide repeat, ankyrin repeat and coiled-coil domain-containing protein 1)	TANC1	1861	0,095632964	-3,386348196	DOWN
P04075	23	16	Fructose-bisphosphate aldolase A (EC 4.1.2.13) (Lung cancer antigen NY-LU-1) (Muscle-type aldolase)	ALDOA	364	0,087020526	-3,522500454	DOWN
P14618	35	22	Pyruvate kinase PKM (EC 2.7.1.40) (Cytosolic thyroid hormone-binding protein) (CTHBP) (Opa-interacting protein 3) (OIP-3) (Pyruvate kinase 2/3) (Pyruvate kinase muscle isozyme) (Thyroid hormone-binding protein 1) (THBP1) (Tumor M2-PK) (p58)	PKM	531	0,009831114	-6,668429425	DOWN

MATERIAIS E REAGENTES

- Placas 96, 48, 24, 12 e 06 poços;
- Lamínulas circulares de 13 e 15 mm;
- Tubos falcons 50 e 10 mL;
- Eppendorfs 2.0, 1.5, 1.0 e 0.5 mL;
- Ponteiras plásticas;
- Pipetas sorológicas 50, 10 e 5 mL;
- Vidrarias em geral (provetas, erlenmeyers, copos de Becker, entre outros);
- Garrafas de cultura de células de 25 cm² com volume de 50 mL, ou de 75 cm² com volume;
- Linhagens tumorais de próstata humana: PC3, LNCaP, RWPE-1 e DU-145;
- Meio RPMI 1640 (Gibco);
- soro bovino fetal (SBF) (Gibco);
- antibiótico (penicilina/estreptomicina) (Gibco);
- Meio F12K (Gibco);
- meio de queratinócito livre de soro (*Keratinocyte Serum Free Medium - K-SFM*) (Life Technologies);
- Extrato pituitário bovino (*bovine pituitary extract - BPE*) (Life Technologies);
- Fator de crescimento epidermal recombinante humano (*human recombinant epidermal growth factor - EGF*) (Life Technologies);
- Tripsina-EDTA 0,5% ou 0,05% de tripsina – 0,53mM EDTA (Gibco);
- 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenilbrometo de tetrazólico (MTT) (0,5 mg/mL) (ThermoFisher);
- Dimetilsulfóxido (DMSO);
- Kit panótico rápido (Laborclin®) (solução de triarilmetano a 0,1%, solução a 0,1% de xantenos, solução de 0,1% de tiazinas);
- Solução de Entellan;
- *XCELLigance System RTCA DP (Dual Plate) E-plates* de 16 poços;
- Monastrol; Taxol; Nocodazol (Sigma-Aldrich);
- Doxorrubicina, Sigma®
- Metanol 100%;

- Tampão de bloqueio (2% de albumina de soro bovino, 0,1% de Triton X-100 (Sigma-Aldrich));
- 0,2% de Triton X-100;
- Formaldeído a 3,7% (Sigma-Aldrich, F1635);
- Solução com 7,5 mg/mL de glicina;
- Anticorpos primários: TUBBrabbit (abcam - ab15568, diluição 1:500); TUBArabbit (Santa Cruz - sc-8035; diluição 1:500); AURAmouse (abcam - ab13824, diluição 1:200); PCNT (abcam - ab28144, diluição 1:250); CNTROBmouse (abcam - ab 70448, diluição 1:200); TUBGgoat (Santa Cruz - sc-7396 1:500 diluição); Eg5mouse (Santa Cruz - sc-365681, diluição 1:200); Lamin Arabbit (Santa Cruz - sc-20680, diluição 1:500);
- Anticorpos secundários: *anti-mouse chicken* Alexa Fluor 488 (A21200); *chicken anti-goat* Alexa Fluor 488 (A21467); *donkey anti-rabbit* Alexa Fluor 546 (A10040); *chicken anti-mouse* Alexa Fluor 647 (A21463); *donkey anti-goat* Alexa Fluor 546 (A11056); *chicken anti-rabbit* Alexa Fluor 488 (A21441) (todos da Life Technologies);
- Hoescht 33258 (Life Technologies);
- FITC-phalloidin (Sigma);
- ProLong Gold (Life Technologies);
- Tampão de lise (uréia 8M, NaCl 75 mM, Tris 50 mM, pH 8,2);
- Inibidor de coquetel de protease (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, EUA);
- Bicarbonato de amônio 50 mM;
- Colunas de rotação (Millipore, EUA) com um *cutt-off* de 5 kDa;
- tC18 SepPak – Waters 50 mg 1cc: WAT 054960;
- tC18 SepPak – Waters 100 mg 1cc: WAT 036820.;
- Ditioneitol 100 mM (Sigma, UK);
- Iodo-acetamida 200 mM (Sigma);
- Tripsina porcina (Promega, EUA) 1:50 (p/p tripsina/proteína);
- Acetonitrila (11%, 14%, 17%, 20% e 50%) (Merck Millipore);
- Ácido trifluoracético (TFA);
- Solução de PI-Ciclo: Iodeto de propídeo (Sigma[®], 50 mg/mL em PBS) + citrato de sódio (0,2%) + triton X-100 (0,1%);
- Azul de tripan 10% (Vetec[®]): 10 mg de azul de tripan + PBS q.s.p. 100 mL de solução;

- Tampão fosfato de sódio (PBS): 8,766 g cloreto de sódio (Labsynth[®]) + 2,14 g + NaHPO₄.7H₂O (Labsynth[®]) + 0,276 g NaHPO₄.H₂O (Labsynth[®]) + água destilada q.s.p. 1L solução-pH 7,2.

EQUIPAMENTOS

- Fluxo laminar vertical (VECO, modelo Biosafe 12, classe II);
- Incubadora de CO₂ a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ (NUAIRE, modelo TS Autoflow);
- Microscópio de inversão (ZEISS, modelo Axiovert 40C);
- Espectrofotômetro de placa (Beckman Coulter Inc., modelo DTX-880);
- Citômetro BD FACSVerser[®];
- Microscópio confocal Carl Zeiss LSM 780, equipado com objetiva Plan-Apochromat 100x/1,40 Oil DIC M27;
- *Qubit Fluorometric Quantitation System* (Thermo Fisher Scientific);
- Plataforma bidimensional *nanoUPLC tandem nanoESI-MSE*;
- Sistema *2D-RP/RP Acquity UPLC M-Class* (Waters Corporation, Milford, MA);
- Synapt G2 Si (Waters Corp., Milford, EUA);
- Coluna *XBridge Peptide BEH C18 NanoEase* (130 Å, 3,5 µm, 300 µm X 50 mm, Waters Corporation, Milford, MA);
- Coluna de *nanoACQUIDADE ACQUITY UPLC HSS T3* (100 Å, 1,8 µm, 75 µm X 150 mm, Waters Corporation, Milford, MA);
- Fonte de ionização NanoLock Spray (Waters, Manchester, UK);
- Agitador de placa shaker PSU[®] - 2T plus;
- Agitador de placa, MLW Modelo Thys 2;
- Agitador de tubo, Donner AD 8850;
- Banho-maria, DELTA Modelo 105Di;
- Bomba à vácuo, EXIMPUMP;
- Centrífuga de placas, Eppendorf Modelo Centrifuge 5403;
- Centrífuga de placas, Eppendorf Modelo Centrifuge 5810R;
- Centrífuga refrigerada, SORVALL[®] Biofuge fresco;
- Citocentrífuga, CT-2000 CIENTEC;
- Contador automático de células sanguíneas, Coulter Counter T-530;
- Deonizador de água Milli-Q, Milipore;

- High Throughput Screening (HTS)/ Laboratory Automation Workstation, Biomek 3000, Beckman Coulter;
- Máquina fotográfica digital, Olympus C-7070;
- Microscópio óptico, Metrimpex Hungary/ PZO-Labimex Modelo Studar lab;
- Mini Protean tetra cell, Biorad;
- Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell, Biorad;
- pHmetro, Micronal B474;
- Pipetas automáticas, Gilson;
- PowerPac™ HC High-Current Power Supply, Biorad;
- Shaker, BIOMIXER- TS 2000^a;
- Sistema de Fotodocumentação, ImageQuant 300 Imager GE Healthcare;
- Sonicador, unique – ultra cleaner 1600^a;

SOFTWARES

- *Multimode Detection Software* (Beckman Coulter Inc.);
- GraphPad Prism versão 6.0;
- ModFit LT 4.1 *Software* (Verity software house);
- Real-XCelligence System
- Image J FIJI (*NIH Image*);
- The Image J FIJI 3D Objects Counter;
- *Volume Viewer plug-in* (<https://imagej.nih.gov/ij/plugins/volume-viewer.html>);
- Banco de Dados do UniProt/Swiss-Prot/TrEMBL (552.884 entradas);
- Progenesis® QI versão 4.0 com Apex3D, peptídeo 3D e de contabilidade iónica (Waters);
- *Peptide Ion Stats* (Waters);
- Plataforma AmiGO 2 (<http://amigo.geneontology.org/amigo>);
- PANTHER (*Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships*, <http://pantherdb.org>) versão 11;
- STRING versão 10.0, *European Molecular Biology Laboratory* - EMBL, <http://string-db.org/>);

APÊNDICE B - ARTIGO: THE ANTITUMOR POTENTIAL OF THE ISOFLAVONOIDS (+)- AND (-)-2,3,9- TRIMETHOXYPTEROCARPAN: MECHANISM-OF-ACTION STUDIES PUBLISHED: 20 MAY 2020

<https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.0c00097>

ACS Medicinal
Chemistry Letters

Subscriber access provided by Uppsala universitetsbibliotek

Letter

The Antitumor Potential of the Isoflavonoids (+)- and (-)-2,3,9-Trimethoxypterocarpan: Mechanism-of-Action Studies

Kaio Farias, Roner F. da Costa, Assuero S Meira, Jairo Diniz-Filho, Eveline M. Bezerra, Valder N. Freire, Prue Guest, Maryam Nikahd, Xinghua Ma, Michael G. Gardiner, Martin G Banwell, Maria da C. F. de Oliveira, Manoel O. de Moraes, and Claudia do Ó. Pessoa

ACS Med. Chem. Lett., Just Accepted Manuscript • DOI: 10.1021/acsmchemlett.0c00097 • Publication Date (Web): 20 May 2020

Downloaded from pubs.acs.org on May 25, 2020

Just Accepted

"Just Accepted" manuscripts have been peer-reviewed and accepted for publication. They are posted online prior to technical editing, formatting for publication and author proofing. The American Chemical Society provides "Just Accepted" as a service to the research community to expedite the dissemination of scientific material as soon as possible after acceptance. "Just Accepted" manuscripts appear in full in PDF format accompanied by an HTML abstract. "Just Accepted" manuscripts have been fully peer reviewed, but should not be considered the official version of record. They are citable by the Digital Object Identifier (DOI®). "Just Accepted" is an optional service offered to authors. Therefore, the "Just Accepted" Web site may not include all articles that will be published in the journal. After a manuscript is technically edited and formatted, it will be removed from the "Just Accepted" Web site and published as an ASAP article. Note that technical editing may introduce minor changes to the manuscript text and/or graphics which could affect content, and all legal disclaimers and ethical guidelines that apply to the journal pertain. ACS cannot be held responsible for errors or consequences arising from the use of information contained in these "Just Accepted" manuscripts.

APÊNDICE C - ARTIGO: THE ISOFLAVANOID (+)-PTC REGULATES CELL-CYCLE PROGRESSION AND MITOTIC SPINDLE ASSEMBLY IN A PROSTATE CANCER CELL LINE

Published: 31 March 2022 <https://doi.org/10.1002/cbdv.202200102>

doi.org/10.1002/cbdv.202200102

RESEARCH ARTICLE



Special
Collection

The Isoflavanoid (+)-PTC Regulates Cell-Cycle Progression and Mitotic Spindle Assembly in a Prostate Cancer Cell Line

Kaio Moraes de Farias,^{a, b} Rafaela Rosa-Ribeiro,^c Edmarcia E. Souza,^d Jörg Kobarg,^d Martin G. Banwell,^{*e} José de Brito Vieira Neto,^b Sarah Leyenne Alves Sales,^b Paulo Roberto Ribeiro Costa,^f Rafael Cavalcante dos Santos,^g Francisco Vilaça Gaspar,^f Amaro Gomes Barreto Junior,^g Maria da Conceição Ferreira Oliveira,^b Manoel Odorico de Moraes,^b Cristiana Libardi M. Furtado,^{b, h} Hernandes F. Carvalho,^c and Claudia Pessoa^{*a, b}

^a Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – RENORBIO – Rede Nordeste de Biotecnologia, Federal University of Ceará – UFC, 60020-181 Fortaleza, CE Brazil

^b Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos – NPDM, Federal University of Ceará – UFC, Fortaleza, CE 60430-275, Brazil, e-mail: cpessoa@ufc.br

^c Department of Structural and Functional Biology, Biology Institute, State University of Campinas, Campinas 13083-970, SP Brazil

^d Faculdade de Ciências Farmacêuticas, State University of Campinas, Campinas, 13083-859, SP, Brazil

^e Institute for Advanced and Applied Chemical Synthesis, Jinan University, Guangzhou 510632 China, e-mail: mgbanwell@gmail.com

^f Laboratório de Química Bioorgânica (LQB), Instituto de Pesquisas de Produtos Naturais, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 21941-909, RJ, Brazil

^g Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos (EPQB), Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 21941-909, RJ, Brazil

^h Experimental Biology Center – NUBEX, University of Fortaleza, UNIFOR, Fortaleza, CE 60811-905, Brazil

Prostate cancer is the second most common malignancy in men and the development of effective therapeutic strategies remains challenging when more advanced, androgen-independent or insensitive forms are involved. Accordingly, we have evaluated, using flow cytometry, confocal microscopy and image analysis, the anti-proliferative effects of (+)-2,3,9-trimethoxypterocarpan [(+)-PTC, **1**] on relevant human prostate cancer cells as well as its capacity to control mitosis within them. In particular, the studies reported herein reveal that (+)-PTC exerts anti-proliferative activity against the PC-3 cell lines by regulating cell-cycle progression with mitosis being arrested in the prophase or prometaphase. Furthermore, it emerges that treatment of the target cells with this compound results in the formation of monopolar spindles, disorganized centrosomes and extensively disrupted γ -tubulin distributions while centriole replication remains unaffected. Such effects suggest (+)-PTC should be considered as a possible therapy for androgen-insensitive/independent prostate cancer.

Keywords: Pterocarpan, PC-3, anticancer activity, microtubule formation, antimitotic drug.

Introduction

Natural products have served as excellent starting points for the development of cancer treatments, especially those that perturb microtubule (MT) dynamics and chromosomal rearrangement during mitosis.^[1,2] A particularly prominent and naturally-derived anti-mitotic drug is paclitaxel (Taxol®) that

Supporting information for this article is available on the WWW under <https://doi.org/10.1002/cbdv.202200102>

Part of a Special Collection on Bioactive Secondary Plant Metabolites.

APÊNDICE D – ARTIGO: GLOBAL PROTEOMICS ANALYSIS OF BONE MARROW: ESTABLISHING TALIN-1 AND CENTROSOMAL PROTEIN OF 55 KDA AS POTENTIAL MOLECULAR SIGNATURES FOR MYELODYSPLASTIC SYNDROMES

Published: 21 June 2022 <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.833068>

 Frontiers in Oncology

ORIGINAL RESEARCH
published: 22 June 2022
doi: 10.3389/fonc.2022.833068



Global Proteomics Analysis of Bone Marrow: Establishing Talin-1 and Centrosomal Protein of 55 kDa as Potential Molecular Signatures for Myelodysplastic Syndromes

OPEN ACCESS

Edited by:

Dawen Zhao,
Wake Forest Baptist Medical Center,
United States

Reviewed by:

Diego A. Pereira-Martins,
University of Groningen, Netherlands
Depei Wu,
The First Affiliated Hospital of Soochow
University, China

*Correspondence:

Arlindo A. Moura
arlindo.moura@gmail.com
Claudia Pessoa
cpessoa@ufc.br
Ronald F. Pinheiro
pinheirofeitosa@gmail.com

Specialty section:

This article was submitted to
Molecular and Cellular Oncology,
a section of the journal
Frontiers in Oncology

Received: 10 December 2021

Accepted: 18 May 2022

Published: 22 June 2022

Citation:

Moura AA, Bezerra MJB,
Martins AMA, Borges DP,
Oliveira RTG, Oliveira RM, Farias KM,
Viana AG, Carvalho GGC, Paier CRK,
Sousa MV, Fontes W, Ricart CAC,
Morales MEA, Magalhães SMM,
Furtado CLM, Moraes-Filho MO,
Pessoa C and Pinheiro RF (2022)
Global Proteomics Analysis of Bone
Marrow: Establishing Talin-1 and
Centrosomal Protein of 55 kDa as
Potential Molecular Signatures for
Myelodysplastic Syndromes.
Front. Oncol. 12:833068.
doi: 10.3389/fonc.2022.833068

Arlindo A. Moura^{1,2,3*}, Maria Julia B. Bezerra^{1,2}, Aline M. A. Martins⁴, Daniela P. Borges^{2,5},
Roberta T. G. Oliveira^{2,5}, Raphaela M. Oliveira⁴, Kaio M. Farias^{2,3}, Arabela G. Viana¹,
Guilherme G. C. Carvalho^{2,6}, Carlos R. K. Paier^{2,7}, Marcelo V. Sousa⁴, Wagner Fontes⁴,
Carlos A. O. Ricart⁴, Maria Elisabete A. Moraes^{2,7}, Sílvia M. M. Magalhães^{2,5},
Cristiana L. M. Furtado^{2,7,8}, Manoel O. Moraes-Filho^{2,7}, Claudia Pessoa^{2,3,6*}
and Ronald F. Pinheiro^{2,5*}

¹ Graduate Program in Animal Science, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil, ² Drug Research and Development Center (NPDM), The School of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil, ³ Graduate Program in Biotechnology (Renorbio), Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil, ⁴ Laboratory of Protein Chemistry and Biochemistry, The University of Brasília, Brasília, Brazil, ⁵ Graduate Program in Medical Sciences, The School of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil, ⁶ Graduate Program in Pharmacology, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil, ⁷ Graduate Program in Translational Medicine, The School of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil, ⁸ Experimental Biology Center, NUBEX, The University of Fortaleza (Unifor), Fortaleza, Brazil

Myelodysplastic syndrome (MDS) is a hematological disorder characterized by abnormal stem cell differentiation and a high risk of acute myeloid leukemia transformation. Treatment options for MDS are still limited, making the identification of molecular signatures for MDS progression a vital task. Thus, we evaluated the proteome of bone marrow plasma from patients (n = 28) diagnosed with MDS with ring sideroblasts (MDS-RS) and MDS with blasts in the bone marrow (MDS-EB) using label-free mass spectrometry. This strategy allowed the identification of 1,194 proteins in the bone marrow plasma samples. Polyubiquitin-C (UBC), moesin (MSN), and Talin-1 (TLN1) showed the highest abundances in MDS-EB, and centrosomal protein of 55 kDa (CEP55) showed the highest relative abundance in the bone marrow plasma of MDS-RS patients. In a follow-up, in the second phase of the study, expressions of *UBC*, *MSN*, *TLN1*, and *CEP55* genes were evaluated in bone marrow mononuclear cells from 45 patients by using qPCR. This second cohort included only seven patients from the first study. *CEP55*, *MSN*, and *UBC* expressions were similar in mononuclear cells from MDS-RS and MDS-EB individuals. However, *TLN1* gene expression was greater in mononuclear cells from MDS-RS (p = 0.049) as compared to MDS-EB patients. Irrespective of the MDS subtype, *CEP55* expression was higher (p = 0.045) in MDS patients with abnormal karyotypes, while *MSN*, *UBC*, and *TALN1* transcripts were similar in MDS with normal vs. abnormal karyotypes. In conclusion, proteomic and gene

APÊNDICE E – ARTIGO: NAPHTHOQUINONE-BASED CHALCONE HYBRIDS AND DERIVATIVES: SYNTHESIS AND POTENT ACTIVITY AGAINST CANCER CELL LINES

Published: 20 September 2014 <https://doi.org/10.1039/C4MD00371C>



MedChemComm

CONCISE ARTICLE

View Article Online
View Journal | View Issue



Cite this: *Med. Chem. Commun.*, 2015, 6, 120

Naphthoquinone-based chalcone hybrids and derivatives: synthesis and potent activity against cancer cell lines†

Guilherme A. M. Jardim,^a Tiago T. Guimarães,^b Maria do Carmo F. R. Pinto,^c Bruno C. Cavalcanti,^d Kaio M. de Farias,^d Claudia Pessoa,^{de} Claudia C. Gatto,^f Divya K. Nair,^g Irishi N. N. Nambuthiri^{*g} and Eufrânio N. da Silva Júnior^{*a}

Received 28th August 2014
Accepted 19th September 2014

DOI: 10.1039/c4md00371c

www.rsc.org/medchemcomm

Novel naphthoquinone-based chalcones were prepared from the reaction between 3-bromo-nor- β -lapachone and amino-chalcones. Lapachone derivatives are also described here. All the substances were evaluated against cancer and normal cell lines and several compounds demonstrated potent antitumor activity.

1. Introduction

The population growth and aging associated with some risk factors have increased the incidence of new cases of cancer and related deaths in developed countries and in developing countries.¹ In a four-year period, the estimated number increased from 12.7 million new cancer cases with 7.6 million cancer-related deaths in 2008, to 14.1 million new cancer cases and 8.2 million cancer-related deaths in 2012. The projection for the year 2030, estimates 27 million new cancer cases with 17 million cancer-related deaths.^{2,3}

Naphthoquinone containing natural products belong to an important class of naturally occurring secondary metabolites found in the bignoniaceae family.⁴ Among these, naphthoquinoidal compounds obtained from natural products, such as lapachol and lawsone (2-hydroxy-1,4-naphthoquinone), have received considerable attention because of their antitumor potential.^{5–8} 1,4- and 1,2-naphthoquinones, and for instance, dehydro- α -lapachone, an important anti-vascular agent,⁹ and β -lapachone, a potent antitumoral compound, have also been used as prototypes for the development of new drugs.¹⁰

Generally, quinones are able to provoke apoptosis and act as topoisomerase inhibitors *via* DNA intercalation. Their toxicity can also be explained by inducing oxidative stress through reactive oxygen species (ROS) generation.¹¹ Recently, described by Bolognesi and coworkers, quinones have attracted attention due to their activity being intrinsically related by a multitarget mechanism.¹²

In recent years, lapachones were employed as key substrates for the synthesis of complex diazaazulenones,¹³ spiroactones,¹⁴ oxazoles¹⁵ and other potentially bioactive heterocyclic compounds.¹⁵ Our research group has explored the potential of quinones against cancer, mainly, *via* structural modification of the nor- β -lapachone, particularly, the C-ring and redox centre modification¹⁶ since these moieties are deeply related with the generation of ROS (Scheme 1).

Earlier, we reported the synthesis of nor- β -lapachone-based 1,2,3-triazole and 3-arylamino derivatives with potent antitumor activity *via* C-ring modification of nor- β -lapachone and molecular hybridization¹⁹ with the junction of 1,2,3-triazole groups (Scheme 1).^{17,18} Recently, we described a derivative of nor- β -lapachone coupled benzothiadiazole (Scheme 1) with potent activity against twenty cancer cell lines and low cytotoxicity against three normal cells.²⁰ These results were very promising and the mechanism of action of this substance in tumor cells is being currently investigated in our laboratories and it will be reported in due course.

Using redox centre modification, imidazoles and an oxirane derivative were obtained from nor- β -lapachone and β -lapachone (Scheme 1), with antimycobacterial²¹ and trypanocidal²² activities, indicating the importance of this approach. The C-ring modification in the α -lapachone was also accomplished and thio-derivatives with antitumor activities and 1,2,3-triazoles with leishmanicidal activity were recently reported.^{23,24}

Finally, following our program to develop new bioactive molecules, particularly, new nor- β -lapachones with activity

^aInstitute of Exact Sciences, Department of Chemistry, Federal University of Minas Gerais, CEP 31270-901, Belo Horizonte-MG, Brazil. E-mail: eufranio@ufmg.br; Fax: +55 31 34095700; Tel: +55 31 34095720

^bInstituto Nacional de Câncer, Hospital do Câncer – Unidade 1 – Seção de Medicina Nuclear, 20230-130, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^cNúcleo de Pesquisas de Produtos Naturais, UFRJ, 21944-971, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^dDepartamento de Fisiologia e Farmacologia, UFC, 60430-270, Fortaleza, CE, Brazil

^eFiocruz – Ceará, 60180-900, Fortaleza, CE, Brazil

^fInstitute of Chemistry, University of Brasília, CEP 70904970, Brasília-DF, Brazil

^gDepartment of Chemistry, Indian Institute of Technology Bombay, Mumbai 400 076, India. E-mail: irishi@iitb.ac.in; Fax: +91-22-2576-7152; Tel: +91-22-2576-7196

† Electronic supplementary information (ESI) available. CCDC 1018940. For ESI and crystallographic data in CIF or other electronic format see DOI: 10.1039/c4md00371c

**APÊNDICE F – PATENTE: COMPOSTO 5-CARBA-PTEROCARPANOS,
PROCESSO DE OBTENÇÃO DOS ANÁLOGOS DE CARBA-PTEROCARPANOS E
USO DO COMPOSTO**

Publicada: 26 Abril 2022

https://www.ufc.br/images/files/noticias/2023/230404_patente39.pdf



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA, COMÉRCIO E SERVIÇOS
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº BR 102021022533-5

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: BR 102021022533-5

(22) Data do Depósito: 09/11/2021

(43) Data da Publicação Nacional: 26/04/2022

(51) Classificação Internacional: C07D 493/00; A61K 31/343; A61P 35/00.

(52) Classificação CPC: C07D 493/00; A61K 31/343; A61P 35/00.

(54) Título: COMPOSTO 5-CARBA-PTEROCARPANOS, PROCESSO DE OBTENÇÃO DOS ANÁLOGOS DE CARBA-PTEROCARPANOS E USO DO COMPOSTO

(73) Titular: UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ, Instituição de Ensino e Pesquisa. CGC/CPF: 07272636000131. Endereço: AV DA UNIVERSIDADE, 2853 - BENFICA, Fortaleza, CE, BRASIL(BR), 60710-780, Brasileira; UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO, Instituição de Ensino e Pesquisa. CGC/CPF: 33663683000116. Endereço: AV. PEDRO CALMON, NO 550, Rio de Janeiro - RJ., RJ, BRASIL (BR), Brasileira

(72) Inventor: CLAUDIA DO Ó PESSOA; SARAH SANT'ANNA MARANHÃO; DANILO DAMASCENO ROCHA; MARIA DA CONCEIÇÃO FERREIRA DE OLIVEIRA; MARIA CLAUDIA DOS SANTOS LUCIANO; FRANCISCO VILAÇA GASPAR; KAILO MORAES DE FARIAS; SORAYA MARQUES RIBEIRO; JORGE LUIZ DE OLIVEIRA DOMINGOS; JULIO CESAR FERREIRA BARCELLOS; JOSÉ DE BRITO VIEIRA NETO; PAULO ROBERTO RIBEIRO COSTA; CARLOS ROBERTO KOSCKY PAIER; MARIA FRANCILENE SOUZA SILVA.

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 09/11/2021, observadas as condições legais

Expedida em: 07/02/2023

Assinado digitalmente por:

Alexandre Dantas Rodrigues

Diretor Substituto de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados

