



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

ELMER ADILSON ESPINO ZELAYA

**PEPGAT, UM PEPTÍDEO SINTÉTICO DERIVADO DE UMA QUITINASE, ALTERA
O PERFIL PROTEÔMICO DAS CÉLULAS DO CÂNCER COLORRETAL E
PERTURBA AS VIAS ENVOLVIDAS NA SOBREVIVÊNCIA DO CÂNCER.**

FORTALEZA

2025

ELMER ADILSON ESPINO ZELAYA

**PEPGAT, UM PEPTÍDEO SINTÉTICO DERIVADO DE UMA QUITINASE, ALTERA
O PERFIL PROTEÔMICO DAS CÉLULAS DO CÂNCER COLORRETAL E
PERTURBA AS VIAS ENVOLVIDAS NA SOBREVIVÊNCIA DO CÂNCER.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Filho Noronha de Souza.

FORTALEZA

2025

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)

- Z51p Zelaya, Elmer Adilson Espino.
PEPGAT, UM PEPTÍDEO SINTÉTICO DERIVADO DE UMA QUITINASE, ALTERA O PERFIL
PROTEÔMICO DAS CÉLULAS DO CÂNCER COLORRETAL E PERTURBA AS VIAS ENVOLVIDAS
NA SOBREVIVÊNCIA DO CÂNCER / Elmer Adilson Espino Zelaya. – 2025.
104 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2025.
Orientação: Prof. Dr. Pedro Filho Noronha de Souza.
1. Peptídeos sintéticos. 2. Câncer colorretal. 3. Perfil diferencial de proteínas. 4. Espectrometria de
massas. I. Título.

CDD 615.1

**PEPGAT, UM PEPTÍDEO SINTÉTICO DERIVADO DE UMA QUITINASE, ALTERA
O PERFIL PROTEÔMICO DAS CÉLULAS DO CÂNCER COLORRETAL E
PERTURBA AS VIAS ENVOLVIDAS NA SOBREVIVÊNCIA DO CÂNCER.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Aprovada em: 31/01/2025

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Pedro Filho Noronha de Souza (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Mariana Lima Vale
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Cristiana Libardi Miranda
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

A Deus.

Aos meus pais, irmãos, minha família, amigos e colegas pelo amor e apoio durante todo esse tempo. Realmente, muito obrigado. Em memória de meu avô, um exemplo de trabalho, dedicação e serviço para nossa família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao **Senhor Jesus Cristo**, meu DEUS, por me dar a vida e me permitir avançar na vida apesar das dificuldades, pelas oportunidades e por sempre me proporcionar conhecimento e me dar sabedoria para tomar as melhores decisões. Pela sua Palavra que sempre é meu sustento durante toda a minha vida.

Aos **meus pais** por me apoiarem desde o início neste mundo acadêmico. Em especial à minha mãe, **Maria Argentina Zelaya**, pelo apoio incondicional em diversas áreas, pelas palavras de incentivo e pelo amor incondicional apesar da distância. Que DEUS nos dê vida para nos vermos novamente. Ao meu **pai Elmer Adilson Espino**, pelo apoio durante meu início no processo acadêmico, muito obrigado.

Ao **Dr. Prof. Pedro Filho Noronha de Souza** por me receber como seu orientando, por todos os seus ensinamentos e pelo seu marcante exemplo de profissionalismo, simplicidade e humanidade. Sou muito grato pela paciência e por me guiar neste caminho da ciência durante esses dois anos. Muito obrigado, Professor Pedro. O Senhor é um exemplo de solidariedade, quando uma pessoa doa seu tempo e conhecimento, ela dá muito de si mesma, o que é inestimável.

À Dra. **Profa. Raquel Carvalho Montenegro**, não me esqueço da primeira vez que lhe escrevi do meu país e A Senhora respondeu ao meu e-mail o que para mim foi uma grata surpresa. Agradeço muito seu exemplo de comprometimento com o grupo de pesquisa, bem como sua paixão por fazer ciência. Muito obrigado, Professora Raquel Carvalho.

Agradeço ao Professor Dr. **Roberto Cesar Lima** por me receber no programa de Farmacologia, por sua atenção quando cheguei ao Brasil e por me ajudar com todos os protocolos e burocracias que precisei. Além de seu exemplo de ensino e por todos os seus ensinamentos que para mim são de grande valia para o meu desenvolvimento.

A meus colegas do Farmagen que fizeram deste tempo meu lar. Muito obrigado por me permitir compartilhar, aprender com vocês e me aventurar neste mundo da ciência. Muito obrigado por seu tempo, além de seu apoio incondicional: **Laio Oliveira**, muito obrigado por me ajudar no início deste caminho de pesquisa. **Isadora Gomez**, muito obrigado por sua amizade e solidariedade. **Thiago Loreto**, muito obrigado por me ajudar sempre no que eu precisei. **Arlene Almeida**, muito obrigado por a sua amizade, por ser uma colega muito legal e inteligente. **Emerson Lucerna**, agradeço seu exemplo de pesquisador e por nos motivar a sermos melhores pesquisadores. **Daiane Maria**, por estar sempre disponível, além de ser uma pessoa muito agradável. **Beatriz Lima**, Muito obrigado por ser uma pessoa com muita

iniciativa. **Laís Brasil**, obrigado por compartilhar suas experiências em proteômica e por contribuir na minha formação. **Luina Benavides, Islay Magalhães, Kassandra, Talia, Vinícius Estevão, Pedro Lima, Nicholas Santos, Felipe Mesquita, Catarine**, estou muito grato com todos vocês.

À **minha família, meus irmão Douglas Ivan Espino Zelaya, Samuel Alberto Espino Zelaya** por me ajudar no que precisei. Aos **meus tios**, embora não mencione nomes, posso dizer com certeza que todos me apoiaram e agradeço a generosidade que demonstraram para comigo. Aos **meus primos** por fazerem parte da minha vida e por serem minha família apesar da distância. Existem muitos, mas é espero que cada um se sinta igualmente abordado com estas palavras. À minha **melhor amiga** e ao mesmo tempo **namorada, Lucy Mariela Flores**, pelo carinho e palavras de incentivo durante esta jornada. Pelo seu exemplo e simplicidade, que para mim são de grande importância, bem como pela sua lealdade, que admiro muito.

Agradeço a Professora **Ligia Medina** por me convidar a entrar neste mundo da ciência e me permitir trabalhar com ela no grupo de pesquisa de produtos naturais lá em Honduras. Muito obrigado por acreditar em mim. À professora **Ana Carolina Arévalo**, que esteve presente nas últimas etapas da minha graduação, por buscar meu desenvolvimento e acreditar em mim, por todos os seus ensinamentos, sua paixão pela ciência e também seu exemplo de humildade, além de ser uma pessoa muito competente, bem-sucedida e por promover a pesquisa na Faculdade de Química e Farmácia da Universidade Nacional Autônoma de Honduras. Agradeço ao Professor **Carlos Roque** por todos seus ensinamentos quando eu era estudante na faculdade de Honduras, por me motivar a continuar neste mundo de pesquisa, por suas palavras de honra para mim, porém ainda eu era estudante de graduação, não esqueço de suas palavras. Também por seu exemplo de profissionalismo, sucesso e humildade que para mim são de muita importância.

Agradeço aos órgãos de fomento: **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio para poder desenvolver meus estudos. Ao **Núcleo de Pesquisa de Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM)** por me prover as ferramentas para desenvolver minha pesquisa: Infraestrutura, equipamentos, aparelhos, além dos técnicos que trabalham nesse resumo do conhecimento. A **Universidade Federal de Ceará** e ao povo do **Brasil** por me permitir aprender da sua cultura, conviver, aprender um novo idioma e ser um embaixador da cultura de **Honduras** neste país, muito obrigado.

RESUMO

PepGAT, um peptídeo sintético que, em estudos anteriores, revelou atividade antimicrobiana, demonstrou recentemente a indução de morte de células de câncer colorretal (CCR) humano HCT-116 e baixa toxicidade em células normais. Nosso estudo evidenciou que o PepGAT perturba as vias envolvidas na sobrevivência do câncer e potencializa a ação do 5-Fluorouracil (5-FU) no CCR. Para isso, foi realizada uma análise do perfil proteico em células HCT-116 após tratamento com PepGAT, utilizando UHPLC MS/MS e PatternLab V. Ensaios de fluorescência foram usados para avaliar a integridade da membrana e as espécies reativas de oxigênio (EROs), além de análises de viabilidade celular, apoptose, ciclo celular e invasão da matriz extracelular na presença de 5-FU. Os resultados revelaram que o PepGAT induz o acúmulo precoce de EROs e alterações no perfil proteico de células HCT-116, onde houve uma diminuição da abundância de proteínas envolvidas no metabolismo de EROs e metabolismo energético, ciclo celular, reparo de DNA, migração, invasão, agressividade do câncer e proteínas envolvidas na resistência ao 5-FU. O PepGAT induziu apoptose mais cedo em células HCT-116, parada do ciclo celular e inibiu a migração das células HCT-116, diminuindo em 6 vezes o 5-FU em relação ao HCT-116 e reduzindo sua toxicidade para células cancerosas. A análise *in silico* mostrou uma correlação entre os dados proteômicos e os dados do TCGA, revelando que 12 proteínas acumuladas para baixo por PepGAT em células HCT-116 também são maiores em amostras de pacientes com CCR. Essas descobertas sugerem fortemente os múltiplos mecanismos de ação exibidos pelo PepGAT contra as células do CCR e seu potencial para ser estudado sozinho ou em combinação com 5-FU para desenvolver novos estudos contra CCR e novos medicamentos contra ele; além de estudar as proteínas não apenas como biomarcadores, mas também como possíveis alvos terapêuticos no CCR.

Palavras-chave: Peptídeos sintéticos; Câncer colorretal; Perfil diferencial de proteínas; Espectrometria de massas.

ABSTRACT

PepGAT, a synthetic peptide that has shown antimicrobial activity in previous studies, has recently been shown to induce death in HCT-116 human colorectal cancer (CRC) cells and to have low toxicity in normal cells. Our study showed that PepGAT disrupts the pathways involved in cancer survival and potentiates the action of 5-Fluorouracil (5-FU) in CRC. To this end, an analysis of the protein profile in HCT-116 cells after treatment with PepGAT was carried out using UHPLC MS/MS and PatternLab V. Fluorescence assays were used to evaluate membrane integrity and reactive oxygen species (ROS), as well as analyses of cell viability, apoptosis, cell cycle and extracellular matrix invasion in the presence of 5-FU. The results revealed that PepGAT induces early accumulation of ROS and alterations in the protein profile of HCT-116 cells, where there was a decrease in the abundance of proteins involved in ROS metabolism and energy metabolism, cell cycle, DNA repair, migration, invasion, cancer aggressiveness and proteins involved in resistance to 5-FU. PepGAT induced earlier apoptosis in HCT-116 cells, cell cycle arrest and inhibited the migration of HCT-116 cells, decreasing 5-FU by 6 times compared to HCT-116 and reducing its toxicity to non-cancerous cells. In silico analysis showed a correlation between proteomic and TCGA data, revealing that 12 proteins accumulated down-regulated by PepGAT in HCT-116 cells are also higher in samples from CRC patients. These findings strongly suggest the multiple mechanisms of action exhibited by PepGAT against CRC cells and its potential to be studied alone or in combination with 5-FU to develop new studies against CRC and may develop new drugs against it; in addition to studying the proteins not only as biomarkers but also as possible therapeutic targets in CRC.

Keywords: Differential proteomics; Colorectal cancer; Synthetic peptides; Biomarkers; Mass spectrometry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2023 por sexo, exceto pele não melanoma.....	20
Figura 2- Modelos 3D de PepGAT.	27
Figura 3- Análise do mecanismo de ação do PepGAT com base na cinética de acumulação de EROs e IP.....	37
Figura 4- Avaliação da morte celular após tratamento com PepGAT (125,4 μ M), 5 FU (6,9 nM e 23 nM) e a combinação de PepGAT + 5-FU (6,9 nM) por 72 h.....	38
Figure 5- Análise do perfil proteômico e vias GO de proteínas reguladas diferencialmente.....	40
Figure 6- Análise de enriquecimento funcional de proteínas exclusivas entre o controle e PepGAT	42
Figure 7- Avaliação da invasão celular após o tratamento com o peptídeo sintético PepGAT (125,4 μ M), 5-FU (6,9 nM e 23 nM) e a combinação de PepGAT + 5-FU (6,9 nM) por 24 h	45
Figure 8 - Análise do ciclo celular após o tratamento com o peptídeo sintético PepGAT (125,4 μ M), 5-FU (6,9 nM e 23 nM) e a combinação de PepGAT + 5-FU por 72 h.....	47
Figure 9 - O PepGAT altera os níveis de expressão dos genes relacionados ao metabolismo das células HCT-116.....	50
Figura 10 - Ação combinada entre PepGAT e 5-FU	53
Figura 11 - Dados do TCGA mostrando o gene regulado positivamente em amostras de CRC de pacientes em comparação com tecidos não cancerosos.....	59
Figura suplementar 1 - Esquema que mostra as alterações em HCT-116 em diversas vias celulares causadas pelo PepGAT.....	79
Figura suplementar 2 - Esquema que mostra as alterações no HCT-116 relacionadas ao metabolismo energético causadas por PepGAT.....	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Citotoxicidade de alguns peptídeos sintéticos contra diferentes linhagens de células cancerosas.....	28
Tabela 2 – Primers utilizados na análise de qPCR.....	36
Tabela suplementar 1- Cytotoxicity of PepGAT alone and in combination with 5-FU against colorectal cancer cell line (HCT-116).....	81
Tabela suplementar 2 - Proteínas exclusivas do grupo tratado com PepGAT.....	87
Tabela suplementar 3 - Proteínas sobrepostas entre o grupo de controle e o grupo tratado com PepGAT.....	93

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIF	<i>Apoptosis Inducing Factor 1</i>
Ala	Alanina
APC	<i>Adenomatous Polyposis of the Colon</i>
APD3	<i>Peptide Data Base</i>
BP	<i>Biological Process</i>
CAP	Capecitabina
CC	<i>Cellular Component</i>
CCR	Câncer Colorretal
CI50	Concentração inibitória média
CN	Controle Negativo
DADP	<i>Database of anuran defence peptides</i>
DCFH-DA	Diacetato de Diclorofluoresceína
DMEM	<i>Dulbecco's Meio de Eagle Modificado</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DTMP	2'-Desoxitimidilato
DTT	Ditiotreitol
DUMP	2'-Desoxiuridilato
EGFR	Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FAP	<i>Familial Adenomatous Polyposis</i>
FBS	Soro Fetal Bovino
FUTP	5-Fluorouridina-5'-Trifosfato
FdUMP	5-Fluoro-2'-Desoxiuridina-5'-Monofosfato
FdUTP	5-Fluoro-2'-Desoxiuridina-5'-Trifosfato
FDR	<i>False Discovery Rate</i>
5-FU	5-Fluorouracil
GDP	Guanosina Difosfato
GLO1	<i>Lacto Glutathione Lyase 1</i>

GO	<i>Gene Ontology</i>
GTP	Guanosina Trifosfato
HNPCC	<i>Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer</i>
IARC	Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer
IRI	Irinotecano
IDH	Índice de Desenvolvimento Humano
INCA	Instituto Nacional do Câncer
KRAS	<i>Kirsten Rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
LEU	Leucovorina
LFQ	<i>Label Free Quantification</i>
Lys	Lisina
MF	<i>Molecular Function</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
OX	Oxaplatina
PAV	Peptídeos Antivirais
PBS	Solução Tampão de Fosfato
PSM	<i>Peptide Spectrum Matching</i>
QDPR	Diidropteridina Redutase
R	Arginina
RNA	Ácido Ribonucleico
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RPM	Rotações por Minuto
SP	Peptídeos Sintéticos
SAMP	Peptídeos Sintéticos Antimicrobianos
SPE	Extração em Fase Sólida
TaTME	Excisão Mesorretal Total Transanal
TS	Timidilato Sintase
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
Wnt	<i>Wingless and Int-1</i>

XIC *Extracte Ion Chromatogram*

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
pH	Potencial de Hidrogênio
$\leq$	Menor ou igual que
$\geq$	Mayor ou igual que
Da	Dalton
μg	Microgramas
mL	Mililitros
$\mu\text{g. mL}^{-1}$	Microgramas por mililitros
$\mu\text{L}/\text{min}$	Microlitros por minuto
μM	Micro molar
U/mL	Unidades por mililitros
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
mM	Mili molar
g	Aceleração gravitacional
h	Horas
CO_2	Dióxido de carbono
nm	Nanômetros
®	Marca registrada
m/z	Relação Massa carga
ppm	Partes por milhão

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
1.1	Câncer	18
1.2	Câncer colorretal	19
1.2.1	<i>Epidemiologia e etiologia</i>	<i>19</i>
1.3	Classificação	21
1.3.1	<i>Adenoma</i>	<i>21</i>
1.3.2	<i>Adenocarcinoma do cólon ou pólipos hiperplásicos</i>	<i>21</i>
1.4	Tratamento para o câncer colorretal	22
1.4.1	<i>Tratamentos convencionais</i>	<i>22</i>
1.4.2	<i>Peptídeos sintéticos como estratégia para o tratamento de câncer colorretal</i>	<i>25</i>
1.4.2.1	<i>Peptídeos sintéticos antimicrobianos (SAMPs) para o tratamento do câncer: 26</i>	
2	Hipótese	30
3	Objetivos	30
3.1	Objetivo geral.....	30
3.2	objetivos específicos	30
4	Materiais e métodos	31
4.1	Manutenção e cultura de célula	31
4.2	Ensaio de fluorescência para avaliação da integridade da membrana por iodeto de propídio (IP)	31
4.3	Análise de espécies reativas de oxigênio (EROs).....	31
4.4	Lise e extração do proteoma celular: preparação das amostras tratadas com PepGAT para a análise proteômica.....	32
4.5	Digestão de proteínas	32
4.6	Análise proteômica	32
4.7	Análise de dados.....	33
4.8	Análise de enriquecimento funcional de ontologia genética (GO).....	33
4.9	Avaliação da citotoxicidade do efeito combinado de PepGAT e 5-FU contra HCT- 116 33	
4.10	Avaliação da citotoxicidade em linhagem celular não tumoral pelo <i>Alamar Blue</i> ...	34
4.11	Análise do ciclo celular	34
4.12	Análise de Apoptose.....	35

4.13	Análise da invasão da matriz extracelular na presença de PepGAT com 5-FU.....	35
4.14	Extração total de mRNA e análise qRT-PCR.....	35
4.15	Análises in silico da expressão de mRNA de alvos PepGAT em amostras de CCR.....	36
4.16	Análise estatística	36
5	Resultados e discussão	37
5.1	PepGAT induz o acúmulo precoce de EROs nas células HCT-116.....	37
5.2	PepGAT induz alterações no perfil proteômico de células HCT-116	40
5.3	Proteínas exclusivas do controle revelaram baixo acúmulo de proteínas essenciais para a sobrevivência do câncer	42
5.4	Proteínas envolvidas no estresse oxidativo.....	44
5.5	Proteínas envolvidas no metabolismo do ácido nucleico e no ciclo celular	45
5.6	Proteínas envolvidas no metabolismo e na progressão do câncer.	49
5.7	Proteínas envolvidas na resistência do câncer a medicamentos.....	51
5.8	Proteínas exclusivas do HCT-116 tratado com PepGAT revelaram um acúmulo maior de proteínas supressoras de câncer.	54
5.9	A análise proteômica revelou proteínas compartilhadas em células HCT-116 tratadas com PepGAT e controle.....	55
5.10	A análise bioinformática revelou uma correlação entre os dados proteômicos e os dados do TCGA.....	59
6	Conclusão	60
7	Referências.....	60
8	ANEXOS.....	76
8.1	Figura suplementar 1	76
8.2	Figura suplementar 2.....	77
8.3	Tabelas suplementares: 1. Proteínas exclusivas do grupo controle, 2. Proteínas exclusivas do grupo tratado com PepGAT, e 3. Proteínas compartilhadas entre os grupos controle e tratado com PepGAT.	77

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

O câncer está entre uma das doenças que mais tem afetado a população mundial nos últimos anos. Apesar dos grandes avanços científicos, continua a ser um problema de saúde que transcende latitudes. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), ocorreram aproximadamente 10 milhões de mortes em 2020, das quais as mais comuns foram câncer de pulmão (com 1,80 milhão de mortes), cólon e reto (916 mil mortes), fígado (830 mil mortes), estômago (769 mil mortes) e mama (685 mil mortes). Paralelamente, estudos anteriores colocaram o câncer da mama feminino como o tipo de câncer com maior frequência de diagnóstico, com 11,7% do total de casos, seguido pelos correspondentes 11,4% para o câncer do pulmão e 10,0% para o câncer colorretal. Segundo dados da Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC), uma em cada cinco pessoas no mundo desenvolve câncer durante a vida (IARC, 2023; SUNG et al., 2021; WHO, 2022).

Até 2022, estudos em ambos os sexos posicionaram o câncer do pulmão como o câncer com maior frequência de diagnóstico a nível mundial, representando 12,4% do total de casos, seguido pelo câncer da mama feminino com 11,6% que anteriormente representava o maior número de casos; em terceiro lugar está o câncer colorretal com 9,6%, o câncer de próstata com 7,3% e o câncer de estômago com 4,9%. No entanto, o câncer de pulmão continua sendo a principal causa de morte entre os 10 principais tipos de câncer, sendo responsável por 18,7% de todas as mortes por essa doença crônica (BRAY et al., 2024).

A Ásia, o continente onde reside mais da metade da população mundial (59,2%), lidera o maior número de mortes por câncer em todo o mundo, com 56,1% e com quase metade de todos os casos (49,2%). Um dos fatores que influenciam é o diagnóstico tardio, que contribuiu para que regiões como a África e a Ásia tivessem uma taxa de mortalidade, em contraste, mais alta em comparação com a carga de incidência da doença. Embora a Europa tenha menos de 10% da população mundial (9,6%), isso não compensa os altos níveis de câncer e mortalidade, que representam 22,4% e 20,4% da população mundial, respectivamente (BRAY et al., 2024).

Esses números não estão muito distantes da realidade do Brasil, um país que enfrenta vários desafios (por exemplo, desigualdade social) e que, de acordo com o relatório do Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) 2021/2022, ocupa a 87ª posição entre 191 países, com um valor de IDH de 0,754 (CONCEIÇÃO P., 2022). Segundo estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA), o tumor maligno mais comum no Brasil é o câncer de pele não

melanoma, que representa 31,3% do total de casos, seguido pelo câncer de mama feminino (10,5%), próstata (10,2%), colorretal (6,5%), pulmão (4,6%) e estômago (3,1%) (INCA, 2022). Entre 1979 e 2022 foram registrados 239.644 óbitos por câncer, representando 15,52% do total de óbitos no Brasil, onde o estado do Ceará forneceu 60,62/100 mil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022).

Tanto no Brasil quanto no mundo, as tendências de crescimento populacional são um fator importante que influencia a carga de câncer. As previsões para o ano de 2050 projetam que haverá mais de 35 milhões de novos casos de câncer (incluindo câncer de pele não melanoma, com exceção do carcinoma basocelular) em todo o mundo, um aumento de 77% em relação aos 20 milhões de casos estimados em 2022; onde a população mundial atingiu 8 milhões de pessoas e será de 9,7 bilhões em 2050. No Brasil, a estimativa para o período de três anos, de 2023 a 2025, é de que haverá 704.000 novos casos de câncer, 483.000 excluindo o câncer de pele não melanoma. (BRAY et al., 2024; INCA, 2022).

1.2 Câncer colorretal

1.2.1 Epidemiologia e etiologia

Dados da OMS classificaram o câncer colorretal (CCR) em terceiro lugar com 1,93 milhões de casos registrados. Em relação aos índices de mortalidade, esta neoplasia ocupa o segundo lugar com 916.000 mortes, ficando atrás apenas do câncer de pulmão. Paralelamente, o sul da Europa, Austrália e Nova Zelândia possuem as taxas de incidência mais altas do mundo, com 25,1 e 24,1 por cada 100 000 casos em homens e 16,1 e 21,5 por cada 100 000 casos em mulheres, respectivamente (BRAY et al., 2024; WHO, 2022).

No Brasil, o CCR ocupa a segunda posição entre as neoplasias mais frequentes. De acordo com a estimativa realizada pelo INCA 2022 serão esperados 45.630 novos casos para o 2024. Foi identificado que o sexo feminino possui maior incidência (Fig. 1), com 23.660 casos, em comparação com o sexo masculino, com 21.970 casos (com um risco de 21,41 e 20,78 por 100.000, respectivamente). No Ceará se estima um total de 1.210 novos casos, com uma taxa de 10,86/100 mil habitantes (INCA, 2022). Para o 2022 foram registradas 21.255 mortes as quais representaram 8,87 % do total de mortes por câncer nesse ano (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022)

Figura 1 – Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2023 por sexo, exceto pele não melanoma.

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	71.730	30,0%	Homens	Mulheres	Mama feminina	73.610	30,1%
Cólon e reto	21.970	9,2%			Cólon e reto	23.660	9,7%
Traqueia, brônquio e pulmão	18.020	7,5%			Colo do útero	17.010	7,0%
Estômago	13.340	5,6%			Traqueia, brônquio e pulmão	14.540	6,0%
Cavidade oral	10.900	4,6%			Glândula tireoide	14.160	5,8%
Esôfago	8.200	3,4%			Estômago	8.140	3,3%
Bexiga	7.870	3,3%			Corpo do útero	7.840	3,2%
Laringe	6.570	2,7%			Ovário	7.310	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.420	2,7%			Pâncreas	5.690	2,3%
Fígado	6.390	2,7%			Linfoma não Hodgkin	5.620	2,3%

Fonte: INCA, (2022)

Considerando os fatores de risco externos que contribuem para o desenvolvimento do CCR, a dieta e o estilo de vida têm sido descritos como influências importantes. Bebidas alcoólicas, fumo, gordura corporal, carnes vermelhas e processadas representam os principais componentes que ajudam a aumentar o risco de desenvolver esta doença (CLINTON; GIOVANNUCCI; HURSTING, 2020).

Alguns eventos moleculares comuns no CCR incluem a ativação da via Wnt/ β -catenina (GILES; VAN ES; CLEVERS, 2003), onde a inativação do gene supressor de tumores *APC* (*Adenomatous Polyposis of the Colon* - Polipose Adenomatosa do Cólon) leva ao acúmulo de β -catenina nos enterócitos, promovendo a formação de pólipos adenomatosos (FODDE, 2002; WEINBERG, 2008; YANG et al., 2006). Durante esse estágio, a ativação do oncogene *KRAS* promove o crescimento anormal das células nesses pólipos, levando à formação de adenocarcinomas (MCCORMICK, 2016; MENG et al., 2021; RYAN; CORCORAN, 2018) e à perda da função do gene supressor de tumor *TP53* (LIU et al., 2015). Também foi relatado que mutações germinativas no homólogo mutS 2 (*MSH2*) e no homólogo mutL 1 (*MLH1*), considerados biomarcadores no CRC, causaram a supressão de genes de reparo de incompatibilidades e, como consequência, danos irreparáveis ao DNA (GUO et al., 2023). Nesse sentido, as mutações de *MSH2* e *MLH1* são contribuintes claros para o desenvolvimento do câncer colorretal hereditário sem polipose - *Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer* (HNPCC), enquanto alterações do gene *APC* levam ao desenvolvimento da polipose adenomatosa familiar - *Familial Adenomatous Polyposis* (FAP), precursora dos adenomas (KINZLER; VOGELSTEIN, 1996; YANG et al., 2006). Pode-se afirmar que a FAP e o HNPCC são os representantes claros do câncer de cólon hereditário (LYNCH; DE LA CHAPELLE, 2003).

Outra causa que contribui para a patogênese do CCR são as alterações no microbioma intestinal, em que as bactérias que regulam esses tumores, *E. coli* por exemplo, têm sido implicadas na transmissão de mutações. Um dos mecanismos é provocar a expressão de quimiocinas e citocinas ao influenciar negativamente no muco que protege o epitélio do cólon. Desta forma, ocorre a formação de microambientes imunológicos que contribuem para a tumorigênese (PLEGUEZUELOS-MANZANO et al., 2020; SEARS; GARRETT, 2014; THOMAS et al., 2017).

1.3 Classificação

1.3.1 Adenoma

O adenoma não é estritamente um câncer, mas é o primeiro estágio do desenvolvimento da carcinogênese. Esse primeiro estágio ocorre com a formação de pequenas estruturas chamadas pólipos, também denominados pólipos adenomatosos, foi documentado que, com o tempo, esses adenomas podem aumentar o risco de CCR (AMHRICAN et al., 1994; COTTET et al., 2012). Durante anos, os adenomas ganharam importância devido às características que podem apresentar: adenoma geral, adenomas múltiplos, adenomas grandes e de alto grau. Por outro lado, há outro tipo de adenoma diferente do convencional, chamado adenoma fechado, que não apresenta uma mutação no gene *APC*, mas no gene *BRAF* (BRENNER et al., 2012; SPRING et al., 2006). O adenoma fechado descreve um grupo mais diversificado, mencionado a seguir (FARRIS et al., 2007).

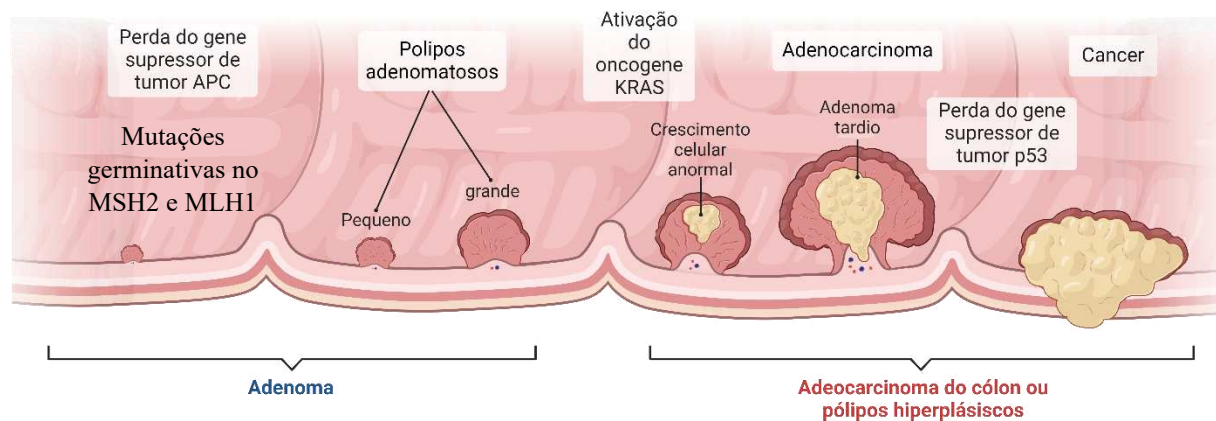
1.3.2 Adenocarcinoma do cólon ou pólipos hiperplásicos

Considerado o tipo mais comum de CCR, ele é responsável por mais de 95% da incidência dessa doença (MASUD et al., 2021). Os adenocarcinomas de cólon formam-se nas células do epitélio que fazem parte do revestimento do intestino grosso, onde se espalham para outras partes (MANGAL; CHAURASIA; KHAJANCHI, 2020). Foi relatado que aproximadamente 90% dos adenocarcinomas são atribuídos ao CCR. Portanto, a identificação, caracterização e a classificação da doença nos seus diferentes estágios em tecidos benignos do cólon ou adenocarcinomas do cólon têm sido de grande importância (BANERJEE et al., 2017; YILDIRIM; CINAR, 2022). Através destes pólipos hiperplásicos surgem os adenomas serrilhados tradicionais (TSA), os adenomas serrilhados sésseis (SSA) e os pólipos hiperplásicos verdadeiros (HARRISON; BENZIGER, 2011).

Pode-se afirmar que o CCR é uma doença heterogênea e complexa, pois apresenta várias vias para o seu desenvolvimento como a mutação do gene *APC* (com sinalização

APC/Wnt) de um epitélio normal para um adenoma, após o adenoma inicial há intervenção do *KRAS* (*BRAF/KRAS*) resultando em um adenoma intermediário, perda de heterozigossidade (LOH) ocasionando variações nas cópias do gene, levando a um adenoma tardio e, conseqüentemente, ao CCR propriamente dito (CAPPELL, 2008; HARRISON; BENZIGER, 2011; NGUYEN; DUONG, 2018).

Figura 2 – Classificação e desenvolvimento do câncer colorretal causado por mutação dos genes *MSH2* e *MLH1*, perda do gene supressor de tumor *APC* e ativação do oncogene *KRAS*



Fonte: Feito no Biorender

1.4 Tratamento para o câncer colorretal

1.4.1 Tratamentos convencionais

A cirurgia tem sido considerada o tratamento primário para a remoção do tumor (KUIPERS et al., 2015; XIE; CHEN; FANG, 2020). Entre as abordagens cirúrgicas que foram introduzidas como um dos principais tratamentos estão: cirurgia aberta, abordagem laparoscópica, cirurgia robótica, excisão mesorretal total transanal (TaTME) e dissecação de linfonodos pélvicos laterais. Na cirurgia aberta, é feita uma longa incisão no abdome para remover o câncer, já a abordagem laparoscópica, conhecida como cirurgia minimamente invasiva, envolve a realização de vários pequenos cortes no abdômen com ferramentas especiais e tem a vantagem de uma recuperação mais rápida. A cirurgia robótica, por outro lado, é um desenvolvimento recente, envolvendo um equipamento no qual o cirurgião controla os braços da máquina para remover o câncer. A abordagem transanal é adequada para pacientes com pelve estreita, obesidade visceral e tumores retais baixos. Por fim, a dissecação lateral do linfonodo pélvico tem o objetivo de aumentar a sobrevida do câncer, mas foi sugerido que essa prática poderia levar à disfunção sexual ou urinária sem um benefício oncológico considerável (CANCER RESEARCH UK, 2022; KIM et al., 2018; MATSUDA et al., 2018; THE AMERICAN CANCER SOCIETY MEDICAL AND EDITORIAL CONTENT TEAM, 2024;

VIGNALI et al., 2019). Embora a cirurgia seja de grande importância no tratamento do CCR, a complexidade dessa doença exige uma abordagem integral, incluindo medicamentos para melhorar a qualidade de vida do paciente.

No final do século XX e início do século XXI, o 5-Fluorouracil (5-FU) tem sido um dos medicamentos tradicionalmente usados como quimioterápico para a sobrevivência do CRC (Akkad et al., 2015b; Banerjee et al., 2017b; Tournigand et al., 2004; Xie et al., 2020). Em 1957, Heidelberger e colaboradores sintetizaram várias 5-fluoropirimidinas, incluindo o 5-FU, que exerceu atividade antitumoral contra tumores transplantados em camundongos e ratos. Esse antimetabolito análogo à uracila substitui o hidrogênio na posição C-5 por um átomo de flúor na base nitrogenada. Como uma das diferenças químicas importantes entre o DNA e o RNA é a troca entre timina e uracila, a alteração timina-uracila/5-FU causada pela substituição da timina no DNA pode levar à formação de pares de bases adenina-uracila/5-FU (HEIDELBERGER et al., 1957; VÉRTESY; TÓTH, 2009; VODENKOVA et al., 2020). Isso é de grande importância para a compreensão do mecanismo de ação do 5-FU, pois, por compartilhar uma estrutura característica com a pirimidina, integra-se ao DNA e ao RNA de maneira semelhante (BLONDY et al., 2020). O 5-FU administrado por via intravenosa exerce seu mecanismo de ação convertendo-se em seus metabólitos ativos: 5-fluorouridina-5'-trifosfato (FUTP), 5-fluoro-2'-desoxiuridina-5'-trifosfato (FdUTP) e 5-fluoro-2'-desoxiuridina-5'-monofosfato (FdUMP). Esse último é fundamental, pois inibe a enzima timidilato sintase (TS), que é essencial para a conversão de 2'-desoxiuridilato (DUMP) em 2'-desoxitimidilato (DTMP). Como a síntese de DTMP é necessária para a síntese de DNA na célula cancerosa, sua inibição resulta na redução da proliferação celular (LONGLEY; HARKIN; JOHNSTON, 2003; MOJARDÍN et al., 2013; VODENKOVA et al., 2020).

Entretanto, o 5-FU é frequentemente utilizado em combinação com outros medicamentos, como a leucovorina (LEU) que aumenta o efeito da inibição da enzima TS e, portanto, a eficácia do 5-FU (ANDRÉ et al., 2004; BUTTACAVOLI et al., 2020; PIEDBOIS, 2004; VAN LAETHEM, 2001). Outros esquemas de combinação com o objetivo de otimizar o tratamento quimioterápico no CCR são a inclusão de agentes citotóxicos, como o irinotecano (IRI), que inibe a topoisomerase I bloqueando o reparo do DNA, a oxaliplatina (OX), que também induz danos ao DNA, a capecitabina (CAP), que é um pró-fármaco do 5-FU, e a estrutura das combinações tradicionalmente empregadas: FOLFOX (5-FU+LEU+OX), CAPOX (CAP+OX) e CAPIRI (CAP+IRI) (EISTERER; PRAGER, 2019; SKARKOVA et al., 2019; TAM et al., 2023; XIE; CHEN; FANG, 2020). Por fim, FOLFIRI (5-FU/LEU/IRI),

FOLFOXIRI (5-FU+LEU+OX+IRI) também foram usados em regimes de quimioterapia (DE MATTIA; CECCHIN; TOFFOLI, 2015).

Em termos de sobrevida global (SG), argumentou-se que o tratamento individual de primeira linha não é inferior aos esquemas combinados (VAN CUTSEM et al., 2014; XIE; CHEN; FANG, 2020). Os agentes biológicos podem ser utilizados como alternativa a quimioterapia ou em sinergismo com a mesma, também denominados de terapia direcionada, têm como alvo receptores específicos nas células cancerígenas (LEE; TAN; OON, 2018). Os principais representantes desses medicamentos são: cetuximabe e panitumumabe, que bloqueiam a atividade do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), que influencia significativamente na proliferação e diferenciação celular; bevacizumabe, aflibercept e regorafenibe, bloqueiam o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF/VEGFR) regulado positivamente no câncer; regorafenibe, ramucirumabe, pembrolizumabe, nivolumabe, ipilimumabe, podem responder a algumas vias para fornecer locais-alvo para essa terapia e suprimir o crescimento do tumor (DESHMUKH; PRAJAPATI; HARWANSH, 2023; EISTERER; PRAGER, 2019; VASUDEV; REYNOLDS, 2014; XIE; CHEN; FANG, 2020).

Por fim, a radioterapia tem sido uma opção de tratamento complementar em que raios X ou partículas são usados para destruir as células cancerígenas. Embora não seja comumente usada para tratar CCR devido à mobilidade do órgão e à sua fronteira com órgãos adjacentes (rim, intestino delgado e fígado), no caso do câncer retal, ela pode ser usada antes da cirurgia em conjunto com a quimioterapia para encolher o tumor ou após a cirurgia para remover quaisquer células malignas remanescentes. Essa combinação da implementação da radioterapia com a quimioterapia é conhecida como terapia neoadjuvante (AGRONOVICH; BERTHELET, 2000; FEENEY et al., 2019; THE AMERICAN CANCER SOCIETY MEDICAL AND EDITORIAL CONTENT TEAM, 2024).

Consequentemente, a radioterapia e a cirurgia têm sido consideradas tratamentos locais, enquanto a terapia direcionada e a quimioterapia são consideradas tratamentos sistêmicos. Apesar desses avanços no tratamento do câncer colorretal, foi documentada uma taxa considerável da resposta desfavorável à quimioterapia, resultando na morte de muitos pacientes devido à resistência das células cancerígenas aos efeitos dos medicamentos. Essa resistência foi dividida em dois tipos: intrínseca, na qual as células tumorais já têm componentes que conferem resistência antes do tratamento com medicamentos; ou adquirida, na qual a resistência progride durante o tratamento, devido a fenótipos tumorais resistentes a medicamentos (DE MATTIA; CECCHIN; TOFFOLI, 2015; EMRAN et al., 2022; VAGHARI-

TABARI et al., 2022, 2024). Além disso, algumas respostas indesejadas aos tratamentos foram relatadas, nas quais quimioterápicos como o 5-FU causaram anemia, erupção cutânea, febre, vômito, diarreia, estomatite e outros efeitos tóxicos comuns, exigindo o estudo, a pesquisa e o desenvolvimento de novos tratamentos que possam diminuir os efeitos adversos, aumentar a eficácia ou ser uma alternativa individual aos medicamentos atuais (LATCHMAN; GUASTELLA; TOFTHAGEN, 2014; VODENKOVA et al., 2020; ZHANG et al., 2018).

1.4.2 Peptídeos sintéticos como estratégia para o tratamento de câncer colorretal

Nas últimas décadas a utilização de peptídeos sintéticos - *Synthetic Peptides* (SPs) tem sido uma alternativa terapêutica para lidar com o CCR. Os SPs são moléculas formadas por aminoácidos que, já em meados do século passado, começaram a ganhar importância não só pelo desenvolvimento de métodos de síntese, mas também por apresentarem algumas virtudes aplicáveis no campo da medicina: alta atividade, especificidade, seletividade, poucos efeitos colaterais, predição metabólica e menor toxicidade quando comparado a outras moléculas pequenas e peptídeos naturais (ERAK et al., 2018; MÄDE; ELS-HEINDL; BECK-SICKINGER, 2014; VIGNEAUD et al., 1953).

Paralelamente, os SPs não só apresentaram aplicações importantes como peptídeos sintéticos antimicrobianos (SAMPs), peptídeos antifúngicos e peptídeos antivirais (PAV), mas também como tratamento contra alguns tipos de câncer, ferramentas de diagnóstico para doenças autoimunes (MULLER, 2012; NAJM et al., 2021; VANZOLINI et al., 2022) e como biomarcadores de doenças cardiovasculares (GRIECO; GOMEZ-MONTERREY, 2019). O desenho de SPs pode ser realizado a partir de ferramentas de bioinformática e técnicas computacionais, usando modelos estatísticos e bancos de dados funcionais para projetar novas sequências (de novo) ou melhorar as existentes a fim de otimizar suas atividades terapêuticas, suas características e propriedades físico-químicas; um exemplo desses bancos de dados para o desenho de SPs são: DADP (Database of anuran defence peptides) para o estudo de alguns peptídeos bioativos relacionados à defesa do hospedeiro; APD3 (Peptide Data Base), para peptídeos ativos contra organismos e antioxidantes; CAMP para identificar, prever e alterar a atividade antimicrobiana de peptídeos antimicrobianos naturais e sintéticos (GAWDE et al., 2023; LIMA et al., 2021; NOVKOVIĆ et al., 2012; TORRES et al., 2019; ZHANG et al., 2024).

Foi revelado que a síntese química é um dos padrões a serem seguidos para o desenvolvimento de peptídeos de origem sintética, que pode ser em fase solúvel e sólida; no entanto, isso depende das características ou propriedades desejadas; por exemplo, para peptídeos e proteínas maiores, geralmente são empregadas produções recombinantes, em que

os genes são expressos em um sistema *in vivo* ou *in vitro*; ou enzimáticas, em que os peptídeos são produzidos por meio de enzimas digestivas. Outro método usado é a fermentação microbiana, que envolve o uso de enzimas bacterianas para quebrar as proteínas em peptídeos menores (AKBARIAN et al., 2022; CHAI; VOO; CHEN, 2020; MARTIN et al., 2020; ZOMPRA et al., 2009).

Os peptídeos antimicrobianos naturais são biomoléculas que fazem parte do sistema imunológico de organismos vivos e, portanto, têm a propriedade de defender o hospedeiro contra agentes infecciosos; no entanto, esses produtos demonstraram algumas desvantagens, como a geração de metabólitos nocivos, alto custo de produção, longa sequência de aminoácidos, meia-vida curta devido à instabilidade das enzimas digestivas e alterações no pH (BOTO; DE LA LASTRA; GONZÁLEZ, 2018a; NORDSTRÖM; MALMSTEN, 2017; SARKAR; CHETIA; CHATTERJEE, 2021; TORRES et al., 2019; VANZOLINI et al., 2022). Os SAMPs têm a particularidade de superar as desvantagens que caracterizam os peptídeos naturais para melhorar sua eficiência, pois não precisam de concentrações mais altas para exercer seu mecanismo de ação (BOTO; DE LA LASTRA; GONZÁLEZ, 2018b; LIMA et al., 2021).

1.4.2.1 Peptídeos sintéticos antimicrobianos (SAMPs) para o tratamento do câncer.

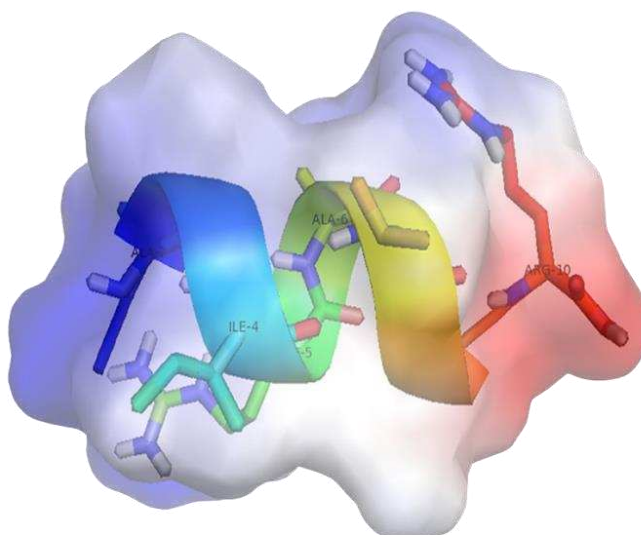
Foi demonstrado que os SAMPs têm atividade contra vários tipos de câncer, como câncer de mama, câncer de pulmão, câncer de fígado, leucemia e câncer gástrico (AGHAMIRI et al., 2021; CHEN et al., 2012a; KUNDA, 2020; PAN et al., 2015; TONK; VILCINSKAS; RAHNAMAEIAN, 2016; ZHANG; YANG; ERICSSON, 2019). O caráter catiônico, a seletividade e a hidrofobicidade permitem que eles tenham atividade nas células cancerígenas, pois compartilham algumas semelhanças com a célula bacteriana, como os lipídios carregados de ânions que lhes conferem características de membrana; essas propriedades contribuem para considerar um reposicionamento para seu uso como terapia anticancerígena (DE ALMEIDA GOMES et al., 2024; LU et al., 2022; YANG et al., 2017).

Ao desenhar SAMPs contra o CCR, são fornecidos detalhes de seus aspectos moleculares, o que contribui para a compreensão de como agem em seu local de ação. Da mesma forma, permite a manutenção e melhoria de alguns critérios como hidrofobicidade e carga positiva, que é derivada da alteração de alguns aminoácidos na sequência original. Um exemplo disso é a substituição de Ala por Lys, que resulta no aumento da carga catiônica, o que permitirá melhor interação com a membrana celular. Em geral, esses fatores permitem eliminar algumas deficiências terapêuticas que seus análogos naturais têm proporcionado, além da

redução ou ausência de citotoxicidade nas células normais (CHAUHAN et al., 2021; LIU et al., 2019).

Souza e colaboradores (2020) desenvolveram uma metodologia para o desenho de SAMPs, o que permitiu sua caracterização e otimização por meio de ferramentas de bioinformática. Para o desenho desses peptídeos, a proteína quinase foi selecionada aleatoriamente para obter uma sequência de proteína, obtida do banco de dados do NCBI; em seguida, os servidores dPABB e CellPPD foram selecionados para caracterizá-los com base em sua atividade antibiofilme e penetração celular, respectivamente (GAUTAM et al., 2015; SHARMA et al., 2016). Um desses SAMPs desenhados foi o GATIRAVNSR denominado PepGAT, que atendeu às características mencionadas acima, além de ter uma sequência curta de dez resíduos de aminoácidos. Em relação às suas propriedades físico-químicas e biológicas, nesse estudo verificou-se que o peptídeo PepGAT tem carga (+2), portanto, foi considerado catiônico; paralelamente, observou-se que ele tem uma proporção hidrofóbica de 40% e um índice Boman $\leq 2,5$, o que confere atividade antimicrobiana (HUANG; HUANG; CHEN, 2010; SOUZA et al., 2020). A Figura 2 mostra os modelos 3D da estrutura helicoidal secundária de PepGAT. A estrutura helicoidal secundária do PepGAT possui duas voltas.

Figura 2 - Modelo 3D de PepGAT



Fonte: Adaptado de SOUZA et al., (2020)

Esse modelo foi obtido usando a ferramenta de bioinformática PEPFold (THÉVENET et al., 2012), onde as superfícies azuis representam aminoácidos catiônicos, especialmente devido à presença de dois resíduos de arginina (R), e as superfícies vermelhas representam aminoácidos aniônicos, devido à existência de dois resíduos de lisina (K) e um de arginina (R).

O PepGAT apresentou uma massa experimental de 1044,90 Da. Após a análise de bioinformática, ele foi sintetizado pela empresa Chempeptide Limited (<http://chempeptide.com/> - Shanghai, China) com qualidade e pureza $\geq 95\%$, que foi avaliada por cromatografia líquida de alto desempenho de fase reversa acoplada à espectrometria de massa (DIAS et al., 2020). Os ensaios antibacterianos mostraram que o PepGAT ($50 \mu\text{g. mL}^{-1}$) inibiu *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *B. subtilis* e *S. entérica* em 25, 38, 31 e 80%. Seu mecanismo de ação foi o dano, a alteração na membrana e superprodução de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) - *Reactive Oxygen Species* (ROS) na célula bacteriana (SOUZA et al., 2020). Por fim, o PepGAT não apresentou capacidade alergênica, hemolítica (pois não foi tóxico para eritrócitos de coelho) (SOUZA et al., 2020) e tóxica, apresentando segurança para embriões de peixe-zebra e células humanas (fibroblastos de pulmão fetal humano, MRC-5 e queratinócitos HaCaT) que é um aspecto importante para suas aplicações clínicas (SOUZA et al., 2022).

Consequentemente, a avaliação dos SPs para CCR poderia incorporar diversas vantagens que já foram observadas nos SAMPs, como apresentar funções que não eram propriedade do protótipo original. Dado que há anos não estava muito claro se os SPs poderiam combater as células cancerígenas (HOSKIN; RAMAMOORTHY, 2008; SOUZA et al., 2020). Todos esses aspectos evidenciaram a necessidade da pesquisa *in vitro* e *in silico* do peptídeo PepGAT para estudar sua atividade no CCR.

De forma preliminar, nosso grupo de pesquisa analisou a atividade citotóxica do PepGAT ($95 \mu\text{M}$) em quatro linhas celulares (AGP-01, HCT116, MCF7 e SKMEL19; correspondentes o adenocarcinoma gástrico, CCR, câncer de mama e melanoma maligno da pele, respectivamente), das quais a HCT116 apresentou uma inibição maior de 58,69%. Vale a pena mencionar que, para essa análise, o 5-FU (23 nM) foi usado como controle positivo e o DMSO ($0,1\%$) como controle negativo. Consequentemente, foi obtida uma concentração inibitória média (CI₅₀) de $125,4 \mu\text{M}$ (MESQUITA et al., 2024). Este dado não está longe do que é afirmado na literatura onde foram encontrados valores semelhantes ou superiores ao CI₅₀ de $125,4 \mu\text{M}$. A Tabela 1 apresenta o CI₅₀ de alguns peptídeos sintéticos em diferentes linhagens de células cancerosas em comparação com PepGAT.

Tabela 1 - Citotoxicidade de alguns peptídeos sintéticos contra diferentes linhagens de células cancerosas

Composto	CI50 (µM)	Linhagens celulares	Referência
Ple	> 500	WiDr	HSU et al., 2022
GIGB-300	271,00	A549	CIRIGLIANO et al., 2017
LTX318	248,00	HT-29	CHAUHAN et al., 2021
Ple-a	197,30	WiDr	HSU et al., 2022
(RW) ₃	159,00	MCF7	BAUKE ALBADA et al., 2012
(RW) ₃	143,00	HepG2	BAUKE ALBADA et al., 2012
(RW) ₃	132,00	HT-29	BAUKE ALBADA et al., 2012
PepGAT	125,4	HCT-116	MESQUITA et al., 2024

CI50: concentração inibitória média. WiDr: adenocarcinoma de cólon. A549: câncer de pulmão. HT-29: carcinoma de cólon. MCF7: câncer de mama. HepG2: carcinoma hepático. HCT-116: câncer colorretal.

Nos últimos anos, medicamentos anticâncer de origem peptídica foram estudados com o objetivo de superar a fase clínica. Até o momento, cinco peptídeos foram aprovados pela Administração de Alimentos e Medicamentos - *Food and Drug Administration* (FDA) e pela Agência Europeia de Medicamentos - *European Medicines Agency* (EMA) (CHINNADURAI et al., 2023). Destes, os primeiros três: Tebentafusp (CHEN; CARVAJAL, 2022; HOWLETT et al., 2023), Buserelina (AGUILAR-ROJAS et al., 2012), e a Triptorelina (MERSEBURGER; HUPE, 2016; PLOUSSARD; MONGIAT-ARTUS, 2013), são baseados em SPs, enquanto a Dactinomicina é a Plitidepsina são compostos derivado de produtos naturais (BEZIAT et al., 2020; LEISCH; EGGLE; GREIL, 2019; LOSADA et al., 2020; MOORE et al., 1999).

Embora peptídeos com potencial para o tratamento do CCR tenham sido identificados, sua aprovação pela FDA ou EMA ainda não foi alcançada. Um dos principais obstáculos é a transição prolongada para a fase clínica, frequentemente apontada como limitante para que esses tratamentos sejam utilizados como terapia contra o CCR (COOPER et al., 2021). Um exemplo é o Dolcanatida, um peptídeo sintético desenvolvido para o tratamento de problemas gastrointestinais, que podem estar associados ao desenvolvimento do CCR (CABRI et al., 2021). Isso justifica a necessidade de continuar investigando novos tratamentos, como o PepGAT, que, além de apresentar citotoxicidade contra células HCT-116, induziu a fragmentação nuclear, afetando o ciclo celular. Observou-se um aumento do número de células

na fase Sub-G1, acompanhado por uma redução na fase S e, como consequência, sua parada na fase G2/M (MESQUITA et al., 2024).

Além disso, foi demonstrado que o PepGAT desencadeia apoptose em células HCT-116, reguladas pela via da caspase 3/7, além de induzir superprodução de ROS, danos à membrana celular por formação de poros e consequente morte celular (MESQUITA et al., 2024). Nesse contexto, observou-se que o PepGAT reduziu em 70% a capacidade de invasão das células HCT-116 em uma matriz extracelular, além de modular a expressão de genes associados a eventos pró-apoptóticos, como o aumento na expressão de *BAX* e supressão da expressão de *KRAS* (MESQUITA et al., 2024).

Apesar desses dados promissores, ainda existem aspectos que precisam ser avaliados, como a realização de um estudo mais detalhado sobre seu efeito, incluindo a análise do perfil proteico, a fim de obter informações mais precisas sobre seu mecanismo de ação. Além disso, é necessária uma avaliação do efeito combinatório de PepGAT com 5-FU em células HCT-116. Nesse sentido, será realizada uma análise para investigar o perfil proteico e analisar a resposta celular após o tratamento com PepGAT.

2HIPÓTESE

O tratamento com PepGAT em células HCT-116 tem o potencial de modular o proteoma celular, fornecendo informações relevantes sobre seu mecanismo de ação; além de aumentar a suscetibilidade das células HCT-116 ao 5-FU.

3OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Analisar o perfil proteico em linhagens de células tumorais HCT-116 após tratamento com PepGAT.

3.2 objetivos específicos

- ✓ Avaliar o efeito de PepGAT com base na sua citotoxicidade, determinando o valor de CI50, como investigar o seu mecanismo de ação.
- ✓ Comparar o perfil proteico entre o grupo controle e o grupo tratado com PepGAT.
- ✓ Avaliar o efeito combinatório de PepGAT com 5-FU, investigando um possível efeito sinérgico.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Manutenção e cultura de célula

A linhagens de CCR HCT116 foi obtida do banco de células do Laboratório de Farmacogenética do Nucleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM), cultivada em meio *Dulbecco's Meio de Eagle modificado* (DMEM), suplementada com 10% de soro fetal bovino (FBS) (Gibco®) e 1% de antibiótico penicilina-estreptomicina (5000 U/mL e 5000 mg/mL, respectivamente) (Invitrogen®), mantido em uma incubadora a 37°C em 5% de CO₂. Foi observado a confluência celular em um microscópio invertido (Leica DMIL LED). As células foram lavadas em solução tampão de fosfato (PBS), dissociadas com tripsina-EDTA a 0,5%, que foi inativada com DMEM.

4.2 Ensaio de fluorescência para avaliação da integridade da membrana por iodeto de propídio (IP)

As células HCT-116 foram semeadas em placas de 96 poços, a uma densidade de $0,3 \times 10^4$ por poço por diferentes períodos (12, 14, 16 e 18 horas). Após do semeado, elas foram tratadas em triplicata com PepGAT na sua concentração correspondente à CI50. O DMSO a 0,01% foi utilizado como controle negativo. Além da lavagem dos poços com PBS (10%), as células foram removidas com tripsina-EDTA (0,25%) e neutralizadas com DMEM. Após a centrifugação, o pellet foi ressuspensão no escuro por 30 min com IP (5 µg/mL). A suspensão resultante foi transferida para suas placas correspondentes para leitura em um Cytation 3 Cell Multi-mode Reader (BioTek®), com um filtro de fluorescência de excitação e emissão de 535 nm e 617 nm, respectivamente.

4.3 Análise de espécies reativas de oxigênio (EROs)

A linhagem de células HCT-116 foi semeada em placas de 96 poços ($0,3 \times 10^4$ por poço) em 12, 14, 16 e 18 horas. Após do semeado, elas foram tratadas em triplicata com PepGAT em sua correspondente concentração CI50 e o DMSO, 0,01% foi usado como controle negativo. Após a lavagem das células com PBS, elas foram separadas com tripsina-EDTA (0,25%). O complexo enzimático foi neutralizado com DMEM centrifugado, e o *pellet* resultante foi ressuspensão com Diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA, 10 µM) e incubado por 30 min no escuro. Esta suspensão foi transferida para suas placas correspondentes para realizar as leituras em um leitor de microplacas Cytation 3 Cell Multi-mode Reader (BioTek®) com comprimentos de onda de excitação e emissão de 480 nm e 525 nm, respectivamente.

4.4 Lise e extração do proteoma celular: preparação das amostras tratadas com PepGAT para a análise proteômica

As células HCT116 (1×10^6 por poço) foram semeadas em placas de seis poços durante 24 horas. Após do semeado, elas foram tratadas com PepGAT por 24 horas na concentração CI50 (125,4 μ M). 0,01% de dimetilsulfóxido (DMSO) foi usado como controle negativo. As amostras foram deixadas para incubar por 24 h em atmosfera umidificada a 37°C e 5% de CO₂. Após a incubação, as células foram removidas usando tripsina-EDTA (0,25%) por 15 min. Depois, a tripsina foi neutralizada com DMEM, e as células foram lavadas três vezes com 50 mM de NA⁺-acetato, pH 5,2 e centrifugadas a 5000 g por 5 min a 10 °C. Para análise proteômica, foi seguida a metodologia descrita por BRANCO et al., 2022. Resumidamente, as células foram congeladas em 50 mM de NA⁺-acetato pH 5,2, sonicadas por 60 min, depois congeladas novamente, e sonicadas novamente por 60 min, e então centrifugadas a 10 000 g, por 10 min a 4 °C. O sobrenadante com proteínas foi coletado, e a quantificação de proteínas foi feita usando o equipamento Nanodrop (ThermoFisher).

4.5 Digestão de proteínas

As proteínas foram reduzidas com 10 mM de ditioneitol (DTT) por 1 hora a 37 °C em banho seco. Em seguida, foram alquiladas com 15 mM de iodoacetamida (IAA) por 30 min a 37 °C em banho seco. Após a redução e alquilação, as proteínas (100 mg) foram digeridas com tripsina (20 μ g/mL) por 17 horas a 37 °C no escuro. Os peptídeos digeridos foram dessalinizados em um dispositivo de vácuo acoplado a uma coluna de extração em fase sólida (SPE) C₁₈. Os peptídeos dessalinizados foram secos em um concentrador de vácuo SpeedVac (Concentrator Plus), ressuspensos em ácido fórmico (0,1%) e quantificados usando o Qubit Protein Assay Kit (ThermoFisher) para análise proteômica.

4.6 Análise proteômica

Os peptídeos dessalinizados (1 μ g) foram injetados em um cromatógrafo UHPLC (Thermo Scientific) com uma coluna capilar C₁₈ (PICOCHIP®) de 75 μ m de diâmetro interno x 15 μ m de ponta interna, em fase reversa, acoplada a um espectrômetro de massas Q Exactive Plus Orbitrab (Thermo Scientific). O gradiente de eluição do peptídeo foi realizado ao longo de 145 minutos, utilizando o solvente A (0,1% de ácido fórmico em água ultrapura) e o solvente B (0,1% de ácido fórmico em acetonitrila), a uma vazão de 0.300 μ L/min.

4.7 Análise de dados

A geração dos arquivos "raw", a deconvolução de espectros m/z, a quantificação e a identificação de proteínas foram realizadas com o software PatternLab (versão 5) (Carvalho et al., 2016). O banco de dados de referência do proteoma humano, Uniprot, foi utilizado até a obtenção das sequências *decoy*. A digestão com tripsina, a modificação fixa da carbamidometilação da cisteína e a modificação variável da oxidação da metionina foram incluídas na análise. Além da máxima parcimônia, foi realizada a *Peptide Spectrum Matching* (PSM) e o *Extracte Ion Chromatogram* (XIC) foi obtido com tolerância máxima de 10 ppm. O SEPro2 foi escolhido para pré-selecionar os resultados com maior confiança, mantendo uma taxa de descoberta falsa – *false discovery rate* (FDR) de 1%. Após a geração dos diagramas de Venn feitos na plataforma InteractiVenn para comparação entre os grupos (HEBERLE et al., 2015), a plataforma STRING (<https://string-db.org/>) foi utilizada para prever os mecanismos moleculares de possíveis interações entre proteínas reguladas diferencialmente.

As proteínas encontradas somente em um grupo foram consideradas exclusivamente desse grupo. Para as proteínas detectadas em ambos os grupos, chamadas proteínas sobrepostas, seguiu-se uma “*fold-change*” para identificar aquelas com acumulação para cima (*fold-change* >1,5; valor de $p < 0,05$) e as que acumularam para baixo (*fold-change* <0,5; valor de $p < 0,05$). Já as proteínas com *fold-change* entre 0,5 e 1,5 foram consideradas que não sofreram alteração (BRANCO et al., 2022).

4.8 Análise de enriquecimento funcional de ontologia genética (GO)

Foi realizado uma análise de enriquecimento funcional para determinar as proteínas reguladas diferencialmente. Para isso, foi considerado o proteoma humano do banco de dados UniProt. Foram destacadas as 5 primeiras proteínas mais reguladas (acumuladas para acima e para baixo) de cada grupo (controle e PepGAT) e também foram levadas em consideração as proteínas exclusivas, cujas vias foram caracterizadas em relação à sua função molecular, processo biológico e sua localização subcelular. As vias proteicas exclusivas e reguladas diferencialmente foram determinadas utilizando o software RStudios (versão 2023.03.0) onde os resultados foram considerados estatisticamente significativos para um valor de $p < 0,05$.

4.9 Avaliação da citotoxicidade do efeito combinado de PepGAT e 5-FU contra HCT-116

A citotoxicidade do PepGAT em combinação com 5-FU foi avaliada usando *Alamar Blue* e 5-FU sozinho como controle positivo. Para esse propósito, foi realizada uma curva dose-

resposta, onde PepGAT foi usado em seu CI50 e 5-FU na faixa de 0 nM a 40 nM. As células foram semeadas em uma placa de 96 poços em uma densidade de 3×10^3 células por poço e incubadas por 24 horas. Em seguida, as células foram tratadas apenas com PepGAT e combinadas com PepGAT + 5-FU por 24 e 72 horas. Após o término do tratamento, o Alamar Blue foi adicionado a 0,2 mg/mL e incubado por 3 horas. Finalmente, a leitura foi realizada pela BioTek Synergy H1 (BioTek, Winooski, VT), com comprimento de onda de excitação/emissão de 560/590 nm.

4.10 Avaliação da citotoxicidade em linhagem celular não tumoral pelo *Alamar Blue*

Em seguida, a linhagem celular não tumoral estabelecida a partir de fibroblastos pulmonares humanos MRC-5 foi usada para avaliar a citotoxicidade do 5-FU e sua combinação com PepGAT em 24 e 72 horas de tratamento. A linhagem celular MRC-5 foi semeada na concentração de 3×10^3 e 5×10^3 células/poço em uma placa de 96 poços por 24 e 72 horas de experimento, respectivamente. Após a fixação celular, as células MRC-5 foram tratadas com 5-FU em duas concentrações distintas: a concentração correspondente à CI50 do 5-FU contra o HCT-116 (23 nM) e a concentração correspondente à CI50 do 5-FU + PepGAT contra HCT-116 (6,9 nM). A combinação do PepGAT com o 5-FU (6,9 nM) também foi avaliada. Após o tempo de exposição, 20 µL do reagente Almar Blue (ThermoFisher) foram adicionados a cada poço. Após 3 horas, a fluorescência foi medida (Ex/Em: 590 nm/560 nm) no Cytation™ 3 Cell Imaging Multi-Mode Reader (Bio Tek) e a viabilidade foi avaliada.

4.11 Análise do ciclo celular

Para avaliar se a combinação de PepGAT e 5-FU tem um efeito influente no ciclo celular, foram semeadas células HCT-116 em placas de 24 poço a uma densidade de 3×10^4 por poço e então incubadas por 24 horas. Elas foram tratadas com PepGAT e 5-FU na CI50 (6,9 nM e 23 nM). Posteriormente, todas as células foram removidas dos poços e centrifugadas, onde o pellet obtido foi ressuspensão em uma solução de etanol a 80% a 4°C por 30 minutos para permitir a permeabilização das células. Após a centrifugação, as células ressuspensas foram incubadas com IP (50 µg/mL) por 25 minutos. Finalmente, após nova centrifugação, as células foram ressuspensas em PBS 1X para logo analisar 10.000 eventos de cada amostra por citometria de fluxo (BD FACSVerse™). Para a análise dos dados de citometria de fluxo foi utilizado o software FlowJo.

4.12 Análise de Apoptose

As células HCT-116 (3×10^4 por poço) foram semeadas em placas de 24 poços e incubadas durante 24 horas. Após do semeado, elas foram tratadas em combinação com PepGAT e 5 FU nas suas correspondentes CI50 por 24 horas. Depois disso, as células foram lavadas com PBS e ressuspensas em 200 μ L de tampão de ligação de Anexina contendo 4 μ L de Anexina V-FITC. Elas foram então incubadas com IP por 20 minutos utilizando o BD Pharmingen™ FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I. As células foram ressuspensas em PBS, e 10.000 eventos de cada amostra foram analisados por citometria de fluxo (BD FACSVerse™).

4.13 Análise da invasão da matriz extracelular na presença de PepGAT com 5-FU

Antes do ensaio de invasão, a viabilidade celular foi realizada usando o ensaio de azul de tripano. Em seguida, *pellets transwell* contendo um poro de 8 μ m e revestidos com Matrigel foram usados em uma placa de 6 poços. O Matrigel foi diluído em uma quantidade de 20 μ L em DMEM sem Soro Fetal Bovino (SFB) em uma proporção de 1:6, que foi adicionada dentro de cada inserto e incubado a 37 °C até que a solidificação fosse alcançada. Em seguida, 1 mL de DMEM sem SFB foi plaqueado em uma densidade de 40×10^4 células, que foram agregadas em cada inserto na câmara superior e tratadas com PepGAT (125,4 μ M) e em combinação com 5-FU (6,9 nM e 23 nM). Em seguida, 2 mL de DMEM com SFB foram adicionados às partes externas do inserto (dentro do mesmo poço) e incubados por 24 horas. Por fim, a parte interna do inserto foi descartada. As células que invadiram a matriz, passaram pelos poros e aderiram à superfície do inserto foram coradas com corante *Giemsa* para quantificação em microscópio invertido.

4.14 Extração total de RNA total e análise qPCR

Em seguida, buscamos investigar se o tratamento com PepGAT altera a expressão gênica dos genes metabólicos *HIF1A*, *SLC2A1*, *HK1*, *LDHA* E *PRPS1* na linhagem de células de câncer de cólon HCT-116. Assim, as células foram plaqueadas (1×10^6 células/poço) em uma placa de 6 poços e, após de 24 horas, os poços foram tratados com PepGAT por 24 horas. Depois da exposição, as células foram tripsinizadas e o mRNA total foi extraído usando o método TRIzol® Reagent (Life Technologies®, EUA), de acordo com o protocolo do fabricante. Em seguida, a concentração de RNA foi determinada usando NanoDrop (Thermo Scientific) e a transcrição reversa foi realizada usando o kit cDNA de alta capacidade (Life Technologies®, EUA).

A PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) foi realizada usando o kit Fast SyberGreen (Applied Biosystems, EUA). Os níveis de expressão de *HIF1A* (NM_001530.3), *SLC2A1* (NM_006516.2), *HK1* (NM_001322364.1), *LDHA* (NM_005566.3) e *PRPS1* (NM_002764.4) foram determinados usando o gene *RPLP0* (NM_001101.5) como referência para normalização da expressão entre os grupos. Esses genes foram escolhidos para validar o que foi encontrado na proteômica. A eficiência do primer foi determinada para todos os genes descritos. Todos os requisitos propostos em *Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments* - MIQE *Guidelines* foram seguidos. O nível de expressão foi calculado usando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$, considerando células não tratadas (controle negativo) como um calibrador dos experimentos. Usando o equipamento QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific). A tabela 2 mostra os primers utilizados na análise de qPCR.

Tabela 2 – Primers utilizados na análise de qPCR

Gene	Acesso	Primer forward	Primer reverse
<i>HIF1A</i>	NM_001530.3	CCCTGCACTCAATCAAGAAG	GGACTAGGTGTCTGATCCTG
<i>SLC2A1</i>	NM_006516.2	TCCTGCCCTGTTGTGTATAG	CAGGAGTGAGGTGGTGTATT
<i>HK1</i>	NM_001322364.1	GATCACGTGGACAAAGGGT	ACGTCCAGGTCAAATTCCTC
<i>LDHA</i>	NM_005566.3	TCTGGATTGAGCCCGATT	TACAGGCACACTGGAATCTC
<i>PRPS1</i>	NM_002764.4	ACCTCCATTGCAGACAGGCT	GATGGCCACCCGATCCTTCA
<i>RPLP0</i>	NM_001101.5	CTTGTCTGTGGAGACGGATTAC	TCTTCCTTGGCTTCAACCTTAG

4.15 Análises in silico da expressão de mRNA de alvos PepGAT em amostras de CCR

Assim, procuramos analisar a expressão de mRNA de proteínas que demonstraram ser reguladas negativamente pelo tratamento com PepGAT em bancos de dados com livre acesso contendo informações do transcriptoma do Atlas do Genoma do Cancer - *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) e Expressão de Genótipo-Tecido - *Genotype-Tissue Expression* (GTEx). Os padrões de expressão no tumor (n=275) e no normal (n=349) dos genes *SLC2A1*, *LDHA*, *GSS*, *TXNDC5*, *DDX21*, *NPM1*, *RCC2*, *PCNA*, *IDH1*, *RPIA*, *TXNDC17* e *FKBP4* foram avaliados pelo software GEPIA (<http://gepia.cancer-pku.cn/>).

4.16 Análise estatística

A análise de dados foi realizada a partir dos resultados para comparar médias entre os grupos com um desvio padrão de três repetições para cada experimento. O controle (0,1% DMSO) foi comparado com os grupos tratados utilizando ANOVA unidirecional para análise de citotoxicidade, ciclo celular, apoptose e invasão; bidirecional para análise da cinética de

espécies reativas de oxigênio (EROs) e porcentagem de permeabilização da membrana avaliando duas condições (o grupo tratado e o tempo), onde uma diferença significativa foi considerada para um valor $*P < 0,05$; $**P < 0,01$; $***P < 0,001$; $****P < 0,0001$. Os dados foram avaliados com o GraphPad Prism versão 10.3.0 (507).

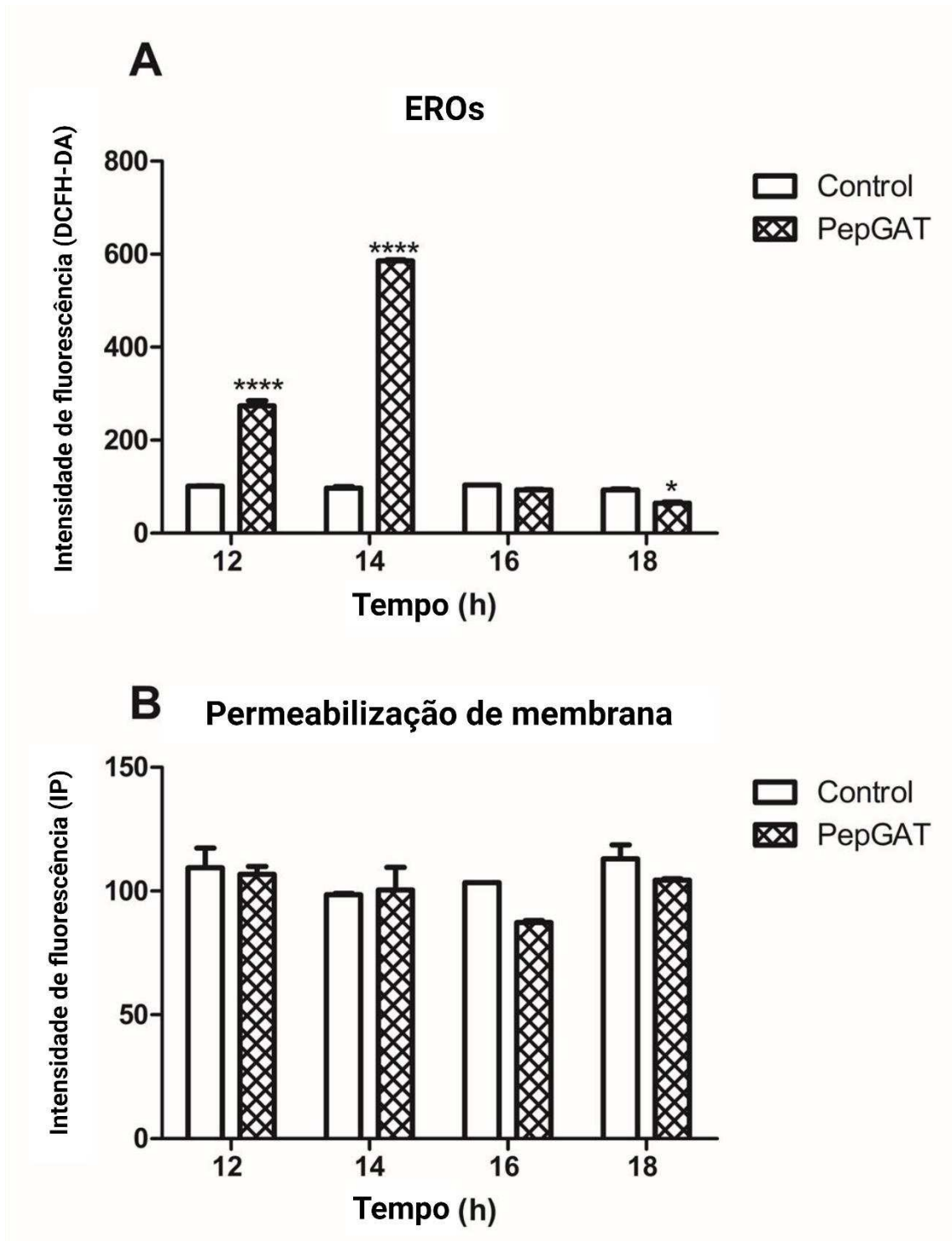
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PepGAT induz o acúmulo precoce de EROs nas células HCT-116

Nosso trabalho anterior relatou o efeito de PepGAT sozinho, com uma CI₅₀ de 125,4 μ M o que influenciou um aumento no acúmulo de EROs e na permeabilização da membrana em 24 h (MESQUITA et al., 2024). Apesar de serem importantes moléculas de sinalização (SIES; JONES, 2020), os níveis de EROs devem ser regulados; caso contrário, níveis desnecessariamente altos podem levar a célula à morte, induzindo danos ao DNA, proteínas e lipídios na membrana (AN et al., 2024). Foi demonstrado que a capacidade do PepGAT de aumentar a permeabilização da membrana é dependente de EROs em *Cryptococcus neoformans* (AGUIAR et al., 2023). Com base em uma análise cinética, tentamos mostrar a correlação entre o acúmulo de EROs e o aumento da permeabilização da membrana pela captação IP em células HCT-116 (Fig. 3).

Portanto, foi avaliado o acúmulo de EROs e a captação de IP em células HCT-116 tratadas com PepGAT ao longo do tempo (Fig. 3). A análise revelou que após 12 h de contato, o PepGAT aumentou o acúmulo de EROs em células HCT-116 2,8 vezes com o pico de acúmulo de EROs em 14 h aumentando o acúmulo de EROs 6,0 vezes do que as células controle (Fig. 3A). Os tempos de 16 e 18 h são marcados por uma redução de EROs e aumentaram novamente em 24 h, conforme revelado por nosso estudo anterior (MESQUITA et al., 2024). O aumento nos níveis de EROs ao longo do tempo não foi seguido pelo aumento na captação de IP pelas células HCT-116, conforme revelado na Fig. 3B. No entanto, mostramos anteriormente que em 24 h, o PepGAT induziu a permeabilização da membrana em células HCT-116 (MESQUITA et al., 2024). A explicação para isso se baseia na via pela qual a superprodução de ROS induzida pelo PepGAT levou a danos na membrana no HCT-116. As EROs induziram danos a várias moléculas importantes para a vida celular (AN et al., 2024).

Figura 3 – Análise do mecanismo de ação do PepGAT com base na cinética de acumulação de EROs e IP (para avaliar a integridade da membrana). (A) Acumulação de EROs (B) a captação de IP é medida por fluorescência ao longo do tempo. Os dados são representados como a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes. ANOVA e pós-teste de Tukey compararam os grupos com o controle negativo (0,01% DMSO). Diferenças significativas: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$.

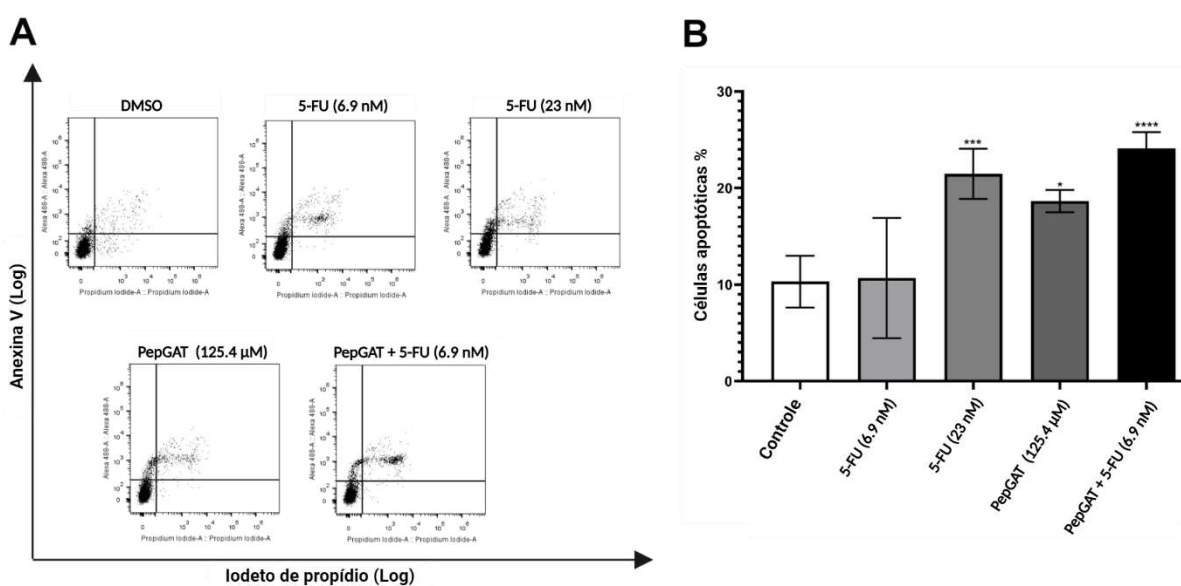


Fonte: dados da pesquisa.

A análise de citometria de fluxo revelou um número maior de células HCT-116 IP⁺ e Anexina V⁺, seguido por um número maior de células apoptóticas do que células de controle (Fig. 4), o que corrobora os níveis de EROs. Nosso trabalho anterior mostrou um aumento nos níveis de EROs em 24h, apoptose pela caspase 3/7, uma redução nos níveis de mRNA de BCL2 e um aumento nos níveis de mRNA de BAX (MESQUITA et al., 2024). Com base nesses dados, levantamos a hipótese de que o acúmulo anterior de EROs em 12 h e 14 h (Fig. 3A) levou a danos e fragmentação do DNA, desencadeando apoptose pela caspase 3/7. Além disso, os níveis mais altos do gene BAX pró-apoptótico e os baixos níveis do gene BCL2, que é um inibidor do apoptose, podem em última análise, levar as células HCT-116 à formação de poros e a morte celular (MCKENZIE et al., 2020).

Curiosamente, a capacidade do PepGAT de induzir mais cedo a superacumulação de EROs em células cancerígenas é semelhante a um medicamento anticâncer, a cisplatina (NERUSH et al., 2019). NERUSH et al., 2019 relataram acumulação de EROs induzida por cisplatina após 12 h de contato em células HeLa, seguida por eventos apoptóticos dependentes de EROs mais cedo. Os dados concordam com a acumulação mais cedo de EROs e apoptose induzida pelo PepGAT em células HCT-116 (Fig. 3 e 4). A anexina-V é um marcador para apoptose mais cedo (KUPCHO et al., 2019), sugerindo acumulação mais cedo de ROS induzida por PepGAT seguida por apoptose.

Figura 4 – Avaliação da morte celular após tratamento com PepGAT (125,4 μ M), 5 FU (6,9 nM e 23 nM) e a combinação de PepGAT + 5-FU (6,9 nM) por 72 h. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes. Os grupos foram comparados com



Fonte: dados da pesquisa.

o controle negativo (DMSO) por ANOVA e pós-teste de Tukey. Diferenças significativas: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$.

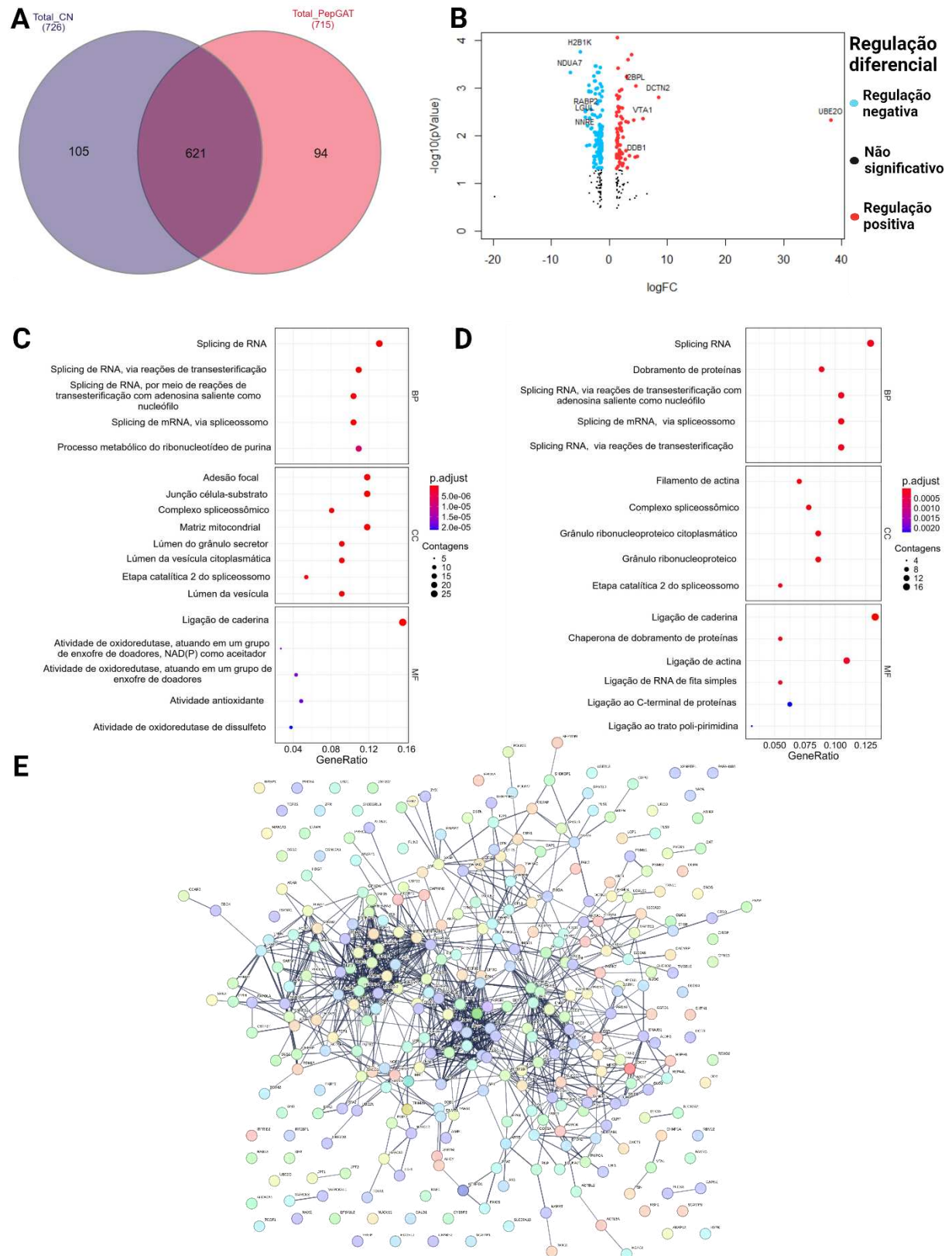
5.2 PepGAT induz alterações no perfil proteômico de células HCT-116

O CCR abrange vários aspectos moleculares, incluindo alterações na expressão gênica e acúmulo de proteínas (por exemplo, e-caderina, KRAS, β -catenina). No entanto, novas proteínas foram identificadas no estabelecimento do câncer nos últimos anos. As proteínas foram caracterizadas como componentes vitais de processos biológicos nos quais podem regular o progresso da doença. Nesse contexto, a análise proteômica tem sido uma técnica poderosa para entender as modificações proteicas entre um tipo de célula não cancerosa e cancerosa ou mesmo verificar o mecanismo de ação de compostos anticâncer (FRANCIOSA et al., 2023; LINDHORST; HUMMON, 2020; ZHOU et al., 2020). Em relação ao CCR, a proteômica forneceu resultados esclarecedores sobre as mudanças no perfil proteico, revelando novos biomarcadores do CCR (LINDHORST; HUMMON, 2020; ZHOU et al., 2020). Nesse sentido, a análise proteômica diferencial foi empregada para revisar o perfil proteômico das células HCT-116 tratadas com PepGAT em comparação com as células de controle.

Um total de 1441 proteínas foram identificadas, das quais 726 correspondem ao grupo controle e 715 ao grupo tratado com PepGAT (Fig. 5A e Tabelas Suplementares 1-3). O diagrama de Venn (Fig. 5B) destaca as proteínas exclusivas de cada grupo, onde 105 correspondem ao grupo controle (Tabela Suplementar 1) e 94 ao PepGAT (Fig. 5A e Tabela Suplementar 2). As 621 restantes representam as proteínas em comum (proteínas sobrepostas) entre os grupos. Destas 621, 314 proteínas foram reguladas diferencialmente com base em um $p < 0,05$, das quais 186 proteínas tiveram uma abundância reduzida (pontos azuis no gráfico do vulcão) em células HCT-116 após o tratamento com PepGAT e 128 tiveram uma maior abundância (pontos vermelhos no gráfico do vulcão) (Fig. 5B e Tabela Suplementar 3).

O estudo dos componentes celulares (CC) indicou que as proteínas diferencialmente acumuladas para baixo estavam significativamente envolvidas na matriz mitocondrial, adesão focal, junção do substrato celular e lúmen do grânulo secretor (Fig. 5C). Da mesma forma, as proteínas acumuladas para cima foram incluídas no grânulo de ribonucleoproteína citoplasmática, grânulo de ribonucleoproteína e complexo spliceossomal (Fig. 5D).

Figura 5 - Análise do perfil proteômico e vias GO de proteínas reguladas diferencialmente. (A) Diagrama de Venn mostrando as proteínas em comum e exclusivas do grupo controle e PepGAT. (B) Gráfico de vulcão de proteínas reguladas diferencialmente entre o grupo controle e PepGAT.



Fonte: dados da pesquisa.

(C) Análise de enriquecimento funcional GO de proteínas reguladas para baixo entre os grupos controle negativo (NC) e PepGAT: processo biológico (BP), componente celular (CC) e função molecular (MF). (D) Análise de enriquecimento funcional GO de proteínas reguladas para cima entre os grupos controle negativo (NC) e PepGAT: processo biológico (BP), componente celular (CC) e função molecular (MF). (E) Usando o banco de dados STRING, a rede de interação proteína-proteína foi construída pelas proteínas reguladas diferencialmente entre os grupos.

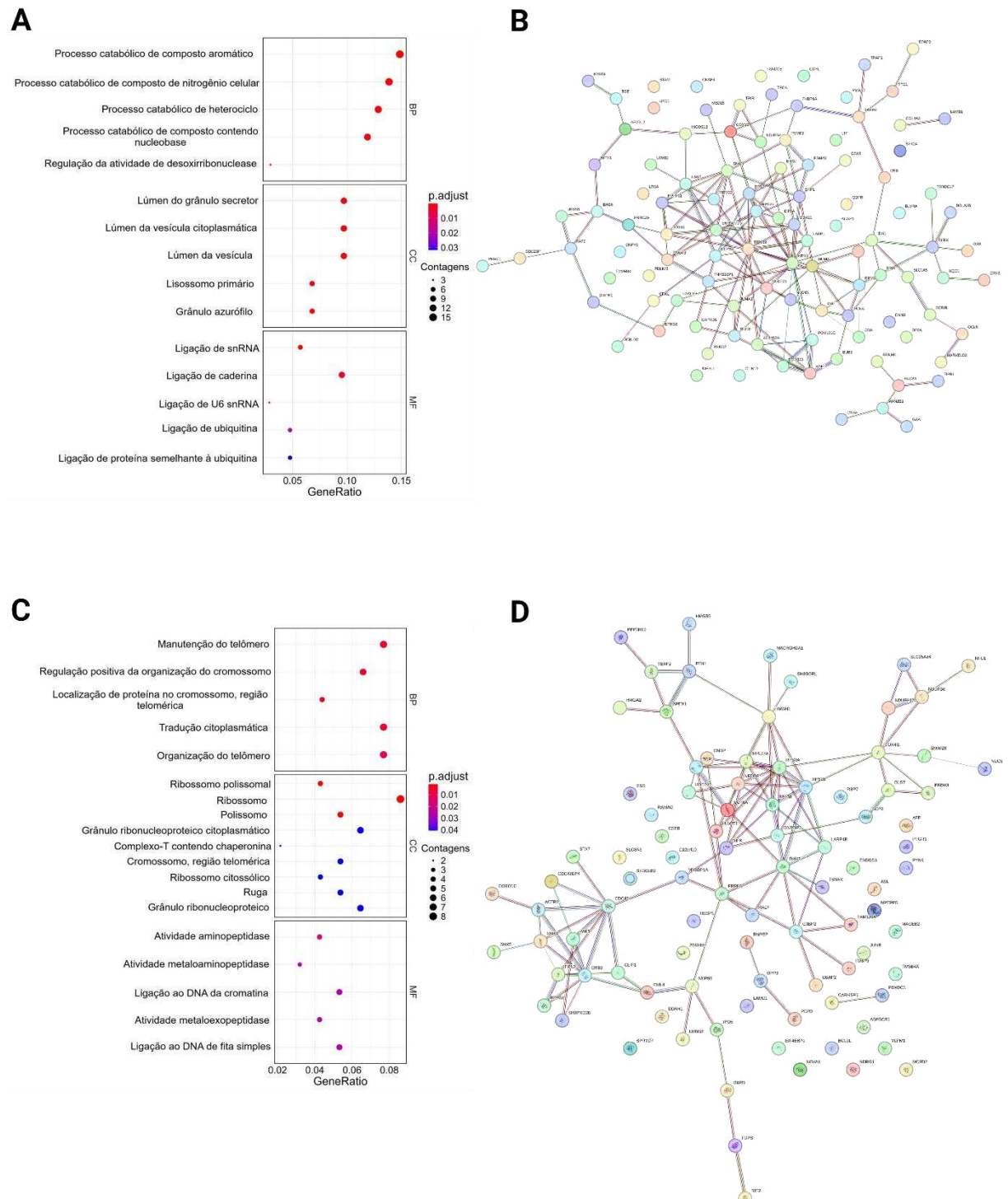
Em relação ao processo biológico (BP) entre o grupo controle e PepGAT, as proteínas acumuladas para baixo estavam envolvidas principalmente no splicing do metabolismo do RNA, por meio de reações de transesterificação, incluindo reações de transesterificação com adenosina domada como nucleófilo e o spliceossomo (Fig. 5C). Enquanto as proteínas acumuladas para cima estavam envolvidas de forma semelhante com o splicing do RNA e o dobramento de proteínas (Fig. 5D). A avaliação da função molecular (MF) demonstrou que entre as proteínas acumuladas para baixo estão aquelas com funções como ligação à caderina e atividade antioxidante. Em contraste, as proteínas acumuladas para cima funcionam no dobramento de proteínas, replicação de RNA, ligação de caderina e ligação de actina (Fig. 3C e D). A Figura 3E mostra a rede de interação proteína-proteína obtida da plataforma *STRING* das proteínas diferencialmente moduladas envolvidas nas células HCT- após o tratamento com PepGAT.

5.3 Proteínas exclusivas do controle revelaram baixo acúmulo de proteínas essenciais para a sobrevivência do câncer

Conforme revelado na Fig. 5A, das 726 proteínas identificadas nas células HCT-116, 105 foram detectadas exclusivamente em células não tratadas. Isso significa que, após o tratamento com PepGAT, essas proteínas se tornaram ausentes e não foram detectadas (menos abundantes) pela análise MS/MS. Elas foram chamadas de proteínas exclusivas, e algumas delas merecem atenção. Um exemplo dessas proteínas são a glutathione sintetase (GS) e a glutaredoxina-1 (GLRX). Essas proteínas exclusivas das células do controle estavam em várias localizações subcelulares e estão envolvidas em muitas vias biológicas (Fig. 6A).

A interação proteína-proteína, *STRING*, revelou uma via intrincada formada por essas proteínas, que estão envolvidas na progressão do câncer (fig. 6B). Apesar da classificação com base na análise GO (Fig. 6A), foi feita uma classificação secundária com base em uma revisão da literatura para conectar melhor essas proteínas, considerando uma compreensão mais profunda das informações trazidas pela modulação negativa dessas proteínas. Essas proteínas foram classificadas como envolvidas em estresse oxidativo, dano ao DNA e apoptose, ciclo celular e progressão e metabolismo do câncer.

Figura 6 – Análise de enriquecimento funcional de proteínas exclusivas entre o controle e PepGAT. (A) Análise de enriquecimento funcional GO das proteínas exclusivas do controle: processo biológico (BP), componente celular (CC) e função celular (MF). (B) A rede de interação proteína-proteína é gerada pelas proteínas exclusivas do controle usando a plataforma STRING. (C) Análise de enriquecimento funcional GO para proteínas exclusivas do PepGAT: processo biológico (BP), componente celular (CC) e função molecular (MF). (D) A rede de interação proteína-proteína corresponde as proteínas exclusivas do PepGAT.



Fonte: dados da pesquisa

5.4 Proteínas envolvidas no estresse oxidativo

As EROs são moléculas oxidativas onipresentes, um subproduto das reações normais do metabolismo que mantêm as células vivas. Atualmente, é amplamente aceito que níveis baixos (fisiológicos) de EROs são fundamentais para o desenvolvimento e o crescimento das células, pois modulam a expressão gênica. No câncer, um leve aumento nos níveis de EROs devido a altas taxas metabólicas é vital para induzir a progressão e a promoção do tumor, pois induzem mutações no DNA (AGGARWAL et al., 2019; AN et al., 2024). Caso contrário, os níveis descontrolados de EROs nas células cancerígenas poderiam conduzir as células de forma indesejada, desencadeando a morte celular programada. Por segurança, as células cancerígenas aumentam os mecanismos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos para extinguir os níveis mais altos de EROs (AGGARWAL et al., 2019; AN et al., 2024).

Conforme discutido anteriormente, o PepGAT induz o acúmulo excessivo de EROs às 12 e 14 horas (Fig. 3A), seguido de apoptose (Fig. 4). Está claro que o PepGAT induz o estresse oxidativo nas células HCT-116. Além disso, a análise proteômica revelou que o tratamento com PepGAT induziu uma diminuição na abundância de várias enzimas antioxidantes, como a glutathione sintetase (GS), a tiosulfato sulfurtransferase (THTR), a NAD(P)H desidrogenase [quinona] 1 (NQO1), a glutaredoxina-1 (GLRX) e a proteína 5 que contém o domínio da tioredoxina (TRX5). Todas essas enzimas já foram relacionadas à manutenção de níveis seguros de EROs em muitos tipos de cânceres (AGGARWAL et al., 2019; BRZOWA-ZASADA et al., 2024; KIM et al., 2015). A redução na abundância dessas proteínas nas células HCT-116 tratadas com PepGAT está de acordo com o alto acúmulo dos níveis de EROs (Fig. 3A).

No caso do CCR, as proteínas GS, NQO1, GLRX e TRX5 protegem as células do CCR do estresse oxidativo, da manutenção do microambiente e da hipóxia (BRZOWA-ZASADA et al., 2024; FRERIKSEN et al., 2014; KIM et al., 2015; STROHKAMP et al., 2018). Níveis elevados de EROs podem danificar lipídios, DNA e proteínas, levando as células cancerosas à morte celular oxidativa de várias maneiras, como apoptose e necroptose. Recentemente, o desenvolvimento de medicamentos que podem induzir a morte celular oxidativa tem sido promissor no tratamento do câncer (AN et al., 2024). Nesse cenário, o PepGAT se apresenta como uma molécula em potencial a ser analisada mais detalhadamente porque induz níveis mais altos de EROs e diminui o nível de proteínas antioxidantes.

5.5 Proteínas envolvidas no metabolismo do ácido nucleico e no ciclo celular

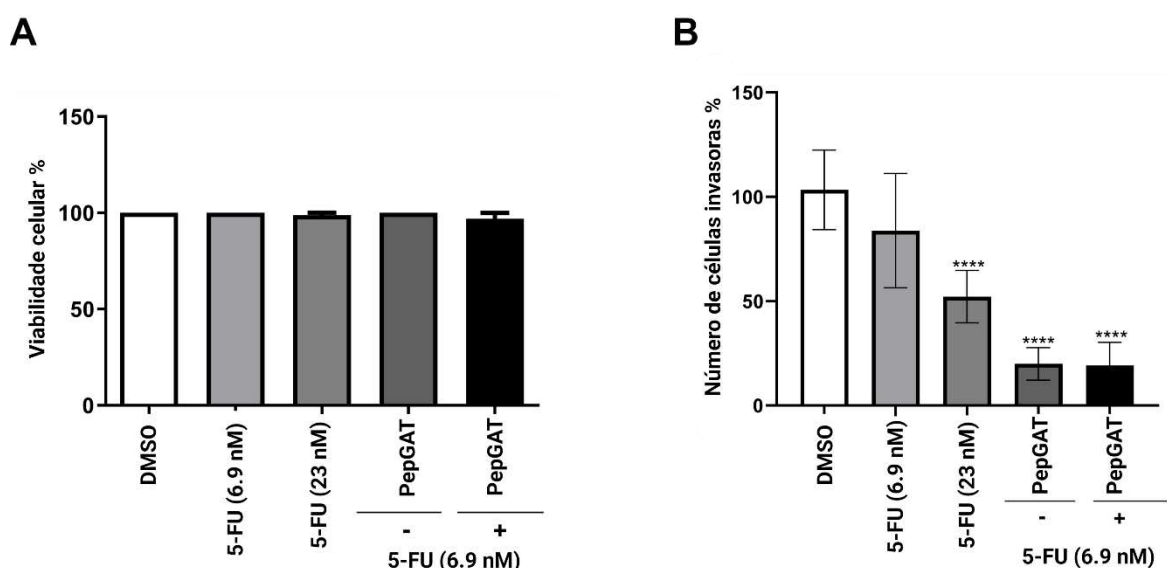
Após o tratamento com PepGAT, duas helicases de RNA *dead-box* diminuem em abundância, a Nucleolar RNA helicases 2 (DDX21) e a provável RNA helicases dependente de ATP DDX46 (DDX46). Ainda desconhecidas, as proteínas *dead-box* são encontradas em níveis mais altos nas células cancerosas (LI et al., 2015; TANAKA et al., 2020). Especificamente no CCR, a DDX21 e a DDX46 são altamente expressas e associadas ao mau prognóstico e à agressividade do câncer. Em dois estudos diferentes, o *silenciamento* de *DDX21* e *DDX46* induziu a apoptose na linha celular de CCR HCT-116 (LI et al., 2015; LIN et al., 2020; TANAKA et al., 2020).

Por exemplo, LI et al. estudaram 123 amostras de pacientes com CCR e *DDX46*, que foi altamente expresso. O *knockdown* do *DDX46* reduziu a proliferação celular, o crescimento, a formação de colônias e levou as células à apoptose (LI et al., 2015). Portanto, é possível sugerir que a redução de DDX21 e DDX46 nas células HCT-116 por PepGAT leva as células à apoptose, evitando assim a progressão do câncer. Aqui, a análise proteômica revelou que as células HCT-116 tratadas com PepGAT apresentaram uma abundância reduzida de DDX21 e DDX46 e um número maior de células apoptóticas do que as células de controle (Fig. 4).

Outra proteína interessante, o fator de licenciamento de replicação de DNA (MCM4), teve sua abundância reduzida após o tratamento com PepGAT. Essa proteína pertence à família de proteínas de manutenção do minicromossomo, que está envolvida na estabilidade do genoma e na replicação do DNA. Recentemente, a MCM4 foi altamente expressa em muitos tipos de câncer, incluindo o CCR, associado à agressividade, invasão e metástase e inibe a apoptose (KOBAYASHI et al., 2023; LI et al., 2024). Em uma análise multi-ômica do câncer, LI et al. relataram que a MCM4 é um promissor biomarcador de prognóstico e diagnóstico para muitos tipos de câncer. A correlação da MCM4 com a invasão é interessante porque o PepGAT inibiu a invasão das células HCT-116 (Fig. 7) às 24 horas. Aqui, a diminuição na abundância de MCM4 corrobora com a inibição da invasão.

A nucleofosmina (NPM1) é uma proteína multifacetada com várias funções no câncer (GRISENDI et al., 2006; WANG et al., 2022; YU et al., 2021) cuja abundância foi reduzida nas células tratadas com PepGAT. Vários estudos relataram a alta expressão da NPM1 em vários tipos de câncer, inclusive de próstata, CCR, cabeça e pescoço, rim e leucemia (GRISENDI et al., 2006; SEKHAR; FREEMAN, 2023; WANG et al., 2022; YU et al., 2021).

Figura 7 – Avaliação da invasão celular após o tratamento com o peptídeo sintético PepGAT (125,4 μ M), 5-FU (6,9 nM e 23 nM) e a combinação de PepGAT + 5-FU (6,9 nM) por 24 h. (A) O tratamento com PepGAT, 5-FU e a combinação de PepGAT + 5-FU não afetou a viabilidade celular após 24 h de tratamento. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de azul de tripano para demonstrar o tempo não citotóxico e excluir a possibilidade de interferência no ensaio de invasão. (B) Número de células invasoras usando uma inserção de 0,8 μ m de diâmetro que contribui para a análise em um único momento. Os dados são expressos como a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes. Os grupos foram comparados com o controle negativo (DMSO) usando ANOVA e pós-teste TUKEY. Diferenças significativas: **** $P < 0.0001$.



Fonte: dados da pesquisa

Entre as muitas funções da NMP1 está a tolerância a danos no DNA e o reparo do DNA danificado, o que favorece a maior divisão celular em células cancerígenas. Um tipo de reparo realizado pela NMP1 é o reparo de excisão de base (SEKHAR; FREEMAN, 2023). Isso é interessante porque as EROs causam danos às bases do DNA (SEKHAR; FREEMAN, 2023), e aqui mostramos que o PepGAT induziu um acúmulo maior de EROs anteriormente (Fig. 3A), o que poderia causar danos às bases do DNA. Portanto, os níveis mais altos de EROs e o acúmulo reduzido de NMP1 após o tratamento com PepGAT poderiam danificar o DNA das células HCT-116.

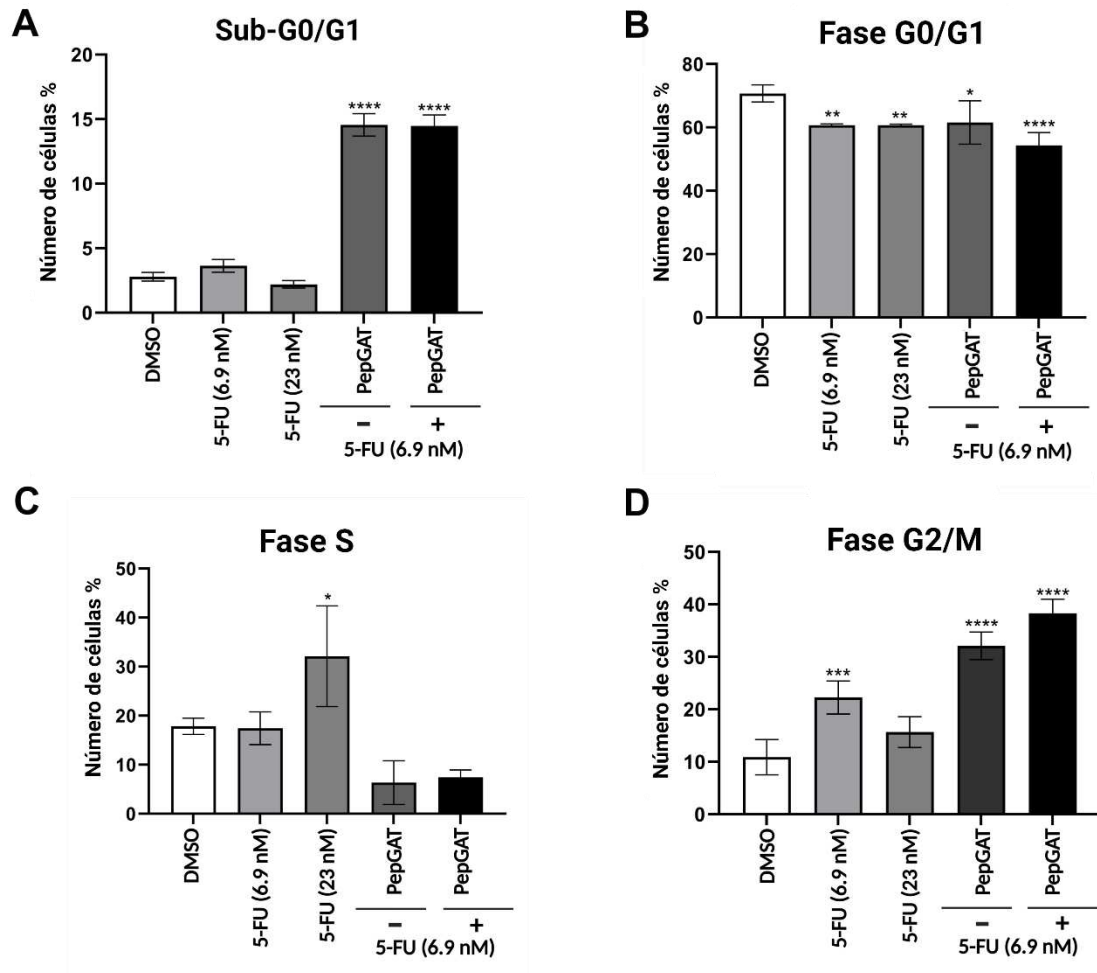
WANG et al. Revelaram que o *knockdown* do NMP1 em células HCT-116 levou ao aumento da produção de EROs, a parada do ciclo celular na fase G1 e à inibição da proliferação celular in vitro. O PepGAT induz a parada do ciclo celular na fase subG0/G1 (15% das células) (Fig. 8A) e na fase G2/M (30% das células) (Fig. 8D). Em outro estudo, YU et al., empregando um xenoinxerto com células HCT-116, demonstraram que a supressão da NMP1 inibe o crescimento, a progressão e a agressividade do tumor de CCR in vivo. Além disso, as células

HCT-116 suprimidas para NMP1 entraram em apoptose via caspase 3/7 (YU et al., 2021). Recentemente, publicamos que o PepGAT induz a morte celular pela caspase 3/7, que pode ser causada pelo acúmulo anterior de EROs nas células (MESQUITA et al., 2024). Em conjunto esses estudos sugerem fortemente a importância da NMP1 no CCR. Ao induzir o acúmulo reduzido dessa proteína, o PepGAT pode estar causando danos graves ao HCT-116, o que os levou à morte.

Em relação ao ciclo celular, duas proteínas interessantes foram encontradas exclusivamente no controle e não foram detectadas nas células tratadas com PepGAT. Elas são o Regulador da condensação cromossômica 2 (RCC2) e o Antígeno nuclear de células em proliferação (PCNA). A RCC2 é um membro das proteínas envolvidas na regulação da condensação da cromatina e é essencial para que a mitose prossiga adequadamente; por estar envolvida na citocinese de segregação de cromossomos (CALDERON-APARICIO; BODE, 2021), a redução dessa proteína nas células HCT-116 corrobora com a parada do ciclo celular na fase G2/M (Fig. 8D). O RCC2 regula a replicação do DNA, o transporte nucleocitoplasmático, o controle do ciclo celular e os danos ao DNA (CALDERON-APARICIO; BODE, 2021; GONG et al., 2023; GUO et al., 2021; PENG et al., 2023). Sua expressão mais alta está associada à tumorigênese, à tolerância a danos no DNA, ao desenvolvimento de tumores e à migração de células tumorais em muitos tipos de câncer, como mama e CCR (CALDERON-APARICIO; BODE, 2021; GONG et al., 2023; GUO et al., 2021; PENG et al., 2023). A importância do RCC2 para a mitose e sua diminuição nas células tratadas com PepGAT concordaram com os resultados do ciclo celular, que demonstraram que a parada do ciclo celular induzida por PepGAT na fase G2/M (Fig. 8D), indicando que o HCT-116 não encaminhou a divisão celular.

O PCNA é uma proteína altamente expressa em muitos tipos de câncer e envolvida na replicação do DNA e na regulação do ciclo celular, que é um biomarcador da progressão do câncer e um prognóstico ruim para os pacientes (CARDANO; TRIBIOLI; PROSPERI, 2020; GERA; PATIL; BHOSALE, 2024; LEMECH et al., 2023; SMITH et al., 2020; YE et al., 2020). A redução em sua abundância nas células HCT-116 tratadas com PepGAT indica comprometimento no ciclo celular induzido pelo PepGAT. Em 2023, um novo medicamento, o ATX-101 (Um peptídeo sintético), que inibe o PCNA, entrou em testes clínicos na Fase 1. Em 2023, um novo medicamento, o ATX-101 (um peptídeo sintético), que inibe o PCNA, entrou em testes clínicos na Fase 1.

Figura 8 – Análise do ciclo celular após o tratamento com o peptídeo sintético PepGAT (125,4 μ M), 5-FU (6,9 nM e 23 nM) e a combinação de PepGAT + 5-FU por 72 h. O processo celular do HCT-116+ nas fases Sub-G0/G1, G0/G1, S e G2/M foi calculado com o software FlowJo® e representado como a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes. A ANOVA e o pós-teste de Tukey compararam os grupos com o controle negativo (DMSO). Diferenças significativas: *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001; ****P < 0,0001



Fonte: dados da pesquisa

O fato interessante é que o ATX-101 é um peptídeo sintético que penetra nas células como o PepGAT, que apresenta o mecanismo exato de ação contra as células cancerosas, como a parada do ciclo celular, a apoptose pela caspase 3/7 e a anexina-V (MÜLLER et al., 2013).

Outra proteína nuclear encontrada exclusivamente em células de controle foi a proteína 121 da membrana do poro nuclear (POM121), que está envolvida no transporte nucleocitoplasmático. No entanto, recentemente, houve uma correlação entre a alta expressão da POM121 e a tumorigênese do CCR, invasão venosa e perineural, linfonodos e metástases distantes, além de taxas de sobrevivência geral ruins (WANG et al., 2020). Foi proposto que a

POM121 está envolvida no reparo e na regulação do DNA em células de CCR. Aqui, a redução dessa proteína pelo tratamento com PepGAT concordou com a interferência do PepGAT no ciclo celular (Fig. 8).

Uma proteína envolvida no ciclo celular exclusivamente de células de controle é o fator de exportação de mRNA RAE1. O fator de exportação de mRNA RAE1 promove a mitose e o crescimento, a progressão, a invasão e a metástase do tumor no CCR (KOBAYASHI et al., 2021). Todos esses resultados sugerem que o PepGAT pode ter um grande potencial para ser avaliado posteriormente como um peptídeo anticâncer contra o CCR. KOBAYASHI et al., também revelaram que as células de CCR nocauteadas para o fator de exportação de mRNA da proteína RAE1 foram levadas à apoptose. Esse efeito é semelhante ao do PepGAT nas células HCT-116, em que o fator de exportação de mRNA da proteína RAE1 diminuiu em abundância após o tratamento com o peptídeo, conforme mostrado aqui. Um estudo anterior relatou que o PepGAT induziu a apoptose via caspase 3/7 em células HCT-116.

5.6 Proteínas envolvidas no metabolismo e na progressão do câncer.

Uma das mudanças mais notáveis nas células e nos tecidos cancerosos é a alteração no metabolismo celular. Essas mudanças metabólicas desempenham um papel fundamental no crescimento e no desenvolvimento do câncer. A isocitrato desidrogenase citoplasmática (IDH1) é uma proteína responsável pelas alterações metabólicas no câncer (GONTHIER et al., 2023; LIU et al., 2023; PIROZZI; YAN, 2021). Em células normais, a IDH1 catalisa a conversão de isocitrato em α -cetoglutarato no ciclo de Krebs na mitocôndria. Em contrapartida, a IDH1 vai além nas células cancerosas e usa o α -cetoglutarato como substrato para produzir d-2-hidroxiglutarato (LIU et al., 2023), um oncometabólito que indica alterações metabólicas clássicas que indica alterações metabólicas clássicas nas células cancerosas (XIANG et al., 2022). A IDH1 sustenta um ciclo de Krebs mitocondrial citoplasmático híbrido nas células cancerosas (GONTHIER et al., 2023).

GONTHIER et al., relataram que a IDH1 apoia a progressão do câncer de próstata, e sua inibição levou à inibição da progressão do câncer. Aqui, a IDH1 está ausente nas células HCT-116 tratadas com PepGAT, sugerindo que o peptídeo poderia afetar essa alteração metabólica para apoiar o metabolismo do câncer. Além disso, foi relatado que a IDH1 tem uma conexão com o fator indutor de hipóxia (HIF-1). O HIF-1 é responsável por perceber os baixos níveis de oxigênio e reprogramar o metabolismo ativando a glicólise e a captação de glicose em

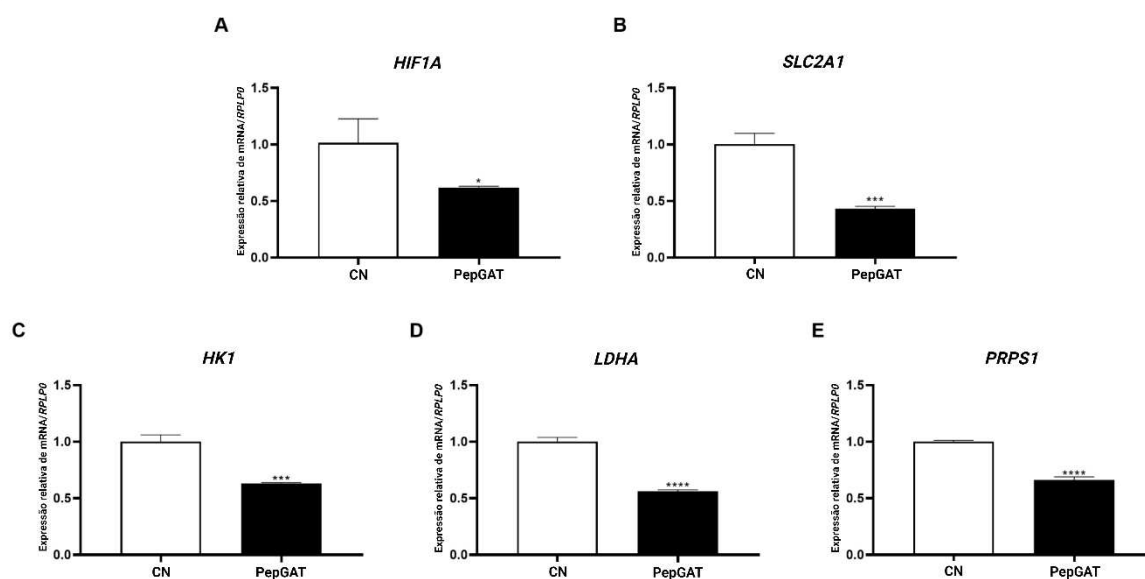
anaerobiose, levando à alta produção de lactato no câncer (GONTHIER et al., 2023; LIU et al., 2023).

No câncer, a IDH1 aumenta os níveis de expressão de HIF-1, o que aumenta a expressão de muitos genes na via do metabolismo da glicose, como o transportador de glicose-1, a hexoquinase e outros genes envolvidos na via glicolítica para promover o crescimento celular, a invasão e a metástase (GONTHIER et al., 2023; LIU et al., 2023; PIROZZI; YAN, 2021; XIANG et al., 2022). Aqui, a análise proteômica mostrou apenas a redução do IDH1 nas células HCT-116 após o tratamento com PepGAT. No entanto, a análise de qPCR revelou que, após o tratamento com PepGAT, houve uma redução significativa na expressão genica de HIF-1 (Fig. 9A), SLC2A1 [GLUT-1] (Fig. 9B), hexoquinase (Fig. 9C) e lactato desidrogenase (Fig. 9D). No total, a análise proteômica e a qPCR indicam fortemente que o PepGAT bloqueia completamente ou interrompe gravemente o metabolismo da glicose no HCT-116.

A Tankyrase 1 é uma proteína multifuncional membro da família da poli (ADP-ribosa) polimerase que medeia a via de transdução de sinal da vida de Wnt/ β -catenina (HAIKARAINEN; KRAUSS; LEHTIÖ, 2014; LI et al., 2019; VERMA et al., 2021; WANG et al., 2021) que foi encontrada exclusivamente no HCT-116 do controle. A tankyrase controla muitas vias oncogênicas e desregula a homeostase metabólica, promovendo a tumorigênese, por isso ganhou muita atenção nos estudos sobre câncer (HAIKARAINEN; KRAUSS; LEHTIÖ, 2014; LI et al., 2019; VERMA et al., 2021; WANG et al., 2021).

A tankyrase controla eventos críticos para a tumorigênese, como a via Wnt/ β -catenina, a via de sinalização Hippo (HPO), a sustentação dos telômeros, a divisão celular e a captação de glicose (BHARDWAJ et al., 2017; HAIKARAINEN; KRAUSS; LEHTIÖ, 2014; IVANCICH et al., 2017; LI et al., 2019; SEIMIYA et al., 2005; VERMA et al., 2021; WANG et al., 2021). DREGALLA et al., relataram que a depleção da tankyrase 1 por silenciamento do RNA resultou em descolamento do telômero, instabilidade, danos ao DNA e morte de células cancerígenas. Além disso, a depleção da tankyrase 1 aumenta a sensibilidade das células cancerosas à radiação (DREGALLA et al., 2010). Com base na literatura, a diminuição da abundância de tankyrase por PepGAT resultou em vários danos as células HCT-116.

Figura 9 - O PepGAT altera os níveis de expressão dos genes relacionados ao metabolismo das células HCT-116. O PepGAT reduz a expressão dos níveis de mRNA de (A) fator indutor de hipóxia [*HIF1*], (B) GLUT 1 [*SLC2A1*], (C) hexoquinase [*HK1*], (D) lactato desidrogenase [*LDH*] e (E) fosforibosil pirofosfato sintetase [*PRPS1*] analisados por qPCR. Os níveis de *RPLP0* normalizaram a expressão gênica, e o grupo CN foi usado como calibrador do experimento. Os dados são apresentados como a média $\pm$ desvio padrão de três réplicas biológicas. As células de controle foram comparadas às células tratadas por 24 horas com PepGAT com ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; e **** $P < 0,0001$. CN: controle negativo.



Fonte: dados da pesquisa

5.7 Proteínas envolvidas na resistência do câncer a medicamentos

Um evento natural é o desenvolvimento de resistência pelas células cancerígenas. A resistência não é apenas à quimioterapia, mas também à radioterapia e à imunoterapia por meio de muitos mecanismos complexos e diferentes (DAVODABADI et al., 2023; MARINE; DAWSON; DAWSON, 2020; VASAN; BASELGA; HYMAN, 2019). A pressão seletiva leva as células cancerosas a reprogramar suas características transcricionais para aumentar ou diminuir a abundância de uma proteína envolvida na resistência, até mesmo um alvo de medicamento, reduzindo a sensibilidade aos medicamentos (DAVODABADI et al., 2023; MARINE; DAWSON; DAWSON, 2020). Às vezes, uma proteína pode ser decisiva para resistência ou suscetibilidade do câncer a um medicamento (YOO et al., 2024).

Nossa análise proteômica identificou cinco proteínas exclusivamente de células de controle que estão envolvidas na resistência ao câncer: proteína 17 contendo domínio de tiorredoxina (TXNDC17), Calponin-3 (CNN-3), proteína D2 contendo domínio EF-hand

(EFHD2), Peptidyl-prolyl cis trans isomerase FKBP4 e Discoidin, citocromo c oxidase 5B (COX5B), proteína contendo domínio CUB e LCCL (DCBLD2) (FAN et al., 2020; NAIR VA et al., 2019; XIE et al., 2021; ZHANG et al., 2015; ZHU et al., 2022). Dessas, quatro proteínas, CNN-3, FKBP4, DCBLD2 e COX5B, foram particularmente interessantes porque estão associadas à resistência do CCR ao 5-FU (NAIR VA et al., 2019; XIE et al., 2021; ZHU et al., 2022). A expressão de CNN-3 no CCR está associada ao fenótipo metastático, à invasão e a uma diminuição na sobrevida geral dos pacientes (NAIR VA et al., 2019). O CCR SW620 silenciado por CNN-3 apresentou menor invasão de colágeno, perda de marcadores mesenquimais e alta suscetibilidade a toxicidade do 5-FU (NAIR VA et al., 2019).

A FKBP4 foi relacionada à manutenção da alta respiração mitocondrial nas células do CCR. A perda de FKBP4 reduz a estabilidade e a respiração mitocondrial e aumenta a sensibilidade ao 5-FU (ZHU et al., 2022). No entanto, a maior expressão de FKBP4 levou ao aumento da respiração mitocondrial e, portanto, maior resistência ao 5-FU (ZHU et al., 2022). A proteína DCBLD2 tem sido associada à agressividade, angiogênese e proliferação do CCR. As células HCT-116 suprimidas por DCBLD2 apresentaram migração e invasão reduzidas e alta sensibilidade ao 5-FU. Modelos de xenoinxerto com células HCT-116 suprimidas por DCBLD2 revelaram redução do volume, comprimento, largura e peso do tumor (XIE et al., 2021).

Além disso, CHU et al., descobriram que níveis elevados de COX5B estão associados a resultados clínicos piores. Os autores também revelaram que níveis mais altos de COX5B estão associados a altas taxas de consumo oxidativo em tecidos pré-cancerosos e em CCR, que já estão estabelecidos, e resistência a 5-FU e oxaliplatina. A atenuação da expressão da COX5B torna as células mais sensíveis ao 5-FU, enquanto a expressão mais alta da COX5B torna as células mais resistentes ao 5-FU (CHU et al., 2022). Parece que, ao afetar negativamente o acúmulo de COX5B nas células HCT-116, o PepGAT afeta o metabolismo das células HCT-116 e pode torná-las mais suscetíveis aos efeitos do 5-FU.

Esses resultados reforçam a importância dessas proteínas para as células do CCR. Ao reduzir essas proteínas, o PepGAT pode inibir todos os processos que levam à resistência do HCT-116 ao 5-FU. Portanto, com o baixo acúmulo de várias proteínas envolvidas na resistência do CCR, surge uma pergunta: o PepGAT poderia aumentar a suscetibilidade das células CCR HCT-116 ao 5-FU? A resposta curta é sim, mas a longa precisa de uma explicação.

O PepGAT é um peptídeo sintético multiativo desenvolvido a partir de uma proteína vegetal chamada quitinase. O PepGAT é um peptídeo de penetração celular e formação de poros ativo contra fungos, bactérias e vírus (BEZERRA et al., 2022; SOUZA et al., 2020, 2022). O PepGAT também apresentou atividade sinérgica com a nistatina contra o biofilme de *C. albicans* e *C. krusei*, aumentando a sensibilidade do biofilme à nistatina (BEZERRA et al., 2022). Com base na ação combinada do PepGAT com outros medicamentos e nos dados proteômicos que mostram a redução das proteínas envolvidas na resistência ao 5-FU. Foi o CI50 de 5-FU contra células HCT-116 na presença e ausência de PepGAT (Fig. 10A).

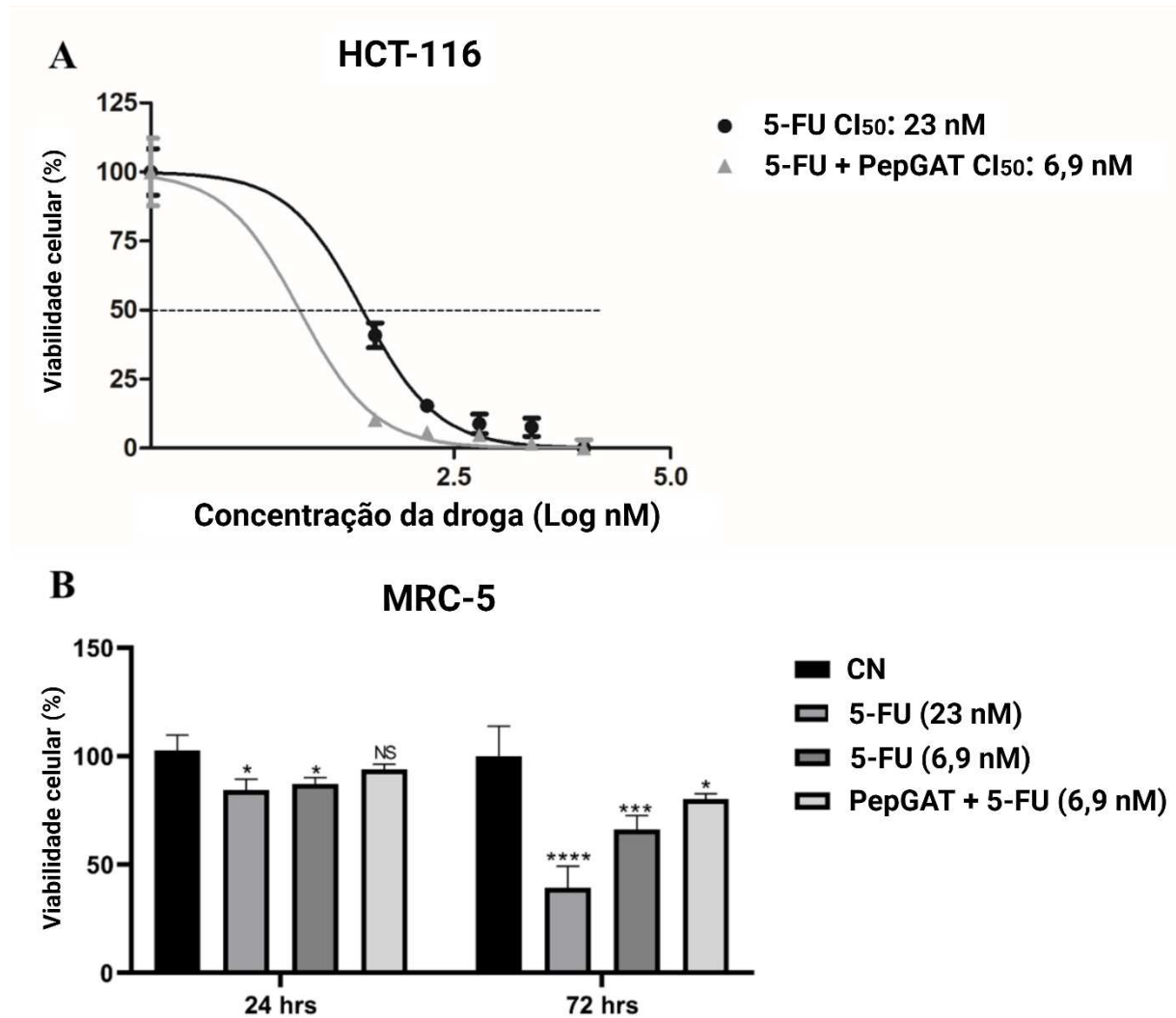
Sozinho, a CI50 do 5-FU contra o HCT-116 foi de 23 nM; entretanto, na presença de PepGAT, uma redução de 3,32 vezes a concentração de 5-FU, sugerindo que o PepGAT tornou a célula HCT-116 mais sensível ao 5-FU (Fig. 10A). O PepGAT pode apresentar esse efeito combinado com O 5-FU de duas maneiras: 1) aumento da permeabilidade da membrana, pois o PepGAT induziu a formação de poros nas células HCT-116 (MESQUITA et al., 2024) ou 2) reduzindo as proteínas envolvidas na resistência ao 5-FU. Curiosamente, na avaliação dos mecanismos de ação, a combinação de PepGAT + 5-FU 6,9 nM melhorou a ação em comparação com 5-FU 6,9 isoladamente, mas não em comparação com PepGAT isoladamente (Figs. 4, 7 e 8), exceto pelo número de células apoptóticas analisadas por citometria de fluxo, quando o número de células apoptóticas foi maior na combinação do que em ambas isoladamente (Fig. 4B).

Esperava-se que aumentasse os mecanismos canônicos do 5-FU que inibia a timidilato sintase, mas isso não foi alcançado. Nossa hipótese é que, quando cominado com PepGAT, o 5-FU pode ter outro mecanismo de ação. Foi proposto que o 5-FU inibe o metabolismo do RNA por moléculas de RNA mal incorporadas em células cancerígenas, como CCR, mama e pâncreas (FLEMING et al., 2015; THERIZOLS et al., 2022; ZHANG et al., 2008). THERIZOLS et al., relataram que o 5-FU é incorporado incorretamente no RNA ribossômico (rRNA) em HCT-116, inibindo a síntese de proteínas em baixas concentrações. Nas células cancerosas, a inibição da síntese proteica leva as células a apoptose, induzindo assim a apoptose (GSOTTBERGER et al., 2023). Isso provavelmente acontece nas células HCT-116 tratadas com PepGAT + 5-FU 6,9 nM, uma vez que a combinação de PepGAT e 5-FU 6,9 nM levou a mais células apoptóticas (Fig. 4B).

O resultado interessante foi que o PepGAT reduziu a toxicidade do 5-FU. Mesmo na concentração mais baixa de 6,9 nM sozinho, o 5-FU foi reduzido em 10% e 40%, respectivamente, as 24 e 72 horas (Fig. 10B). Às 72 horas, a combinação de PepGAT + 5-FU

6,9 nM levou a um número maior de células viáveis em comparação com 6,9 e 23 nM isoladamente (Fig. 10B).

Figura 10 – Ação combinada entre PepGAT e 5-FU. (A) O PepGAT reduz a CI50 do 5-FU contra células HCT-116. (B) O PepGAT também reduz a toxicidade do 5-FU em células não cancerosas.



Fonte: dados da pesquisa

5.8 Proteínas exclusivas do HCT-116 tratado com PepGAT revelaram um acúmulo maior de proteínas supressoras de câncer.

A análise do diagrama de Venn revelou que 94 proteínas foram identificadas exclusivamente nas células após o tratamento com PepGAT (Fig. 5A), o que significa que essas proteínas não foram encontradas no grupo de controle. O aumento dessas proteínas só ocorreu após o tratamento com PepGAT. Das 94, 9 proteínas foram classificadas como supressoras de tumor: Omega-amidase NIT1 (NIT1), proteína de ligação Myb 1A (MYB1A), proteína efetora Cdc42 4 (CDC42), trocador de sódio/cálcio 3 (SCE3), proteína NDRG1 (NDRG1), núcleo de

histona macro-H2A.1 (macro-H2A.1), cistatina-B (CYS-B), proteína contendo domínio de endonuclease 1 (EDC1) e proteína do complexo de poros nucleares Nup98-Nup96 (Nup98-Nup96).

As proteínas NIT1 (KRASNIKOV et al., 2009; LIN et al., 2018), NDRG1 (JOSHI; LAKHANI; MCCART REED, 2022) e macro-H2A (HSU et al., 2021) já foram descritas como supressoras de tumor no CCR. LIN et al., relataram que a regulação negativa do gene da NIT1 no CCR está associada a um diagnóstico ruim, altas taxas de invasão e metástase. O NIT1 bloqueia o ciclo celular e inibe a progressão do CCR in vitro em células HCT-116 (LIN et al., 2018). O NDRG1 (Gene-1 regulado negativamente por N-myc) é outra proteína que suprime a metástase em muitos cânceres, e sua regulação negativa está associada a um prognóstico ruim (JOSHI; LAKHANI; MCCART REED, 2022). (BELZEN N et al., 1997) foram os primeiros a relatar que o NDRG1 é regulado para cima e para baixo nas células epiteliais e de câncer de cólon, respectivamente. GUAN et al., revelaram o efeito supressor de metástase do NDRG1 na linha de células SW620. A superexpressão de NDRG1 inibe a invasão in vitro e a metástase hepática in vivo em camundongos nus (GUAN et al., 2000).

CHEN et al., revelaram que um dos mecanismos pelos quais o NDRG1 inibe a progressão do câncer é a inibição da transição epitélio-mesenquimal em células epiteliais do cólon. É muito provável que essa seja a razão pela qual o NDRG1 deve ter sua regulação reduzida nas células que passam para o fenótipo do câncer. A macro-H2A.1 é uma proteína da família da histona envolvida na regulação epigenética das células (HSU et al., 2021). Níveis depletonizados de macro-H2A.1 levam a fenótipos mais agressivos, alta metástase e taxas de sobrevivência mais baixas em pacientes com CCR (SPORN; JUNG, 2012). Esses resultados sugerem que, de alguma forma, o PepGAT aumenta os níveis de proteínas que estão funcionando com supressores do CCR.

5.9 A análise proteômica revelou proteínas compartilhadas em células HCT-116 tratadas com PepGAT e controle.

As proteínas sobrepostas (Fig. 5A) são aquelas identificadas em ambos os grupos. As proteínas sobrepostas foram submetidas a análise de *fold-change* para avaliar aquelas que foram mais abundantes, diminuíram na sua abundância ou que não se alteraram. Após a análise de *fold-change* (BRANCO et al., 2022), as proteínas com *fold-change* $\geq 1,5$ ($p < 0,05$) aumentaram a sua abundância (proteínas com maior abundância, pontos vermelhos da Fig. 5B) após o tratamento com PepGAT. Proteínas com *fold-change* $\leq 0,5$ ($p < 0,05$) diminuem a

abundância (abundância diminuída, pontos azuis da Fig. 5B) após o tratamento com PepGAT. As proteínas com um *fold-change* entre 0,5 e 1,5 ($p < 0,05$) (Fig. 5B pontos pretos) não alteram sua regulação após o tratamento com PepGAT.

Como esperado, as proteínas envolvidas no reparo do DNA e no ciclo celular encontradas em ambos os grupos foram abundantes após o tratamento com PepGAT. Um exemplo de que o câncer provavelmente está tentando combater a ação de PepGAT e o aumento de 3,0 vezes na abundância de Citocromo c oxidase subunidade 5A (COX5A), que é uma proteína clássica envolvida na manutenção dos níveis de EROs em células cancerígenas (SRINIVASAN; AVADHANI, 2012). O aumento da COX5A pode responder aos níveis mais altos anteriores de EROs induzidos pelo PepGAT (Fig. 3A).

Em contrapartida, um resultado inesperado foi a identificação de proteínas supressoras de câncer em ambos os grupos, cuja abundância aumentou com o PepGAT, superando os esforços das células cancerosas para reduzir sua abundância. As proteínas são a proteína 1 de ligação à fosfatidiletanolamina (PEBP-1), a proteína 3 da membrana associada ao transportador secretório (SCAMP3) e a enzima conjugadora de ubiquitina E2 (E2UCE) (independente de E3). Com valores de *fold-change*, respectivamente, de 1,64, 1,90 e 38,2 ($p < 0,05$). A PEBP-1, conhecida como proteína inibidora da quinase Raf (RKIP), tem sido considerada um supressor de câncer em muitos tipos de câncer (WANG et al., 2010). A SCAMP3 tem sido relacionada como supressora de tumor em alguns tipos de câncer, como o adenocarcinoma de pulmão (VENUGOPALAN et al., 2021). PEBP-1 e SCAMP3 são regulados negativamente no tecido do câncer em comparação com o tecido saudável. Eles exibem sua atividade supressora de câncer, a regulação negativa da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) (VENUGOPALAN et al., 2021; WANG et al., 2010).

A proteína E2UCE foi uma surpresa, primeiro pelo valor de *fold-change* de 38 vezes maior após o contato com PepGAT e, segundo, pelo papel da ubiquitinação nas células. A ubiquitinação regula o metabolismo das proteínas, e sua desregulação leva a várias doenças, inclusive o câncer (MANSOUR, 2018). O papel da ubiquitinação no câncer é controverso e, em alguns casos, promove o câncer e, em outros, o suprime (MANSOUR, 2018). No entanto, os efeitos de supressão das proteínas envolvidas na ubiquitinação já foram relatados no CCR. A FBXW E3 ligase é regulada negativamente nas células do CCR em comparação com o tecido saudável. Além disso, seu *knockdown* promove o crescimento, a invasão e a metástase do CCR in vivo. A ação supressora de câncer das proteínas de ligação à ubiquitina baseia-se na redução do acúmulo de oncoproteínas pela ubiquitinação dessas proteínas, levando-as à proteólise pelo

proteassoma (MANSOUR, 2018). Aqui, de alguma forma, o PepGAT induziu uma maior abundância de E2UCE, que poderia estar agindo para evitar o acúmulo de oncoproteínas no CCR e a progressão do câncer.

O tratamento com PepGAT levou a uma diminuição na abundância de cinco proteínas envolvidas na via glicolítica, como fosfopentomutase, enolase, isomerase de triosefosfato, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, fosfoglicerato quinase, cetrato sintase, aconitase e malato desidrogenase, respectivamente, com um valor de *fold-change* de -2,07, -3,44, 1,59, -1,51 e -1,70 ($p < 0,05$). As células cancerosas preferem produzir energia oxidando a glicose à lactase, mesmo na presença de oxigênio (BOSE; ZHANG; LEE, 2019). A redução dessas proteínas e a redução da expressão de hexoquinase e LDHA (Fig. 9C e D) sugerem fortemente que o PepGAT interrompe o metabolismo da glicose nas células do CCR, prejudicando a produção de energia e impedindo a progressão e o desenvolvimento do tumor.

A glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), a ribose-5 fosfato isomerase (RIP5) e a transaldolase são proteínas envolvidas na via das pentoses-fosfato (PPP) que diminuíram em sua abundância, com um valor de *fold-change* de -2,67 e -1,67 ($p < 0,05$) nas células HCT-116 após o tratamento com PepGAT. A análise de qPCR mostrou uma redução na expressão do gene da fosforibosil pirofosfato sintetase, também envolvida na PPP (*PRPS1*, Fig. 9E). A PPP é uma etapa não oxidativa e oxidada do metabolismo da glicose essencial para a síntese de nucleotídeos (GHANEM et al., 2021). Ao desativar a PPP, o PepGAT pode interferir na biossíntese de nucleotídeos inibindo a produção de D-ribulose 5-fosfato e D-ribose 5-fosfato, essenciais para o metabolismo de ácidos nucleicos (DREGALLA et al., 2010). DE PRETER et al., demonstraram que a redução da PPP diminui a proliferação de células cancerosas, induz o estresse oxidativo e afeta o fenômeno de Warburg (DE PRETER et al., 2015).

Apesar da função canônica na PPP, recentemente foi relatado que a RIP5 interage com a β -catenina para promover o câncer colorretal (CHOU et al., 2018). Uma comparação de dados de mRNA de 80 pacientes com CCR com tecido não tumoral revelou um aumento da expressão do mRNA da RIP5 em diferentes estágios do CCR, que é ainda maior em pacientes com metástase (CHOU et al., 2018). A maior expressão de RIP5 estimula a expressão de gene da β -catenina e a estabilização da proteína, promovendo a proliferação de células do cólon e a tumorigênese (CHOU et al., 2018). Essa função não convencional da RIOP5 no HCT-116 revelou um possível papel central na progressão do CCR. Ao reduzir a abundância de RIP5, o PepGAT pode interferir na replicação do DNA do HCT-116 porque não pode produzir as

pentoses envolvidas no DNA e no RNA, inibindo a replicação celular, o crescimento e a progressão do tumor.

A análise proteômica também revelou que o PepGAT altera a abundância dinâmica de proteínas envolvidas no citoesqueleto das células HCT-116. O citoesqueleto é essencial para que o câncer sustente a reorganização de sua arquitetura, levando a deformações celulares que aumentam a capacidade de migração e invasão das células cancerosas (RODAT-DESPOIX; CHAMLALI; OUADID-AHIDOUCH, 2021). Aqui, após o contato com PepGAT, várias proteínas do citoesqueleto, como cortactina de substrato Src, miotrofina, proteína 6A semelhante à actina, homólogo 1 associado a microtúbulos de Júpiter e subunidade beta da proteína de capeamento de F-actina, diminuíram em abundância com valores de *fold-change* de -3,50, -2,53, -2,35, -1,87 e -1,42 ($p < 0,05$). A redução no acúmulo dessas proteínas pode afetar a função do citoesqueleto do HCT-116. Os dados proteômicos estão de acordo com a capacidade do PepGAT de inibir a invasão do HCT-116 (Fig. 7).

Um estudo publicado recentemente mostrou uma redução na expressão do gene *BCL3* por qPCR após o tratamento com PepGAT (MESQUITA et al., 2024). Aqui, a análise proteômica corroborou esse resultado ao revelar uma diminuição na abundância da proteína BCL2 com um valor de *fold-change* de -1,79 ($p < 0,05$). A BCL2 é uma proteína antiapoptótica que impede que o câncer entre em eventos apoptóticos. A redução dos transcritos e o acúmulo de proteína pelo PepGAT levam as células HCT-116 à apoptose, conforme revelado pelo ensaio de citometria fluxo (Fig. 4).

Uma das características mais importantes que as células cancerosas desenvolvem é a capacidade de escapar do sistema imunológico. Para isso, as células cancerígenas apresentam uma proteína na superfície da célula, tornando-a invisível para as células do sistema imunológico. Em outros casos, uma proteína na superfície da célula cancerosa inibe a migração da célula imunológica para o local onde o câncer está se desenvolvendo (RODAT-DESPOIX; CHAMLALI; OUADID-AHIDOUCH, 2021). Aqui, o tratamento com PepGAT reduziu o acúmulo do fator inibidor da migração de macrófagos (MIF) e da galectina-1 com valores de *fold-change* de -1,56 e -1,61 ($p < 0,05$).

O MIF é altamente abundante em muitos tipos de câncer e está associado a agressividade do câncer e a resultados ruins (BALOGH; TEMPLETON; CROSS, 2018). BALOGH et al., demonstraram que camundongos inoculados com células cancerígenas nocauteadas para MIF apresentaram níveis aumentados de células T CD4⁺ e CD8⁺ produtoras

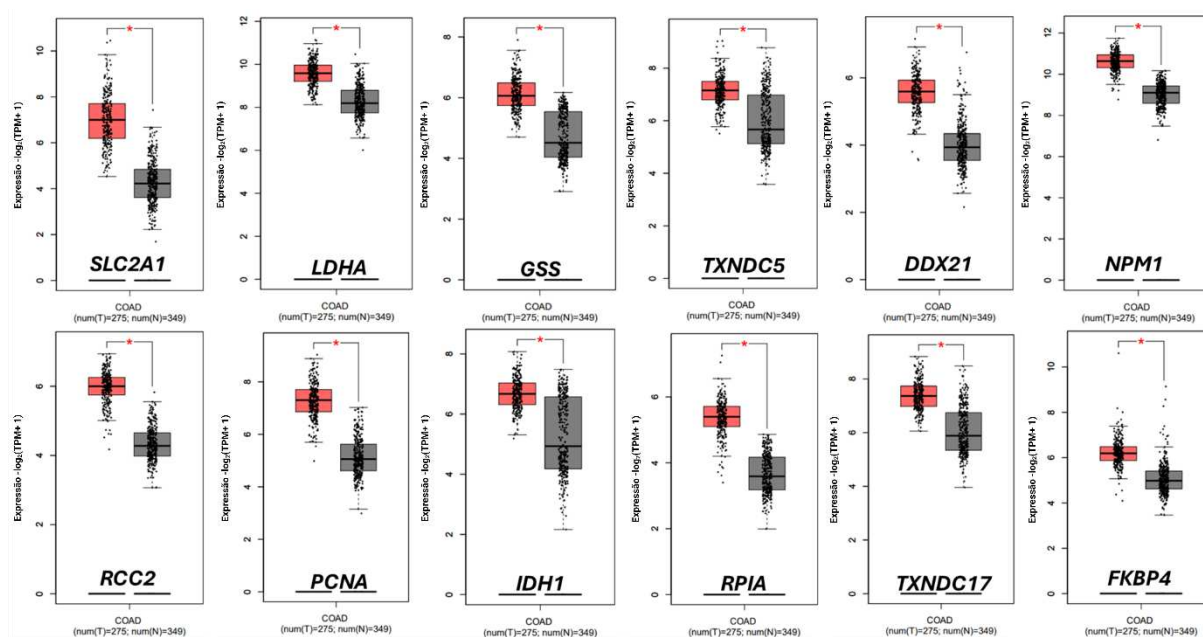
de IFN γ intratumorais, seguidos por um número reduzido de células cancerígenas. Esse resultado sugere que o sistema imunológico pode combater eficazmente os tumores (BALOGH; TEMPLETON; CROSS, 2018). A galectina-1 é uma proteína supressora do sistema imunológico secretada por muitos tipos de câncer. Ela interage com receptores de células imunológicas, suprimindo a função das células imunológicas no microambiente tumoral e permitindo a evasão das células cancerígena (HUANG et al., 2021). A redução dessas proteínas pelo PepGAT atenua a capacidade das células cancerosas de escapar do sistema imunológico, tornando as células cancerosas suscetíveis a resposta do sistema imunológico.

A análise proteômica revelou que o PepGAT altera o funcionamento correto das células HCT-116 de várias maneiras. Dois modelos foram produzidos para fornecer uma visão geral de como o PepGAT afeta as proteínas e o processo das células HTC-116 (Figuras suplementares 1 e 2). O primeiro modelo é mostrado com base nas proteínas com abundância reduzida no processo, como expressão genica, estrutura cromossômica, telômeros, replicação de DNA, acúmulo excessivo de EROs e danos a lipídios e proteínas (Figura suplementar 1). O segundo modelo mostrou que o PepGAT afeta a abundância de proteínas envolvidas no metabolismo energético e pode desativar vias como a glicólise, vias de pentose fosfato, ciclo de Krebs e cadeia de transporte de elétrons (Figura suplementar 2).

5.10 A análise bioinformática revelou uma correlação entre os dados proteômicos e os dados do TCGA

Nossa análise proteômica revelou mudanças em muitas proteínas essenciais para o estabelecimento, crescimento e progressão do HCT-116. Com base nisso, nosso objetivo foi avaliar o comportamento dos genes dessas proteínas em dados de pacientes com CCR do banco de dados TCGA (Fig. 11). Ao pesquisar o banco de dados TCGA que continha dados de pacientes com CCR. A análise mostrou que 12 proteínas com abundância reduzida por PepGAT em células HCT-116 também são maiores em amostras de pacientes com CCR (Fig. 11) Esses resultados corroboram que as proteínas afetadas pela PepGAT são necessárias para o estabelecimento do CCR em pacientes. A redução do acúmulo dessas proteínas pode ser uma boa alternativa da molécula para avançar em experimentos para avaliar seu potencial contra o CCR.

Figura 11 - Dados do TCGA mostrando o gene regulado positivamente em amostras de CRC de pacientes em comparação com tecidos não cancerosos.



Fonte: dados da pesquisa

6 CONCLUSÃO

Nossos resultados forneceram novas percepções sobre os mecanismos de ação do PepGAT contra as células HCT-116 com grande potencial contra o CCR. O PepGAT afeta muitas vias críticas para o desenvolvimento do câncer, e o estabelecimento dificulta a resistência do CCR. Primeiro, PepGAT induziu o acúmulo precoce de EROs dependente da diminuição de proteínas antioxidante que protegem as células do CCR: GS, THTR, GLRX e TRX5. Também, PepGAT influenciou no metabolismo e no ciclo celular mediante a diminuição da abundância de DDX21 e DDX46, proteínas chaves para a proliferação celular, crescimento e agressividade do câncer. Além disso, o PepGAT aumenta os efeitos do 5-FU contra o HCT-116 e reduz sua toxicidade para as células saudáveis, pois foi evidenciado várias proteínas envolvidas na resistência do câncer ao 5-FU: CNN-3, FKBP4, DCBLD2 e COX5B; e precisamente PepGAT reduziu a sua abundancia nas células HCT-116. Em conjunto, os resultados endossaram o potencial do PepGAT para avançar nos estudos como uma molécula anticâncer para desenvolver possíveis novos medicamentos contra CCR.

7 REFERÊNCIAS

AGGARWAL, V.; TULI, H. S.; VAROL, A.; THAKRAL, F.; YERER, M. B.; SAK, K.; VAROL, M.; JAIN, A.; KHAN, M. A.; SETHI, G. **Role of reactive oxygen species in cancer progression: Molecular mechanisms and recent advancements.** *Biomolecules* MDPI AG, , 1 nov. 2019.

- AGHAMIRI, S.; ZANDSALIMI, F.; RAEE, P.; ABDOLLAHIFAR, M. A.; TAN, S. C.; LOW, T. Y.; NAJAFI, S.; ASHRAFIZADEH, M.; ZARRABI, A.; GHANBARIAN, H.; BANDEHPOUR, M. **Antimicrobial peptides as potential therapeutics for breast cancer. Pharmacological Research** Academic Press, , 1 set. 2021.
- AGRONOVICH, A.; BERTHELET, E. Radiotherapy for colorectal cancer. **BC Medical Journal**, v. 42, 3 abr. 2000.
- AGUIAR, T. K. B.; NETO, N. A. S.; SILVA, R. R. S.; FREITAS, C. D. T.; MESQUITA, F. P.; ALENCAR, L. M. R.; SANTOS-OLIVEIRA, R.; GOLDMAN, G. H.; SOUZA, P. F. N. Behind the Curtain: In Silico and In Vitro Experiments Brought to Light New Insights into the Anticryptococcal Action of Synthetic Peptides. **Antibiotics**, v. 12, n. 1, 1 jan. 2023.
- AGUILAR-ROJAS, A.; HUERTA-REYES, M.; MAYA-NÚÑEZ, G.; ARECHAVELETA-VELÁSICO, F.; CONN, P. M.; ULLOA-AGUIRRE, A.; VALDÉS, J. Gonadotropin-releasing hormone receptor activates GTPase RhoA and inhibits cell invasion in the breast cancer cell line MDA-MB-231. **BMC Cancer**, v. 12, 23 nov. 2012.
- AKBARIAN, M.; KHANI, A.; EGHBALPOUR, S.; UVERSKY, V. N. **Bioactive Peptides: Synthesis, Sources, Applications, and Proposed Mechanisms of Action. International Journal of Molecular Sciences** MDPI, , 1 fev. 2022.
- AKKAD, J.; BOCHUM, S.; MARTENS, U. M. **Personalized treatment for colorectal cancer: novel developments and putative therapeutic strategies. Langenbeck's Archives of Surgery** Springer Verlag, , 1 fev. 2015.
- AMHRICAN, T.; CLASTHOINTTMOKXI[^], J. L.; TSAI, Y.; LU, D. K. Small Colorectal Polyps: Histopathology and Clinical Significance. **THE AMERICAN JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY**, v. 90, p. 988–993, 14 mar. 1994.
- AN, X.; YU, W.; LIU, J.; TANG, D.; YANG, L.; CHEN, X. **Oxidative cell death in cancer: mechanisms and therapeutic opportunities. Cell Death and Disease** Springer Nature, , 1 ago. 2024.
- ANDRÉ, T.; BONI, C.; MOUNEDJI-BOUDIAF, L.; NAVARRO, M.; TABERNERO, J.; HICKISH, T.; TOPHAM, C.; ZANINELLI, M.; CLINGAN, P.; BRIDGEWATER, J.; TABAH-FISCH, I.; et al. **Oxaliplatin, Fluorouracil, and Leucovorin as Adjuvant Treatment for Colon Cancer for the Multicenter International Study of Oxaliplatin/5-Fluorouracil/Leucovorin in the Adjuvant Treatment of Colon Cancer (MOSAIC) Investigators** *sn engl j med*. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <www.nejm.org>.
- BALOGH, K. N.; TEMPLETON, D. J.; CROSS, J. V. Macrophage migration inhibitory factor protects cancer cells from immunogenic cell death and impairs anti-tumor immune responses. **PLoS ONE**, v. 13, n. 6, 1 jun. 2018.
- BANERJEE, A.; PATHAK, S.; SUBRAMANIAM, V. D.; DHARANIVASAN, G.; MURUGESAN, R.; VERMA, R. S. **Strategies for targeted drug delivery in treatment of colon cancer: current trends and future perspectives. Drug Discovery Today** Elsevier Ltd, , 1 ago. 2017.
- BAUKE ALBADA, H.; CHIRIAC, A. I.; WENZEL, M.; PENKOVA, M.; BANDOW, J. E.; SAHL, H. G.; METZLER-NOLTE, N. Modulating the activity of short arginine-tryptophan containing antibacterial peptides with N-terminal metalocenoyl groups. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, v. 8, p. 1753–1764, 15 out. 2012.
- BELZEN N, VAN; WN, D.; MP, D.; NA, G.; MADE AC, VAN DER; Y, N.; R, V.; J, T.; FT, B. A novel gene which is up-regulated during colon epithelial cell differentiation and down-regulated in colorectal neoplasms. **Journal of Technical Methods and Pathology**, v. 1, n. Europe PMC, p. 85–92, 1 jul. 1997.

- BEZERRA, L. P.; SILVA, A. F. B.; SANTOS-OLIVEIRA, R.; ALENCAR, L. M. R.; AMARAL, J. L.; NETO, N. A. S.; SILVA, R. G. G.; BELÉM, M. O.; DE ANDRADE, C. R.; OLIVEIRA, J. T. A.; FREITAS, C. D. T.; et al. Combined antibiofilm activity of synthetic peptides and antifungal drugs against *Candida* spp. **Future Microbiology**, v. 17, n. 14, p. 1133–1146, 1 set. 2022.
- BEZIAT, G.; TAVITIAN, S.; BERTOLI, S.; HUGUET, F.; LARGEAUD, L.; LUQUET, I.; VERGEZ, F.; RIEU, J. B.; BORIES, P.; DELABESSE, E.; RÉCHER, C. Dactinomycin in acute myeloid leukemia with NPM1 mutations. **European Journal of Haematology**, v. 105, n. 3, p. 302–307, 1 set. 2020.
- BHARDWAJ, A.; YANG, Y.; UEBERHEIDE, B.; SMITH, S. Whole proteome analysis of human tankyrase knockout cells reveals targets of tankyrase-mediated degradation. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, 1 dez. 2017.
- BLONDY, S.; DAVID, V.; VERDIER, M.; MATHONNET, M.; PERRAUD, A.; CHRISTOU, N. **5-Fluorouracil resistance mechanisms in colorectal cancer: From classical pathways to promising processes.** **Cancer Science** Blackwell Publishing Ltd, , 1 set. 2020.
- BOSE, S.; ZHANG, C.; LEE, A. Glucose Metabolism in Cancer: The Warburg Effect and Beyond. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, 2019.
- BOTO, A.; DE LA LASTRA, J. M. P.; GONZÁLEZ, C. C. **The road from host-defense peptides to a new generation of antimicrobial drugs.** **Molecules** MDPI AG, , 2018a.
- BOTO, A.; DE LA LASTRA, J. M. P.; GONZÁLEZ, C. C. **The road from host-defense peptides to a new generation of antimicrobial drugs.** **Molecules** MDPI AG, , 2018b.
- BRANCO, L. A. C.; SOUZA, P. F. N.; NETO, N. A. S.; AGUIAR, T. K. B.; SILVA, A. F. B.; CARNEIRO, R. F.; NAGANO, C. S.; MESQUITA, F. P.; LIMA, L. B.; FREITAS, C. D. T. New Insights into the Mechanism of Antibacterial Action of Synthetic Peptide Mo-CBP3-Pepl against *Klebsiella pneumoniae*. **Antibiotics**, v. 11, n. 12, 1 dez. 2022.
- BRAY, F.; LAVERSANNE, M.; SUNG, H.; FERLAY, J.; SIEGEL, R. L.; SOERJOMATARAM, I.; JEMAL, A. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, 4 abr. 2024.
- BRENNER, H.; CHANG-CLAUDE, J.; JANSEN, L.; SEILER, C. M.; HOFFMEISTER, M. Role of Colonoscopy and Polyp Characteristics in Colorectal Cancer After Colonoscopic Polyp Detection A Population-Based Case-Control Study. **Annals of Internal Medicine**, v. 157, p. 225–232, 21 ago. 2012.
- BRZOWA-ZASADA, M.; PIECUCH, A.; BAJDAK-RUSINEK, K.; GOŁĄBEK, K.; MICHALSKI, M.; MATYSIAK, N.; CZUBA, Z. A Prognostic Activity of Glutaredoxin 1 Protein (Grx1) in Colon Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 2, 1 jan. 2024.
- BUTTACAVOLI, M.; ALBANESE, N. N.; ROZ, E.; PUCCI-MINAFRA, I.; FEO, S.; CANCEMI, P. Proteomic profiling of colon cancer tissues: Discovery of new candidate biomarkers. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 9, 1 maio 2020.
- CABRI, W.; CANTELMÍ, P.; CORBISIERO, D.; FANTONI, T.; FERRAZZANO, L.; MARTELLI, G.; MATTELLONE, A.; TOLOMELLI, A. **Therapeutic Peptides Targeting PPI in Clinical Development: Overview, Mechanism of Action and Perspectives.** **Frontiers in Molecular Biosciences** Frontiers Media S.A., , 14 jun. 2021.
- CALDERON-APARICIO, A.; BODE, A. M. **Roles of regulator of chromosome condensation 2 in cancer: Beyond its regulatory function in cell cycle.** **Oncology Reviews** Page Press Publications, , 2021.

CANCER RESEARCH UK. **Types of surgery for colon cancer.**

CAPPELL, M. S. **Pathophysiology, Clinical Presentation, and Management of Colon Cancer. Gastroenterology Clinics of North America**, mar. 2008.

CARDANO, M.; TRIBIOLI, C.; PROSPERI, E. Targeting Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) as an Effective Strategy to Inhibit Tumor Cell Proliferation. **Current Cancer Drug Targets**, v. 20, n. 4, p. 240–252, 17 jan. 2020.

CARVALHO, P. C.; LIMA, D. B.; LEPREVOST, F. V.; SANTOS, M. D. M.; FISCHER, J. S. G.; AQUINO, P. F.; MORESCO, J. J.; YATES, J. R.; BARBOSA, V. C. Integrated analysis of shotgun proteomic data with PatternLab for proteomics 4.0. **Nature Protocols**, v. 11, n. 1, p. 102–117, 3 jan. 2016.

CHAI, K. F.; VOO, A. Y. H.; CHEN, W. N. **Bioactive peptides from food fermentation: A comprehensive review of their sources, bioactivities, applications, and future development. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**Blackwell Publishing Inc., , 1 nov. 2020.

CHAUHAN, S.; DHAWAN, D. K.; SAINI, A.; PREET, S. **Antimicrobial peptides against colorectal cancer-a focused review. Pharmacological Research**Academic Press, , 1 maio 2021.

CHEN, L. N.; CARVAJAL, R. D. Tebentafusp for the treatment of HLA-A*02:01–positive adult patients with unresectable or metastatic uveal melanoma. **Expert Review of Anticancer Therapy**, 2022.

CHEN, Y. L. S.; LI, J. H.; YU, C. Y.; LIN, C. J.; CHIU, P. H.; CHEN, P. W.; LIN, C. C.; CHEN, W. J. Novel cationic antimicrobial peptide GW-H1 induced caspase-dependent apoptosis of hepatocellular carcinoma cell lines. **Peptides**, v. 36, n. 2, p. 257–265, ago. 2012a.

CHEN, Z.; ZHANG, D.; YUE, F.; ZHENG, M.; KOVACEVIC, Z.; RICHARDSON, D. R. The iron chelators Dp44mT and DFO inhibit TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition via up-regulation of N-Myc downstream-regulated gene 1 (NDRG1). **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 21, p. 17016–17028, 18 maio 2012b.

CHINNADURAI, R. K.; KHAN, N.; MEGHWANSHI, G. K.; PONNE, S.; ALTHOBITI, M.; KUMAR, R. **Current research status of anti-cancer peptides: Mechanism of action, production, and clinical applications. Biomedicine and Pharmacotherapy**Elsevier Masson s.r.l., , 1 ago. 2023.

CHOU, Y. T.; JIANG, J. K.; YANG, M. H.; LU, J. W.; LIN, H. K.; WANG, H. D.; YUH, C. H. Identification of a noncanonical function for ribose-5-phosphate isomerase A promotes colorectal cancer formation by stabilizing and activating β -catenin via a novel C-terminal domain. **PLoS Biology**, v. 16, n. 1, 1 jan. 2018.

CHU, Y. DE; LIM, S. N.; YEH, C. T.; LIN, W. R. COX5B-Mediated Bioenergetic Alterations Modulate Cell Growth and Anticancer Drug Susceptibility by Orchestrating Claudin-2 Expression in Colorectal Cancers. **Biomedicine**, v. 10, n. 1, 1 jan. 2022.

CIRIGLIANO, S. M.; DÍAZ BESSONE, M. I.; BERARDI, D. E.; FLUMIAN, C.; BAL DE KIER JOFFÉ, E. D.; PEREA, S. E.; FARINA, H. G.; TODARO, L. B.; URTREGER, A. J. The synthetic peptide CIGB-300 modulates CK2-dependent signaling pathways affecting the survival and chemoresistance of non-small cell lung cancer cell lines. **Cancer Cell International**, v. 17, n. 1, 31 mar. 2017.

CLINTON, S. K.; GIOVANNUCCI, E. L.; HURSTING, S. D. **The World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research Third Expert Report on Diet, Nutrition, Physical Activity, and Cancer: Impact and Future Directions. Journal of Nutrition**Oxford University Press, , 1 abr. 2020.

CONCEIÇÃO P. Desenvolvimento Humano Relatório de 2021/2022. **Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento**, 2022.

COOPER, B. M.; IEGRE, J.; O'DONOVAN, D. H.; ÖLWEGÅRD HALVARSSON, M.; SPRING, D. R. **Peptides as a platform for targeted therapeutics for cancer: Peptide-drug conjugates (PDCs)**. *Chemical Society Reviews* Royal Society of Chemistry, , 7 fev. 2021.

COTTET, V.; JOOSTE, V.; FOURNEL, I.; BOUVIER, A. M.; FAIVRE, J.; BONITHON-KOPP, C. Long-term risk of colorectal cancer after adenoma removal: A population-based cohort study. *Gut*, v. 61, n. 8, p. 1180–1186, ago. 2012.

DAVODABADI, F.; SAJJADI, S. F.; SARHADI, M.; MIRGHASEMI, S.; NADALI HEZAVEH, M.; KHOSRAVI, S.; KAMALI ANDANI, M.; CORDANI, M.; BASIRI, M.; GHAVAMI, S. **Cancer chemotherapy resistance: Mechanisms and recent breakthrough in targeted drug delivery**. *European Journal of Pharmacology* Elsevier B.V., , 5 nov. 2023.

DE ALMEIDA GOMES, I.; DA LIMA, A. B.; DA SILVA BRITO, D. M.; ALMEIDA LIMA, A.; DE OLIVEIRA, F. L.; ESPINO ZELAYA, E. A.; MAGALHÃES REBELLO ALENCAR, L.; CASTELO BRANCO DE SOUZA COLLARES MAIA, D.; AMARAL DE MORAES, M. E.; PANTOJA MESQUITA, F.; NORONHA SOUZA, P. F.; et al. **Recalculating the Route: Repositioning Antimicrobial Peptides for Cancer Treatment**. *Chemistry and Biodiversity* John Wiley and Sons Inc, , 1 fev. 2024.

DE MATTIA, E.; CECCHIN, E.; TOFFOLI, G. Pharmacogenomics of intrinsic and acquired pharmacoresistance in colorectal cancer: Toward targeted personalized therapy. *Drug Resistance Updates*, v. 20, p. 39–70, 11 jun. 2015.

DE PRETER, G.; NEVEU, M.-A.; DANHIER, P.; BRISSON, L.; PAYEN, V. L.; PORPORATO, P. E.; JORDAN, B. F.; SONVEAUX, P.; GALLEZ, B. Inhibition of the pentose phosphate pathway by dichloroacetate unravels a missing link between aerobic glycolysis and cancer cell proliferation. *Oncotarget*, v. 7, n. 3, 2015.

DESHMUKH, R.; PRAJAPATI, M.; HARWANSH, R. K. **A review on emerging targeted therapies for the management of metastatic colorectal cancers**. *Medical Oncology* Springer, , 1 jun. 2023.

DIAS, L. P.; SOUZA, P. F. N.; OLIVEIRA, J. T. A.; VASCONCELOS, I. M.; ARAÚJO, N. M. S.; TILBURG, M. F. V.; GUEDES, M. I. F.; CARNEIRO, R. F.; LOPES, J. L. S.; SOUSA, D. O. B. RcAlb-PepII, a synthetic small peptide bioinspired in the 2S albumin from the seed cake of *Ricinus communis*, is a potent antimicrobial agent against *Klebsiella pneumoniae* and *Candida parapsilosis*. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, v. 1862, n. 2, 1 fev. 2020.

DREGALLA, R. C.; ZHOU, J.; IDATE, R. R.; BATTAGLIA, C. L. R.; LIBER, H. L.; BAILEY, S. M. Regulatory roles of tankyrase 1 at telomeres and in DNA repair: suppression of T-SCE and stabilization of DNA-PKcs. *Impact*, v. 2, n. AGING, p. 691–708, 20 out. 2010.

EISTERER, W.; PRAGER, G. **Chemotherapy, Still an Option in the Twenty-First Century in Metastatic Colorectal Cancer?** *CardioVascular and Interventional Radiology* Springer New York LLC, , 15 set. 2019.

EMRAN, T. BIN; SHAHRIAR, A.; MAHMUD, A. R.; RAHMAN, T.; ABIR, M. H.; SIDDIQUEE, M. F. R.; AHMED, H.; RAHMAN, N.; NAINU, F.; WAHYUDIN, E.; MITRA, S.; et al. **Multidrug Resistance in Cancer: Understanding Molecular Mechanisms, Immunoprevention and Therapeutic Approaches**. *Frontiers in Oncology* Frontiers Media S.A., , 23 jun. 2022.

ERAK, M.; BELLMANN-SICKERT, K.; ELS-HEINDL, S.; BECK-SICKINGER, A. G. Peptide chemistry toolbox – Transforming natural peptides into peptide therapeutics. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 10, p. 2759–2765, 1 jun. 2018.

FAN, C. C.; TSAI, S. T.; LIN, C. Y.; CHANG, L. C.; YANG, J. C.; CHEN, G. Y.; SHER, Y. P.; WANG, S. C.; HSIAO, M.; CHANG, W. C. EFHD2 contributes to non-small cell lung cancer cisplatin resistance by the activation of NOX4-ROS-ABCC1 axis. **Redox Biology**, v. 34, 1 jul. 2020.

FARRIS, A. B.; MISDRAJI, J.; SRIVASTAVA, A.; MUZIKANSKY, A.; DESHPANDE, V.; LAUWERS, G. Y.; MINO-KENDUDSON, M. Sessile Serrated Adenoma Challenging Discrimination From Other Serrated Colonic Polyps. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 32, p. 30–35, jan. 2007.

FEENEY, G.; SEHGAL, R.; SHEEHAN, M.; HOGAN, A.; REGAN, M.; JOYCE, M.; KERIN, M. **Neoadjuvant radiotherapy for rectal cancer management**. **World Journal of Gastroenterology** Baishideng Publishing Group Co, , 7 set. 2019.

FLEMING, G. F.; SCHUMM, P.; FRIBERG, G.; RATAIN, M. J.; NJIAJU, U. O.; SCHILSKY, R. L. Circadian variation in plasma 5-fluorouracil concentrations during a 24 hour constant-rate infusion. **BMC Cancer**, v. 15, n. 1, 12 dez. 2015.

FODDE, R. The APC gene in colorectal cancer. **European Journal of Cancer**, v. 38, 30 jan. 2002.

FRANCIOSA, G.; KVERNELAND, A. H.; JENSEN, A. W. P.; DONIA, M.; OLSEN, J. V. **Proteomics to study cancer immunity and improve treatment**. **Seminars in Immunopathology** Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, , 1 mar. 2023.

FRERIKSEN, J. J. M.; SALOMON, J.; ROELOFS, H. M. J.; TE MORSCHE, R. H. M.; VAN DER STAPPEN, J. W. J.; DURA, P.; WITTEMAN, B. J. M.; LACKO, M.; PETERS, W. H. M. Genetic polymorphism 609C>T in NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 enhances the risk of proximal colon cancer. **Journal of Human Genetics**, v. 59, n. 7, p. 381–386, 2014.

GAUTAM, A.; CHAUDHARY, K.; KUMAR, R.; RAGHAVA, G. P. S. Computer-aided virtual screening and designing of cell-penetrating peptides. Em: **Cell-Penetrating Peptides: Methods and Protocols**. [s.l.] Springer New York, 2015. p. 59–69.

GAWDE, U.; CHAKRABORTY, S.; WAGHU, F. H.; BARAI, R. S.; KHANDERKAR, A.; INDRAGURU, R.; SHIRSAT, T.; IDICULA-THOMAS, S. CAMPR4: a database of natural and synthetic antimicrobial peptides. **Nucleic Acids Research**, v. 51, n. 1 D, p. D377–D383, 6 jan. 2023.

GERA, M.; PATIL, A. S.; BHOSALE, V. **Proliferating Cell Nuclear Antigen: A Novel Growth and Therapeutic Biomarker**. **Clinical and Translational Metabolism** Springer, , 1 dez. 2024.

GHANEM, N.; EL-BABA, C.; ARAJI, K.; EL-KHOURY, R.; USTA, J.; DARWICHE, N. **The Pentose Phosphate Pathway in Cancer: Regulation and Therapeutic Opportunities**. **Chemotherapy** S. Karger AG, , 1 dez. 2021.

GILES, R. H.; VAN ES, J. H.; CLEVERS, H. **Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer**. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer** Elsevier, , 5 jun. 2003.

GLOBOCAN. **CANCER TODAY**. Disponível em:

<https://gco.iarc.fr/today/en/dataviz/pie?mode=population&key=total&group_populations=0>.

Acesso em: 21 maio. 2024.

GONG, S.; WU, H.; WU, C.; DUAN, Y.; ZHANG, B.; WU, P.; TANG, J.; FU, J. A human pan-cancer system analysis of regulator of chromatin condensation 2. **Heliyon**, v. 9, n. 2, 1 fev. 2023.

GONTHIER, K.; WEIDMANN, C.; BERTHIAUME, L.; JOBIN, C.; LACOUTURE, A.; LAFRONT, C.; HARVEY, M.; NEVEU, B.; LOEHR, J.; BERGERON, A.; FRADET, Y.; et al. Isocitrate dehydrogenase 1 sustains a hybrid cytoplasmic–mitochondrial tricarboxylic acid cycle that can be targeted for therapeutic purposes in prostate cancer. **Molecular Oncology**, v. 17, n. 10, p. 2109–2125, 1 out. 2023.

GRIECO, P.; GOMEZ-MONTERREY, I. **Natural and synthetic peptides in the cardiovascular diseases: An update on diagnostic and therapeutic potentials**. **Archives of Biochemistry and Biophysics** Academic Press Inc., , 15 fev. 2019.

GRISENDI, S.; MECUCCI, C.; FALINI, B.; PANDOLFI, P. P. **Nucleophosmin and cancer**. **Nature Reviews Cancer**, jul. 2006.

GSOTTBERGER, F.; MEIER, C.; AMMON, A.; PARKER, S.; WENDLAND, K.; GEORGE, R.; PETKOVIC, S.; MELLENTIN, L.; EMMERICH, C.; LUTZNY-GEIER, G.; METZLER, M.; et al. Targeted inhibition of protein synthesis renders cancer cells vulnerable to apoptosis by unfolded protein response. **Cell Death and Disease**, v. 14, n. 8, 1 ago. 2023.

GUAN, R. J.; FORD, H. L.; FU, Y.; LI, Y.; SHAW, L. M.; PARDEE, A. B. **Drg-1 as a Differentiation-related, Putative Metastatic Suppressor Gene in Human Colon Cancer** **1CANCER RESEARCH**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://aacrjournals.org/cancerres/article-pdf/60/3/749/2481828/ch030000749.pdf>>.

GUO, K.; ZHAO, C.; LANG, B.; WANG, H.; ZHENG, H.; ZHANG, F. **Regulator of Chromosome Condensation 2 Modulates Cell Cycle Progression, Tumorigenesis, and Therapeutic Resistance**. **Frontiers in Molecular Biosciences** Frontiers Media S.A., , 13 jan. 2021.

GUO, L.; YU, Z.; LI, Q.; LIANG, X.; YANG, L. **Correlation of MLH1 and MSH2 levels with clinicopathologic characteristics in colorectal cancer** **Am J Transl Res**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.ajtr.org>.

HAIKARAINEN, T.; KRAUSS, S.; LEHTIÖ, L. **Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.net** **Tankyrases: Structure, Function and Therapeutic Implications in Cancer** **Current Pharmaceutical Design**. [s.l: s.n.].

HARRISON, S.; BENZIGER, H. **The molecular biology of colorectal carcinoma and its implications: A review**. **Surgeon**, ago. 2011.

HEBERLE, H.; MEIRELLES, V. G.; DA SILVA, F. R.; TELLES, G. P.; MINGHIM, R. InteractiVenn: A web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. **BMC Bioinformatics**, v. 16, n. 1, 22 maio 2015.

HEIDELBERGER, C.; CHAUDHURI, N.; DANNEBERG, P.; MOOREN, D.; GRIESBACH, L.; DUSCHINSKY, R.; SCHNITZER, R. J.; PLEVEN, E.; SCHEINER J. Fluorinated Pyrimidines, A New Class of Tumour-Inhibitory Compounds. **Nature**, v. 179, 30 mar. 1957.

HOSKIN, D. W.; RAMAMOORTHY, A. **Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides**. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, fev. 2008.

HOWLETT, S.; J. CARTER, T.; M. SHAW, H.; D. NATHAN, P. Tebentafusp: a first-in-class treatment for metastatic uveal melanoma. **Therapeutic Advances in Medical Oncology**, v. 15, p. 1, 6 fev. 2023.

HSU, C. J.; MEERS, O.; BUSCHBECK, M.; HEIDEL, F. H. **The role of macroh2a histone variants in cancer.** *CancersMDPI*, , 2 jun. 2021.

HSU, H. C.; CHEN, M. H.; YEH, M. L.; CHEN, W. J. Antibacterial and Anticancer Activities of Pleurocidin-Amide, a Potent Marine Antimicrobial Peptide Derived from Winter Flounder, *Pleuronectes americanus*. *Marine Drugs*, v. 20, n. 8, 1 ago. 2022.

HUANG, Y.; HUANG, J.; CHEN, Y. **Alpha-helical cationic antimicrobial peptides: Relationships of structure and function.** *Protein and Cell* Higher Education Press, , 2010.

HUANG, Y.; WANG, H. C.; ZHAO, J.; WU, M. H.; SHIH, T. C. **Immunosuppressive roles of galectin-1 in the tumor microenvironment.** *BiomoleculesMDPI*, , 1 out. 2021.

IARC. **International Agency for Research on Cancer, Cancer Topics.**

INCA. **ESTIMATIVA 2023 - Incidência de Câncer no Brasil.** [s.l: s.n.]. p. 30–31

IVANCICH, M.; SCHRANK, Z.; WOJDYLA, L.; LEVISKAS, B.; KUCKOVIC, A.; SANJALI, A.; PURI, N. **Treating cancer by targeting telomeres and telomerase.** *AntioxidantsMDPI*, , 1 mar. 2017.

JOSHI, V.; LAKHANI, S. R.; MCCART REED, A. E. **NDRG1 in Cancer: A Suppressor, Promoter, or Both?** *CancersMDPI*, , 1 dez. 2022.

KIM, A. D.; ZHANG, R.; HAN, X.; KANG, K. A.; PIAO, M. J.; MAENG, Y. H.; CHANG, W. Y.; HYUN, J. W. Involvement of glutathione and glutathione metabolizing enzymes in human colorectal cancer cell lines and tissues. *Molecular Medicine Reports*, v. 12, n. 3, p. 4314–4319, 1 set. 2015.

KIM, H. J.; CHOI, G. S.; PARK, J. S.; PARK, S. Y.; LEE, H. J.; WOO, I. T.; PARK, I. K. Selective lateral pelvic lymph node dissection: a comparative study of the robotic versus laparoscopic approach. *Surgical Endoscopy*, v. 32, n. 5, p. 2466–2473, 1 maio 2018.

KINZLER, K. W.; VOGELSTEIN, B. Lessons from Hereditary Review Colorectal Cancer. *Cell*, v. 87, p. 159–170, 1996.

KOBAYASHI, G.; HAYASHI, T.; SENTANI, K.; URAOKA, N.; FUKUI, T.; KIDO, A.; KATSUYA, N.; ISHIKAWA, A.; BABASAKI, T.; SEKINO, Y.; NOSE, H.; et al. MCM4 expression is associated with high-grade histology, tumor progression and poor prognosis in urothelial carcinoma. *Diagnostic Pathology*, v. 18, n. 1, 1 dez. 2023.

KOBAYASHI, Y.; MASUDA, T.; FUJII, A.; SHIMIZU, D.; SATO, K.; KITAGAWA, A.; TOBO, T.; OZATO, Y.; SAITO, H.; KURAMITSU, S.; NODA, M.; et al. Mitotic checkpoint regulator RAE1 promotes tumor growth in colorectal cancer. *Cancer Science*, v. 112, n. 8, p. 3173–3189, 1 ago. 2021.

KRASNIKOV, B. F.; CHIEN, C. H.; NOSTRAMO, R.; PINTO, J. T.; NIEVES, E.; CALLAWAY, M.; SUN, J.; HUEBNER, K.; COOPER, A. J. L. Identification of the putative tumor suppressor Nit2 as ω -amidase, an enzyme metabolically linked to glutamine and asparagine transamination. *Biochimie*, v. 91, n. 9, p. 1072–1080, set. 2009.

KUIPERS, E. J.; GRADY, W. M.; LIEBERMAN, D.; SEUFFERLEIN, T.; SUNG, J. J.; BOELEN, P. G.; VAN DE VELDE, C. J. H.; WATANABE, T. Colorectal cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, v. 1, 5 nov. 2015.

KUNDA, N. K. **Antimicrobial peptides as novel therapeutics for non-small cell lung cancer.** *Drug Discovery Today* Elsevier Ltd, , 1 jan. 2020.

- KUPCHO, K.; SHULTZ, J.; HURST, R.; HARTNETT, J.; ZHOU, W.; MACHLEIDT, T.; GRAILER, J.; WORZELLA, T.; RISS, T.; LAZAR, D.; CALI, J. J.; et al. A real-time, bioluminescent annexin V assay for the assessment of apoptosis. **Apoptosis**, v. 24, n. 1–2, p. 184–197, 15 fev. 2019.
- LATCHMAN, J.; GUASTELLA, A.; TOFTHAGEN, C. 5-fluorouracil toxicity and dihydropyrimidine dehydrogenase enzyme: Implications for practice. **Clinical Journal of Oncology Nursing**, v. 18, n. 5, p. 581–585, 1 out. 2014.
- LEE, Y. T.; TAN, Y. J.; OON, C. E. **Molecular targeted therapy: Treating cancer with specificity.** **European Journal of Pharmacology** Elsevier B.V., , 5 set. 2018.
- LEISCH, M.; EGLE, A.; GREIL, R. **Plitidepsin: A potential new treatment for relapsed/refractory multiple myeloma.** **Future Oncology** Future Medicine Ltd., , 1 jan. 2019.
- LEMECH, C. R.; KICHENADASSE, G.; MARSCHNER, J. P.; ALEVIZOPOULOS, K.; OTTERLEI, M.; MILLWARD, M. ATX-101, a cell-penetrating protein targeting PCNA, can be safely administered as intravenous infusion in patients and shows clinical activity in a Phase 1 study. **Oncogene**, v. 42, n. 7, p. 541–544, 10 fev. 2023.
- LI, M.; MA, Y.; HUANG, P.; DU, A.; YANG, X.; ZHANG, S.; XING, C.; LIU, F.; CAO, J. Lentiviral DDX46 knockdown inhibits growth and induces apoptosis in human colorectal cancer cells. **Gene**, v. 560, n. 2, p. 237–244, 15 abr. 2015.
- LI, N.; WANG, Y.; NERI, S.; ZHEN, Y.; FONG, L. W. R.; QIAO, Y.; LI, X.; CHEN, Z.; STEPHAN, C.; DENG, W.; YE, R.; et al. Tankyrase disrupts metabolic homeostasis and promotes tumorigenesis by inhibiting LKB1-AMPK signalling. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, 1 dez. 2019.
- LI, Y.; GAO, W.; YANG, Z.; HU, Z.; LI, J. Multi-omics pan-cancer analyses identify MCM4 as a promising prognostic and diagnostic biomarker. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, 1 dez. 2024.
- LIMA, P. G.; OLIVEIRA, J. T. A.; AMARAL, J. L.; FREITAS, C. D. T.; SOUZA, P. F. N. **Synthetic antimicrobial peptides: Characteristics, design, and potential as alternative molecules to overcome microbial resistance.** **Life Sciences** Elsevier Inc., , 1 ago. 2021.
- LIN, C.; ZHANG, J.; LU, Y.; LI, X.; ZHANG, W.; ZHANG, W.; LIN, W.; ZHENG, L.; LI, X. NIT1 suppresses tumour proliferation by activating the TGF β 1-Smad2/3 signalling pathway in colorectal cancer article. **Cell Death and Disease**, v. 9, n. 3, 1 mar. 2018.
- LIN, Q.; JIN, H. J.; ZHANG, D.; GAO, L. DDX46 silencing inhibits cell proliferation by activating apoptosis and autophagy in cutaneous squamous cell carcinoma. **Molecular Medicine Reports**, v. 22, n. 5, p. 4236–4242, 1 nov. 2020.
- LINDHORST, P. H.; HUMMON, A. B. **Proteomics of Colorectal Cancer: Tumors, Organoids, and Cell Cultures—A Minireview.** **Frontiers in Molecular Biosciences** Frontiers Media S.A., , 10 dez. 2020.
- LIU, Y.; DU, Q.; MA, C.; XI, X.; WANG, L.; ZHOU, M.; BURROWS, J. F.; CHEN, T.; WANG, H. Structure–activity relationship of an antimicrobial peptide, phylloseptin-PHa: Balance of hydrophobicity and charge determines the selectivity of bioactivities. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 13, p. 447–458, 2019.
- LIU, Y.; XU, W.; LI, M.; YANG, Y.; SUN, D.; CHEN, L.; LI, H.; CHEN, L. **The regulatory mechanisms and inhibitors of isocitrate dehydrogenase 1 in cancer.** **Acta Pharmaceutica Sinica B** Chinese Academy of Medical Sciences, , 1 abr. 2023.

LIU, Y.; ZHANG, X.; HAN, C.; WAN, G.; HUANG, X.; IVAN, C.; JIANG, D.; RODRIGUEZ-AGUAYO, C.; LOPEZ-BERESTEIN, G.; RAO, P. H.; MARU, D. M.; et al. TP53 loss creates therapeutic vulnerability in colorectal cancer. **Nature**, v. 520, n. 7549, p. 697–701, 30 abr. 2015.

LONGLEY, D. B.; HARKIN, D. P.; JOHNSTON, P. G. **5-Fluorouracil: Mechanisms of action and clinical strategies**. **Nature Reviews Cancer**, maio 2003.

LOSADA, A.; BERLANGA, J. J.; MOLINA-GUIJARRO, J. M.; JIMÉNEZ-RUIZ, A.; GAGO, F.; AVILÉS, P.; DE HARO, C.; MARTÍNEZ-LEAL, J. F. Generation of endoplasmic reticulum stress and inhibition of autophagy by plitidepsin induces proteotoxic apoptosis in cancer cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 172, 1 fev. 2020.

LU, F.; ZHU, Y.; ZHANG, G.; LIU, Z. **Renovation as innovation: Repurposing human antibacterial peptide LL-37 for cancer therapy**. **Frontiers in Pharmacology**Frontiers Media S.A., , 23 ago. 2022.

LYNCH, H. T.; DE LA CHAPELLE, A. Hereditary Colorectal Cancer. **The new england journal of medicine**, v. 348, n. 10, p. 919–932, 2003.

MÄDE, V.; ELS-HEINDL, S.; BECK-SICKINGER, A. G. Automated solid-phase peptide synthesis to obtain therapeutic peptides. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, v. 10, p. 1197–1212, 22 maio 2014.

MANGAL, S.; CHAURASIA, A.; KHAJANCHI, A. Convolution Neural Networks for diagnosing colon and lung cancer histopathological images. **Electrical Engineering and Systems Science** , v. 1, p. 1–7, 8 set. 2020.

MANSOUR, M. A. **Ubiquitination: Friend and foe in cancer**. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**Elsevier Ltd, , 1 ago. 2018.

MARINE, J. C.; DAWSON, S. J.; DAWSON, M. A. **Non-genetic mechanisms of therapeutic resistance in cancer**. **Nature Reviews Cancer**Nature Research, , 1 dez. 2020.

MARTIN, V.; EGELUND, P. H. G.; JOHANSSON, H.; THORDAL LE QUEMENT, S.; WOJCIK, F.; SEJER PEDERSEN, D. **Greening the synthesis of peptide therapeutics: An industrial perspective**. **RSC Advances**Royal Society of Chemistry, , 24 nov. 2020.

MASUD, M.; SIKDER, N.; NAHID, A. AL; BAIRAGI, A. K.; ALZAIN, M. A. A machine learning approach to diagnosing lung and colon cancer using a deep learning-based classification framework. **Sensors (Switzerland)**, v. 21, n. 3, p. 1–21, 1 fev. 2021.

MATSUDA, T.; YAMASHITA, K.; HASEGAWA, H.; OSHIKIRI, T.; HOSONO, M.; HIGASHINO, N.; YAMAMOTO, M.; MATSUDA, Y.; KANAJI, S.; NAKAMURA, T.; SUZUKI, S.; et al. **Recent updates in the surgical treatment of colorectal cancer**. **Annals of Gastroenterological Surgery**Wiley-Blackwell Publishing Ltd, , 1 mar. 2018.

MCCORMICK, F. **K-Ras protein as a drug target**. **Journal of Molecular Medicine**Springer Verlag, , 1 mar. 2016.

MCKENZIE, B. A.; FERNANDES, J. P.; DOAN, M. A. L.; SCHMITT, L. M.; BRANTON, W. G.; POWER, C. Activation of the executioner caspases-3 and-7 promotes microglial pyroptosis in models of multiple sclerosis. **Journal of Neuroinflammation**, v. 17, n. 1, 29 ago. 2020.

MENG, M.; ZHONG, K.; JIANG, T.; LIU, Z.; KWAN, H. Y.; SU, T. **The current understanding on the impact of KRAS on colorectal cancer**. **Biomedicine and Pharmacotherapy**Elsevier Masson s.r.l., , 1 ago. 2021.

MERSEBURGER, A. S.; HUPE, M. C. **An Update on Triptorelin: Current Thinking on Androgen Deprivation Therapy for Prostate Cancer. *Advances in Therapy***Springer Healthcare, , 1 jul. 2016.

MESQUITA, F. P.; DE OLIVEIRA, F. L.; DA SILVA, E. L.; BRITO, D. M. S.; DE MORAES, M. E. A.; SOUZA, P. F. N.; MONTENEGRO, R. C. Synthetic Peptides Induce Human Colorectal Cancer Cell Death via Proapoptotic Pathways. **ACS Omega**, 22 out. 2024.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Atlas On-line de Mortalidade**. Disponível em: <<https://mortalidade.inca.gov.br/MortalidadeWeb/pages/Modelo01/consultar.xhtml#panelResultado>>. Acesso em: 20 out. 2024.

MOJARDÍN, L.; BOTET, J.; QUINTALES, L.; MORENO, S.; SALAS, M. New insights into the RNA-based mechanism of action of the anticancer drug 5'-fluorouracil in eukaryotic cells. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, nov. 2013.

MOORE, D. H.; BLESSING, J. A.; DUNTON, C.; BULLER, R. E.; REID, G. C. Dactinomycin in the Treatment of Recurrent or Persistent Endometrial Carcinoma: A Phase II Study of the Gynecologic Oncology Group 1. **Gynecologic Oncology**, 18 jun. 1999.

MÜLLER, R.; MISUND, K.; HOLIEN, T.; BACHKE, S.; GILLJAM, K. M.; VÅTSVEEN, T. K.; RØ, T. B.; BELLACCHIO, E.; SUNDAN, A.; OTTERLEI, M. Targeting Proliferating Cell Nuclear Antigen and Its Protein Interactions Induces Apoptosis in Multiple Myeloma Cells. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, 31 jul. 2013.

MULLER, S. **Synthetic peptides as tools for diagnosis and therapeutic strategies to treat systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity Reviews***, set. 2012.

NAIR VA; AL-KHAYAL NA; SIVAPERUMAL S; ABDEL-RAHMAN WM. Calponin 3 promotes invasion and drug resistance of colon cancer cells. **World Journal of Gastrointestinal Oncology**, v. 11, 2019.

NAJM, A. A. K.; AZFARALARIFF, A.; DYARI, H. R. E.; OTHMAN, B. A.; SHAHID, M.; KHALILI, N.; LAW, D.; SYED ALWI, S. S.; FAZRY, S. Anti-breast cancer synthetic peptides derived from the Anabas testudineus skin mucus fractions. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, 1 dez. 2021.

NERUSH, A. S.; SHCHUKINA, K. M.; BALALAEVA, I. V.; ORLOVA, A. G. Hydrogen peroxide in the reactions of cancer cells to cisplatin. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1863, n. 4, p. 692–702, 1 abr. 2019.

NGUYEN, H. T.; DUONG, H. Q. **The molecular characteristics of colorectal cancer: Implications for diagnosis and therapy (review). *Oncology Letters***Spandidos Publications, , 1 jul. 2018.

NORDSTRÖM, R.; MALMSTEN, M. **Delivery systems for antimicrobial peptides. *Advances in Colloid and Interface Science***Elsevier B.V., , 1 abr. 2017.

NOVKOVIĆ, M.; SIMUNIĆ, J.; BOJOVIĆ, V.; TOSSI, A.; JURETIĆ, D. DADP: The database of anuran defense peptides. **Bioinformatics**, v. 28, n. 10, p. 1406–1407, maio 2012.

PAN, W. R.; CHEN, Y. L. S.; HSU, H. C.; CHEN, W. J. Antimicrobial peptide GW-H1-induced apoptosis of human gastric cancer AGS cell line is enhanced by suppression of autophagy. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 400, n. 1–2, p. 77–86, 1 fev. 2015.

PENG, Y.; LIU, X.; LIU, X.; CHENG, X.; XIA, L.; QIN, L.; GUAN, S.; WANG, Y.; WU, X.; WU, J.; YAN, D.; et al. RCCD1 promotes breast carcinogenesis through regulating hypoxia-associated mitochondrial homeostasis. **Oncogene**, v. 42, n. 50, p. 3684–3697, 8 dez. 2023.

PIEDBOIS, P. Modulation of fluorouracil by leucovorin in patients with advanced colorectal cancer: An updated meta-analysis. **Journal of Clinical Oncology**, v. 22, n. 18, p. 3766–3775, 2004.

PIROZZI, C. J.; YAN, H. **The implications of IDH mutations for cancer development and therapy.** **Nature Reviews Clinical Oncology** Nature Research, , 1 out. 2021.

PLEGUEZUELOS-MANZANO, C.; PUSCHHOF, J.; ROSENDAHL HUBER, A.; VAN HOECK, A.; WOOD, H. M.; NOMBURG, J.; GURJAO, C.; MANDERS, F.; DALMASSO, G.; STEGE, P. B.; PAGANELLI, F. L.; et al. Mutational signature in colorectal cancer caused by genotoxic pks + E. coli. **Nature**, v. 580, n. 7802, p. 269–273, 9 abr. 2020.

PLOUSSARD, G.; MONGIAT-ARTUS, P. **Triptorelin in the management of prostate cancer.** **Future Oncology**, jan. 2013.

RODAT-DESPOIX, L.; CHAMLALI, M.; OUADID-AHIDOUCH, H. **Ion channels as key partners of cytoskeleton in cancer disease.** **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer** Elsevier B.V., , 1 dez. 2021.

RYAN, M. B.; CORCORAN, R. B. **Therapeutic strategies to target RAS-mutant cancers.** **Nature Reviews Clinical Oncology** Nature Publishing Group, , 1 nov. 2018.

SARKAR, T.; CHETIA, M.; CHATTERJEE, S. **Antimicrobial Peptides and Proteins: From Nature's Reservoir to the Laboratory and Beyond.** **Frontiers in Chemistry** Frontiers Media S.A., , 18 jun. 2021.

SEARS, C. L.; GARRETT, W. S. **Microbes, microbiota, and colon cancer.** **Cell Host and Microbe** Cell Press, , 12 mar. 2014.

SEIMIYA, H.; MURAMATSU, Y.; OHISHI, T.; TSURUO, T. Tankyrase 1 as a target for telomere-directed molecular cancer therapeutics. **Cancer Cell**, v. 7, n. 1, p. 25–37, 2005.

SEKHAR, K. R.; FREEMAN, M. L. **Nucleophosmin Plays a Role in Repairing DNA Damage and Is a Target for Cancer Treatment.** **Cancer Research** American Association for Cancer Research Inc., , 15 maio 2023.

SHARMA, A.; GUPTA, P.; KUMAR, R.; BHARDWAJ, A. DPABBs: A Novel in silico Approach for Predicting and Designing Anti-biofilm Peptides. **Scientific Reports**, v. 6, 25 fev. 2016.

SIES, H.; JONES, D. P. **Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents.** **Nature Reviews Molecular Cell Biology** Nature Research, , 1 jul. 2020.

SKARKOVA, V.; KRALOVA, V.; VITOVCOVA, B.; RUDOLF, E. **Selected aspects of chemoresistance mechanisms in colorectal carcinoma—A focus on epithelial-to-mesenchymal transition, Autophagy, and apoptosis.** **Cells** MDPI, , 1 mar. 2019.

SMITH, S. J.; LI, C. M.; LINGEMAN, R. G.; HICKEY, R. J.; LIU, Y.; MALKAS, L. H.; RAOOF, M. Molecular Targeting of Cancer-Associated PCNA Interactions in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Using a Cell-Penetrating Peptide. **Molecular Therapy Oncolytics**, v. 17, p. 250–256, 26 jun. 2020.

SOUZA, P. F. N.; MARQUES, L. S. M.; OLIVEIRA, J. T. A.; LIMA, P. G.; DIAS, L. P.; NETO, N. A. S.; LOPES, F. E. S.; SOUSA, J. S.; SILVA, A. F. B.; CANEIRO, R. F.; LOPES, J. L. S.; et al. Synthetic antimicrobial peptides: From choice of the best sequences to action mechanisms. **Biochimie**, v. 175, p. 132–145, 1 ago. 2020.

SOUZA, P. F. N.; VAN TILBURG, M. F.; MESQUITA, F. P.; AMARAL, J. L.; LIMA, L. B.; MONTENEGRO, R. C.; LOPES, F. E. S.; MARTINS, R. X.; VIEIRA, L.; FARIAS, D. F.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C. O.; et al.

Neutralizing Effect of Synthetic Peptides toward SARS-CoV-2. **ACS Omega**, v. 7, n. 18, p. 16222–16234, 10 maio 2022.

SPORN, J. C.; JUNG, B. Differential regulation and predictive potential of macroH2A1 isoforms in colon cancer. **American Journal of Pathology**, v. 180, n. 6, p. 2516–2526, jun. 2012.

SPRING, K. J.; ZHAO, Z. Z.; KARAMATIC, R.; WALSH, M. D.; WHITEHALL, V. L. J.; PIKE, T.; SIMMS, L. A.; YOUNG, J.; JAMES, M.; MONTGOMERY, G. W.; APPEYARD, M.; et al. High Prevalence of Sessile Serrated Adenomas With BRAF Mutations: A Prospective Study of Patients Undergoing Colonoscopy. **Gastroenterology**, v. 131, n. 5, p. 1400–1407, 2006.

SRINIVASAN, S.; AVADHANI, N. G. **Cytochrome c oxidase dysfunction in oxidative stress. Free Radical Biology and Medicine**, 15 set. 2012.

STROHKAMP, S.; GEMOLL, T.; HUMBORG, S.; HARTWIG, S.; LEHR, S.; FREITAG-WOLF, S.; BECKER, S.; FRANZÉN, B.; PRIES, R.; WOLLENBERG, B.; ROBLICK, U. J.; et al. Protein levels of clusterin and glutathione synthetase in platelets allow for early detection of colorectal cancer. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 75, n. 2, p. 323–334, 1 jan. 2018.

SUNG, H.; FERLAY, J.; SIEGEL, R. L.; LAVERSANNE, M.; SOERJOMATARAM, I.; JEMAL, A.; BRAY, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, maio 2021.

TAM, S. Y.; ISLAM KHAN, M. Z.; CHEN, J. Y.; YIP, J. H. Y.; YAN, H. Y.; TAM, T. Y.; LAW, H. K. W. Proteomic Profiling of Chemotherapy Responses in FOLFOX-Resistant Colorectal Cancer Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 12, 1 jun. 2023.

TANAKA, A.; WANG, J. Y.; SHIA, J.; ZHOU, Y.; OGAWA, M.; HENDRICKSON, R. C.; KLIMSTRA, D. S.; ROEHRL, M. H. DEAD-box RNA helicase protein DDX21 as a prognosis marker for early stage colorectal cancer with microsatellite instability. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 1 dez. 2020.

THE AMERICAN CANCER SOCIETY MEDICAL AND EDITORIAL CONTENT TEAM. **Common treatment approaches**. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/types/colon-rectal-cancer/treating/colon-surgery.html>>. Acesso em: 25 maio. 2024.

THERIZOLS, G.; BASH-IMAM, Z.; PANTHU, B.; MACHON, C.; VINCENT, A.; RIPOLL, J.; NAIT-SLIMANE, S.; CHALABI-DCHAR, M.; GAUCHEROT, A.; GARCIA, M.; LAFORÊTS, F.; et al. Alteration of ribosome function upon 5-fluorouracil treatment favors cancer cell drug-tolerance. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, 1 dez. 2022.

THÉVENET, P.; SHEN, Y.; MAUPETIT, J.; GUYON, F.; DERREUMAUX, P.; TUFFÉRY, P. PEP-FOLD: An updated de novo structure prediction server for both linear and disulfide bonded cyclic peptides. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. W1, jul. 2012.

THOMAS, S.; IZARD, J.; WALSH, E.; BATICH, K.; CHONGSATHIDKIET, P.; CLARKE, G.; SELA, D. A.; MULLER, A. J.; MULLIN, J. M.; ALBERT, K.; GILLIGAN, J. P.; et al. **The host microbiome regulates and maintains human health: A primer and perspective for non-microbiologists. Cancer Research**American Association for Cancer Research Inc., , 15 abr. 2017.

TONK, M.; VILCINSKAS, A.; RAHNAMAEIAN, M. **Insect antimicrobial peptides: potential tools for the prevention of skin cancer. Applied Microbiology and Biotechnology**Springer Verlag, , 1 set. 2016.

TORRES, M. D. T.; SOTHISELVAM, S.; LU, T. K.; DE LA FUENTE-NUNEZ, C. **Peptide Design Principles for Antimicrobial Applications. Journal of Molecular Biology**Academic Press, , 23 ago. 2019.

TOURNIGAND, C.; ANDRÉ, T.; ACHILLE, E.; LLEDO, G.; FLESH, M.; MERY-MIGNARD, D.; QUINAUX, E.; COUTEAU, C.; BUYSE, M.; GANEM, G.; LANDI, B.; et al. FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: A randomized GERCOR study. **Journal of Clinical Oncology**, v. 22, n. 2, p. 229–237, 2004.

VAGHARI-TABARI, M.; HASSANPOUR, P.; SADEGH-SOLTANI, F.; MALAKOTI, F.; ALEMI, F.; QUJEQ, D.; ASEMI, Z.; YOUSEFI, B. **CRISPR/Cas9 gene editing: a new approach for overcoming drug resistance in cancer. Cellular and Molecular Biology Letters**BioMed Central Ltd, , 1 dez. 2022.

VAGHARI-TABARI, M.; JAFARI-GHARABAGHLOU, D.; MOHAMMADI, M.; HASHEMZADEH, M. S. **Zinc Oxide Nanoparticles and Cancer Chemotherapy: Helpful Tools for Enhancing Chemo-sensitivity and Reducing Side Effects? Biological Trace Element Research**Springer, , 1 maio 2024.

VAN CUTSEM, E.; CERVANTES, A.; NORDLINGER, B.; ARNOLD, D.; THE ESMO GUIDELINES WORKING GROUP. Metastatic colorectal cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of Oncology**, v. 25, p. iii1–iii9, 1 set. 2014.

VAN LAETHEM, J. L. **Adjuvant treatment for colorectal cancer.** Acta Gastro-Enterologica Belgica. **Anais...**2001.

VANZOLINI, T.; BRUSCHI, M.; RINALDI, A. C.; MAGNANI, M.; FRATERNALE, A. **Multitalented Synthetic Antimicrobial Peptides and Their Antibacterial, Antifungal and Antiviral Mechanisms. International Journal of Molecular Sciences**MDPI, , 1 jan. 2022.

VASAN, N.; BASELGA, J.; HYMAN, D. M. **A view on drug resistance in cancer.** NatureNature Publishing Group, , 14 nov. 2019.

VASUDEV, N. S.; REYNOLDS, A. R. **Anti-angiogenic therapy for cancer: Current progress, unresolved questions and future directions. Angiogenesis**Kluwer Academic Publishers, , 2014.

VENUGOPALAN, A.; LYNBERG, M.; CULTRARO, C. M.; NGUYEN, K. D. P.; ZHANG, X.; WARIS, M.; DAYAL, N.; ABEBE, A.; MAITY, T. K.; GUHA, U. SCAMP3 is a mutant EGFR phosphorylation target and a tumor suppressor in lung adenocarcinoma. **Oncogene**, v. 40, n. 18, p. 3331–3346, 6 maio 2021.

VERMA, A.; KUMAR, A.; CHUGH, A.; KUMAR, S.; KUMAR, P. **Tankyrase inhibitors: emerging and promising therapeutics for cancer treatment. Medicinal Chemistry Research**Springer, , 1 jan. 2021.

VÉRTESSY, B. G.; TÓTH, J. Keeping uracil out of DNA: physiological role, structure and catalytic mechanism of dUTPases. **Accounts of Chemical Research**, v. 42, n. 1, p. 97–106, jan. 2009.

VIGNALI, A.; ELMORE, U.; MILONE, M.; ROSATI, R. **Transanal total mesorectal excision (TaTME): current status and future perspectives. Updates in Surgery**Springer-Verlag Italia s.r.l., , 1 mar. 2019.

VIGNEAUD, V. D.; RESSLER, C.; SWAN, C. J. M.; ROBERTS, C. W.; KATSOYANNIS, P. G.; GORDON, S. THE SYNTHESIS OF AN OCTAPEPTIDE AMIDE WITH THE HORMONAL ACTIVITY OF OXYTOCIN. **Journal of The American Chemical Society**, v. 75, p. 4879–4880, 1953.

VODENKOVA, S.; BUCHLER, T.; CERVENA, K.; VESKRNOVA, V.; VODICKA, P.; VYMETALKOVA, V. **5-fluorouracil and other fluoropyrimidines in colorectal cancer: Past, present and future. Pharmacology and Therapeutics**Elsevier Inc., , 1 fev. 2020.

WANG, D.; LI, Y.; LIU, Y.; CHENG, S.; LIU, F.; ZUO, R.; DING, C.; SHI, S.; LIU, G. NPM1 promotes cell proliferation by targeting PRDX6 in colorectal cancer. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 147, 1 jun. 2022.

- WANG, T.; SUN, H.; BAO, Y.; EN, R.; TIAN, Y.; ZHAO, W.; JIA, L. POM121 overexpression is related to a poor prognosis in colorectal cancer. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 20, n. 3, p. 345–353, 3 mar. 2020.
- WANG, W.; LIU, P.; LAVRIJSEN, M.; LI, S.; ZHANG, R.; LI, S.; VAN DE GEER, W. S.; VAN DE WERKEN, H. J. G.; PEPPELENBOSCH, M. P.; SMITS, R. Evaluation of AXIN1 and AXIN2 as targets of tankyrase inhibition in hepatocellular carcinoma cell lines. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, 1 dez. 2021.
- WANG, X.; WANG, S.; TANG, X.; ZHANG, A.; GRABINSKI, T.; GUO, Z.; HUDSON, E.; BERGHUIS, B.; WEBB, C.; ZHAO, P.; CAO, B. Development and evaluation of monoclonal antibodies against phosphatidylethanolamine binding protein 1 in pancreatic cancer patients. **Journal of Immunological Methods**, v. 362, n. 1–2, p. 151–160, 31 out. 2010.
- WEINBERG, R. A. **A biologia do Câncer**. [s.l.: s.n.]. v. 1st Edition
- WHO. **World Health Organization, Colorectal cancer**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/colorectal-cancer>>. Acesso em: 14 jun. 2024.
- XIANG, K.; KALTHOFF, C.; MÜNCH, C.; JENDROSSEK, V.; MATSCHKE, J. Accumulation of oncometabolite D-2-Hydroxyglutarate by SLC25A1 inhibition: A metabolic strategy for induction of HR-ness and radiosensitivity. **Cell Death and Disease**, v. 13, n. 7, 1 jul. 2022.
- XIE, P.; YUAN, F. Q.; HUANG, M. S.; ZHANG, W.; ZHOU, H. H.; LI, X.; LIU, Z. Q. DCBLD2 Affects the Development of Colorectal Cancer via EMT and Angiogenesis and Modulates 5-FU Drug Resistance. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, 19 maio 2021.
- XIE, Y. H.; CHEN, Y. X.; FANG, J. Y. **Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer**. **Signal Transduction and Targeted Therapy** Springer Nature, , 1 dez. 2020.
- YANG, J.; ZHANG, W.; EVANS, P. M.; CHEN, X.; HE, X.; LIU, C. Adenomatous polyposis coli (APC) differentially regulates β -catenin phosphorylation and ubiquitination in colon cancer cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 26, p. 17751–17757, 30 jun. 2006.
- YANG, M.; ZHANG, C.; ZHANG, M. Z.; ZHANG, S. Novel synthetic analogues of avian β -defensin-12: The role of charge, hydrophobicity, and disulfide bridges in biological functions. **BMC Microbiology**, v. 17, n. 1, 23 fev. 2017.
- YE, X.; LING, B.; XU, H.; LI, G.; ZHAO, X.; XU, J.; LIU, J.; LIU, L. Clinical significance of high expression of proliferating cell nuclear antigen in non-small cell lung cancer. **Medicine (United States)**, v. 99, n. 16, p. E19755, 2020.
- YILDIRIM, M.; CINAR, A. Classification with respect to colon adenocarcinoma and colon benign tissue of colon histopathological images with a new CNN model: MA_ColonNET. **International Journal of Imaging Systems and Technology**, v. 32, n. 1, p. 155–162, 1 jan. 2022.
- YOO, H.; KIM, Y.; KIM, J.; CHO, H.; KIM, K. Overcoming Cancer Drug Resistance with Nanoparticle Strategies for Key Protein Inhibition. **Molecules**, v. 29, n. 17, p. 3994, 23 ago. 2024.
- YU, A. C. Y.; CHERN, Y. J.; ZHANG, P.; PASILIAO, C. C.; RAHMAN, M.; CHANG, G.; REN, J.; TAI, I. T. Inhibition of nucleophosmin 1 suppresses colorectal cancer tumor growth of patient -derived xenografts via activation of p53 and inhibition of AKT. **Cancer Biology and Therapy**, v. 22, n. 2, p. 112–123, 2021.

ZHANG, C.; YANG, M.; ERICSSON, A. C. Antimicrobial peptides: Potential application in liver cancer. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. JUN, 2019.

ZHANG, J.; SUN, X.; ZHAO, H.; ZHOU, X.; ZHANG, Y.; XIE, F.; LI, B.; GUO, G. In Silico Design and Synthesis of Antifungal Peptides Guided by Quantitative Antifungal Activity . **Journal of Chemical Information and Modeling**, 14 maio 2024.

ZHANG, L.; XING, X.; MENG, F.; WANG, Y.; ZHONG, D. Oral fluoropyrimidine versus intravenous 5-fluorouracil for the treatment of advanced gastric and colorectal cancer: Meta-analysis. **Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)**, v. 33, n. 1, p. 209–225, 1 jan. 2018.

ZHANG, N.; YIN, Y.; XU, S. J.; CHEN, W. S. **5-Fluorouracil: Mechanisms of resistance and reversal strategies**. **Molecules**, ago. 2008.

ZHANG, S. F.; WANG, X. Y.; FU, Z. Q.; PENG, Q. H.; ZHANG, J. Y.; YE, F.; FU, Y. F.; ZHOU, C. Y.; LU, W. G.; CHENG, X. D.; XIE, X. TXNDC17 promotes paclitaxel resistance via inducing autophagy in ovarian cancer. **Autophagy**, v. 11, n. 2, p. 225–238, 2015.

ZHOU, Y.; LIH, T. M.; PAN, J.; HÖTI, N.; DONG, M.; CAO, L.; HU, Y.; CHO, K. C.; CHEN, S. Y.; EGUEZ, R. V.; GABRIELSON, E.; et al. Proteomic signatures of 16 major types of human cancer reveal universal and cancer-type-specific proteins for the identification of potential therapeutic targets. **Journal of Hematology and Oncology**, v. 13, n. 1, 1 dez. 2020.

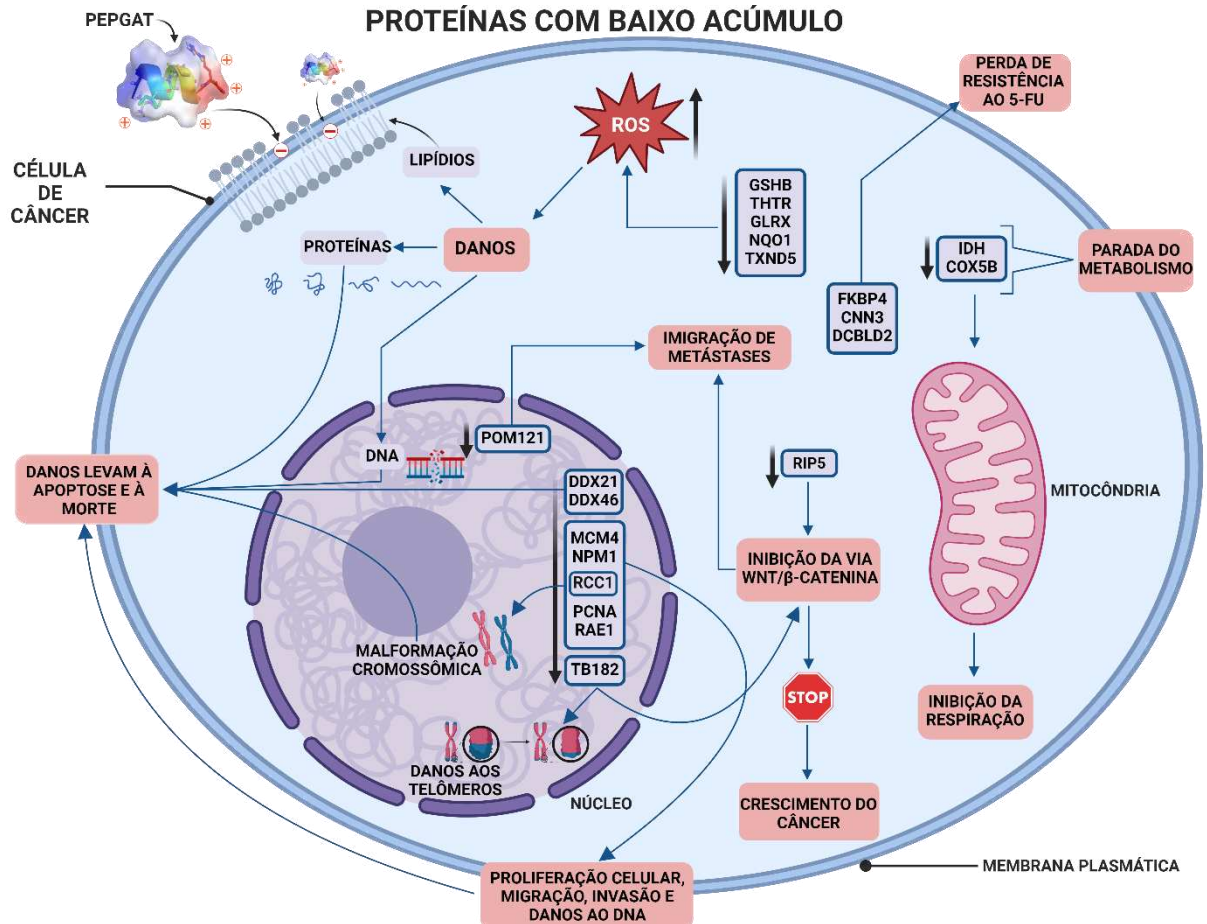
ZHU, Z.; HOU, Q.; WANG, B.; LI, C.; LIU, L.; GONG, W.; CHAI, J.; GUO, H.; JIA, Y. FKBP4 regulates 5-fluorouracil sensitivity in colon cancer by controlling mitochondrial respiration. **Life Science Alliance**, v. 5, n. 11, 1 nov. 2022.

ZOMPRA, A. A.; GALANIS, A. S.; WERBITZKY, O.; ALBERICIO, F. **Manufacturing peptides as active pharmaceutical ingredients**. **Future Medicinal Chemistry**, maio 2009.

8 ANEXOS

8.1 Figura suplementar 1

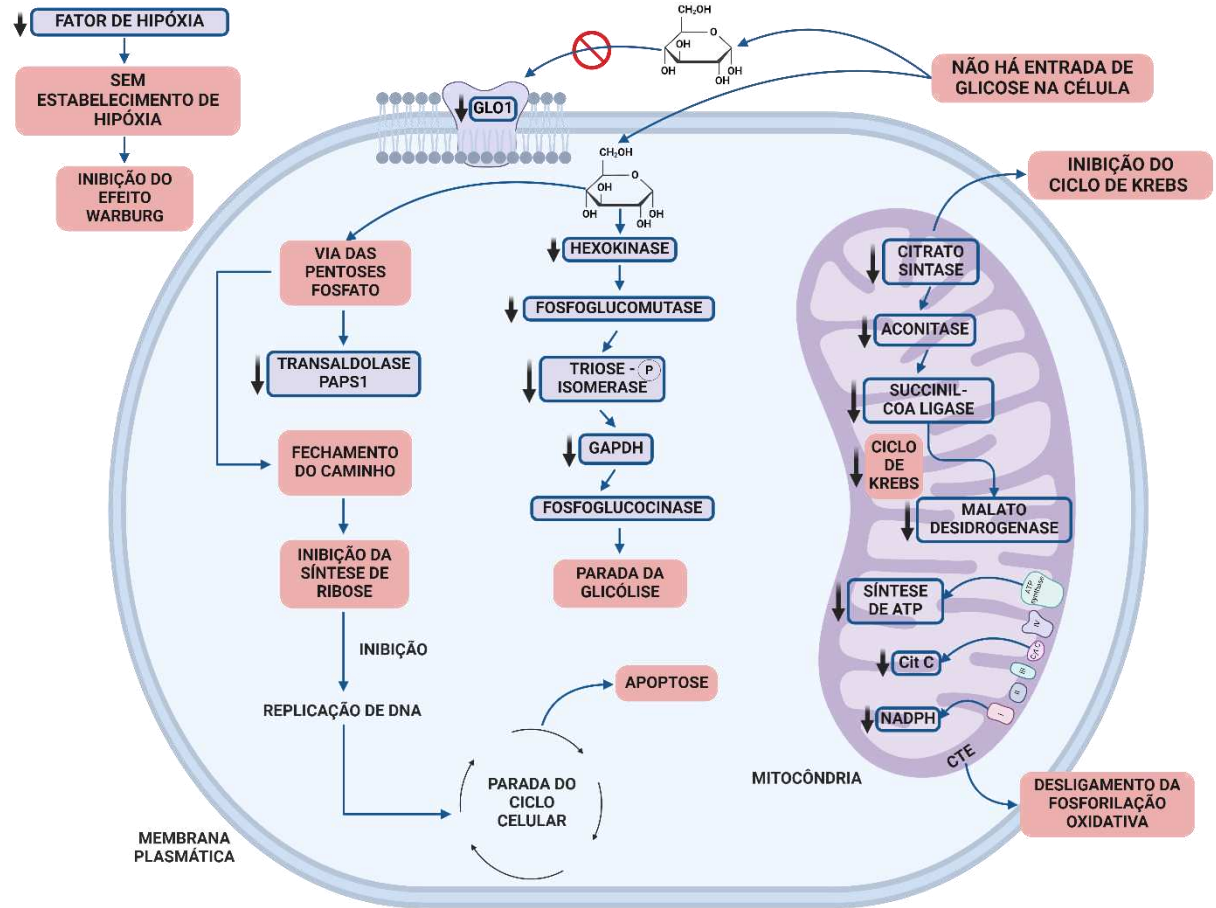
Figura suplementar 1 – Esquema que mostra as alterações em HCT-116 em diversas vias celulares causadas pelo PepGAT, conforme dados proteômicos.



Fonte: Elaborada com base nos dados da pesquisa

8.2 Figurar suplementar 2

Figura suplementar 2 – Esquema que mostra as alterações no HCT-116 relacionadas ao metabolismo energético causadas por PepGAT, conforme dados proteômicos.



Fonte: Elaborada com base nos dados da pesquisa

8.3 Tabelas suplementares

Tabela suplementar 1. Proteínas exclusivas do grupo de controle

Nome da proteína	Código Uniprot	Componente celular (CC)	Função molecular (FM)	Processo biológico (PB)
Proteína 1 contendo o domínio UBX	Q04323	Núcleo/citoplasma	Ligação da proteína ubiquitina ligase	Processo catabólico de proteína dependente de ubiquitina mediado por proteassoma
Glutathione sintetase	P48637	Citosol/exossomo extracelular	Atividade da glutathione sintase	Resposta ao estresse oxidativo
Fator indutor de apoptose 1, mitocondrial	O95831	Citoplasma/citosol/núcleo	Atividade de formação de H ₂ O ₂ da NAD(P)H oxidase	Processo apoptótico
Subunidade alfa do fator de fragmentação do DNA	O00273	Núcleo/citosol/membrana plasmática	Atividade inibidora de desoxirribonuclease	Regulação negativa da fragmentação do DNA apoptótico
Antígeno nuclear de células em proliferação	P12004	Núcleo/exossomo extracelular	Ligação da DNA polimerase	Regulação positiva do reparo do DNA
Galectina-3	P17931	Núcleo/espaco extracelular/membrana plasmática	Ligação de RNA	Regulação negativa da via de sinalização apoptótica extrínseca
Isocitrato desidrogenase [NADP] citoplasmática	O75874	Citoplasma/citosol/região extracelular	Atividade da isocitrato desidrogenase (NADP+)	Processo metabólico do isocitrato
Citocromo c oxidase subunidade 5B, mitochondrial	P10606	Mitocôndrias	Atividade da citocromo-c oxidase	Transporte de elétrons mitocondrial, citocromo c para oxigênio
Chaperona A específica de tubulina	O75347	Citoesqueleto/citoplasma de microtúbulos	Ligação da chaperona de dobramento de proteínas	Dobramento de proteínas
Nucleofosmina	P06748	Núcleo/centrossomo	Ligação de RNA	Regulação positiva da transcrição contemplada pelo DNA
Proteína PRRC2A	P48634	Citosol/exossomo extracelular/membrana plasmática/nucleoplasma	Ligação de RNA	Diferenciação celular
Regulador da condensação de cromossomos	P18754	Núcleo/citoplasma	Ligação ao DNA nucleossômico	Regulação da divisão nuclear mitótica
Proteína de ligação à tankyrase-1 de 182 kDa	Q9C0C2	Núcleo/citoplasma/membrana plasmática	Ligação à caderina	Manutenção dos telômeros via telomerase
Peptidil-prolyl cis-trans isomerase FKBP1A	P62942	Citoplasma/citosol/membrana	Ligação do receptor beta do fator de crescimento transformador	Regulação negativa da via de sinalização do receptor do fator de crescimento transformador β
Fator de licenciamento de replicação de DNA MCM4	P33991	Núcleo	Atividade de helicase de DNA	Replicação do DNA
Proteína semelhante à TIP41	O75663	Citosol	Desconhecido	Regulação negativa da atividade da fosfoproteína fosfatase

Proteína ativadora de GTPase e proteína 1 contendo o domínio VPS9	Q14C86	Membrana plasmática/endossomo/cytosol	Ligação à proteína ativadora de GTPase	Regulação do transporte de proteínas
Interator 1 da clatrina	Q14677	Membranas plasmáticas/aparelho de Golgi/endossomo	Ligação da clatrina	Endocitose
Proteína de ligação ao RNA 39	Q14498	Citoesqueleto do nucleoplasma/microtúbulo	Ligação de RNA	Processamento de mRNA
Subunidade 5 do fator de especificidade de clivagem e poliadenilação	O43809	Núcleo	Ligação de RNA	Processamento de mRNA
Tiosulfato sulfurtransferase	Q16762	Espaço extracelular/mitocôndrio	Atividade da tiosulfato sulfurtransferase	Processo catabólico de cianato
Alfa-glucosidase lisossômica	P10253	Lisossomo/exossomo extracelular/membrana	Atividade de alfa-glucosidase	Processo catabólico de glicogênio
Molécula adaptadora de transdução de sinal 1	Q92783	Citosol/organela delimitada por membrana intracelular	Ligação de proteína ligase semelhante à ubiquitina	Macroautofagia
Provável RNA helicase dependente de ATP DDX46	Q7L014	Núcleo	Ligação de RNA	Splicing de mRNA, via spliceossomo
Subunidade TOM34 do receptor de importação mitochondrial	Q15785	Citosol/mitocôndrias/núcleo	Ligação à proteína de choque térmico	Direcionamento de proteínas para a mitocôndria
Lactotransferrina	P02788	Citoplasma/núcleo	Ligação de íons de ferro	Resposta imune inata na mucosa
U1 ribonucleoproteína nuclear pequena de 70 kDa	P08621	Núcleo	Ligação de RNA	Splicing de mRNA, via spliceossomo
Ribose-5-fosfato isomerase	P49247	Citosol	Atividade da isomerase de ribose-5-fosfato	Processo metabólico da D-ribose
Proteína de repetição de tetratricopeptídeo 1	Q99614	Citosol/membrana peroxisomal	Ligação de proteínas não dobradas	Dobramento de proteínas
Proteína 17 contendo o domínio da tiorredoxina	Q9BRA2	Citosol/exossomo extracelular	Atividade de peroxidase	Via de sinalização mediada pelo fator de necrose tumoral
Transportador de aminoácidos neutros B(0)	Q15758	Membrana plasmática/exossomo extracelular	Atividade antiportadora	Transporte de aminoácidos
Subunidade do complexo MICOS MIC13	Q5XKP0	Mitocôndrias	Desconhecido	Organização da membrana mitocondrial interna
Componente de RNA telomerase que interage com a Rnase	Q9BQ61	Desconhecido	Ligação de RNA	Processo catabólico de rRNA
ADP-açúcar pirofosfatase	Q9UKK9	Citosol/exossomo extracelular/núcleo	Atividade de ADP-açúcar difosfatase	Processo catabólico de D-ribose

Quinurenina oxoglutarato transaminase 3	Q6YP21	Mitocôndria/citoplasma	Atividade da quinurenina-glioxilato transaminase	Processo metabólico de aminoácidos
NAD(P)H desidrogenase [quinona] 1	P15559	Núcleo/citosol/citoplasma	Atividade do citocromo b5 redutase, sobre NAD(P)H	Resposta celular ao estresse oxidativo
Proteína 1 associada à quinase da fase S	P63208	Citoplasma/núcleo/cytosol	Atividade adaptadora de substrato de ligase semelhante à ubiquitina	Ubiquitinação de proteínas
Proteína âncora semelhante a bege e responsiva a lipopolissacarídeos	P50851	Citosol/membrana/membrana lisossômica	Ligação de proteína quinase	Mitofagia
Proteína 1 contendo o domínio SNW	Q13573	Núcleo	Ligação de RNA	Via de sinalização apoptótica intrínseca em resposta a danos no DNA pelo mediador da classe p53
Proteína tipo NIF3 1	Q9GZT8	Citoplasma/núcleo	Ligação do fator de transcrição de ligação ao DNA específico da RNA polimerase II	Regulação positiva da transcrição contemplada pelo DNA
Proteína LSM12	Q3MHD2	Citoplasma	Ligação de RNA	Desconhecido
Proteína da subunidade ribossômica pequena eS25	P62851	Ribossomo/citosol/núcleo	Componente estrutural do ribossomo	Biogênese da subunidade pequena ribossômica
Diidropteridina reductase	P09417	Citoplasma/citosol/exossomo extracelular	Ligação ao NADPH	Processo metabólico de aminoácidos
Fator de emenda de pré-mRNA RBM22	Q9NW64	Núcleo/citoplasma	Ligação de RNA	Splicing de mRNA, via spliceossomo
Proteína diáfana homóloga 1	O60610	Citoplasma/membrana plasmática/núcleo	Ligação do receptor de sinalização	Organização do citoesqueleto
Ribonucleoproteína nuclear pequena U4/U6 Prp31	Q8WWY3	Núcleo	Ligação de RNA	Splicing de mRNA, via spliceossomo
Quinase de proteína serina/treonina 24	Q9Y6E0	Citoplasma/núcleo/exossomo extracelular	Atividade da proteína serina/treonina quinase	Via de sinalização apoptótica intrínseca em resposta ao estresse oxidativo
Nucleolar RNA helicase 2	Q9NR30	Núcleo/citosol/mitocôndrias	Atividade de RNA helicase	Regulação positiva da transcrição pela RNA polimerase I, II e III
Calponina-3	Q15417	Citoesqueleto de actina/cytosol	Ligação do filamento de actina	Organização dos filamentos de actina
Proteína 1 relacionada ao La	Q6PKG0	Citosol/citoplasma	Atividade de ativador de tradução	Regulação positiva da macroautofagia
Discoidina, proteína 2 contendo domínio CUB e LCCL	Q96PD2	Núcleo/citoplasma	Ligação de proteína dependente de modificação de poliubiquitina	Processo catabólico de proteína dependente de ubiquitina mediado por proteassoma

Glutaredoxina-1	P35754	Núcleo/exossomo extracelular/cytosol	Atividade da glutathione dissulfeto oxidoreductase	Interconversão de moléculas pequenas contendo nucleobase
Proteína tipo Bola 2	Q9H3K6	Núcleo/cytosol	Ligação de cluster de ferro-enxofre	Maturação de proteínas por transferência de cluster de ferro-enxofre
Fator associado ao FAS 2	Q96CS3	Retículo endoplasmático/região extracelular	Atividade adaptadora de proteína-macromolécula	Transporte retrógrado de proteínas, do RE para o cytosol
Subunidade M2 da ribonucleosídeo-difosfato reductase	P31350	Núcleo/cytosol	Atividade de ribonucleosídeo-difosfato redutase, dissulfeto de tioredoxina como aceitador	Processo biossintético de desoxirribonucleotídeos
Subunidade 3 do complexo de transcrição CCR4-NOT	O75175	Núcleo/cytosol	Proteína do desenvolvimento	Regulação da transcrição contemplada pelo DNA
Creatina quinase tipo B	P12277	Mitocôndria/exossomo extracelular/cytosol	Atividade da creatina quinase	Processo biossintético da fosfocreatina
NADH desidrogenase [ubiquinona] 1 subunidade 4 do subcomplexo beta	O95168	Mitocôndrio/núcleo	Atividade da NADH desidrogenase (ubiquinona)	Transporte de elétrons mitocondrial, NADH para ubiquinon
Proteína canopy homóloga 3	Q9BT09	Lúmen do retículo endoplasmático	Ligação do receptor de sinalização	Resposta imune inata
Proteína PRRC1	Q96M27	Aparelho de Golgi/citoplasma	Ligação da subunidade reguladora da proteína quinase A	Desconhecido
Proteína da membrana do poro do envelope nuclear POM 121C	A8CG34	Núcleo	Componente estrutural do poro nuclear	Exportação de RNA do núcleo
Enzima 1A de decapagem de mRNA	Q9NPI6	Núcleo/citoplasma	Ligação a mRNA	Processo catabólico de mRNA transcrito no núcleo
Alfa-manosidase lisossômica	O00754	Lisossomo/nucleoplasma	Atividade de alfa-manosidase	Processo metabólico de manose
Proteína 4 associada ao citoesqueleto	Q07065	Retículo endoplasmático	Ligação de RNA	Desconhecido
Occludina	Q16625	Membrana lisossômica/membrana plasmática	Ligação específica do domínio da proteína	Organização da junção célula-célula
Homólogo 8 da proteína cromobox	Q9HC52	Núcleo	Ligação de histonas metiladas	Regulação positiva do reparo do DNA
Peptidil-prolyl cis-trans isomerase FKBP4	Q02790	Núcleo/citoplasma/exossomo extracelular	Atividade da peptidil-prolyl cis-trans isomerase	Dobramento de proteínas mediado por chaperonas
Biliverdina redutase A	P53004	Citosol/exossomo extracelular	Atividade da biliverdina redutase (NAD(P)+)	Processo catabólico do heme
Proteína 1 do aparelho mitótico nuclear	Q14980	Núcleo/citoplasma	Ligação do complexo de dineína	Regulação da organização do fuso mitótico

Proteína 2 de bobina enrolada rica em arginina/serina	Q7L4I2	Desconhecido	Ligação de RNA	Desconhecido
Quinone oxidoreductase	Q08257	Citosol/exossomo extracelular	Atividade de NADPH:quinona reductase	Processo catabólico de xenobióticos
Proteína 3 com domínio PDZ e LIM	Q53GG5	Citosol/actina filamentosa	Ligação da actina	Organização do citoesqueleto de actina
Proteína D2 contendo o domínio EF-hand	Q96C19	Balsas de membrana	Ligação de íons de cálcio	Desconhecido
Proteína da subunidade ribossômica pequena eS7	P62081	Citosol/núcleo/citoplasma	Componente estrutural do ribossomo	Biogênese da subunidade pequena ribossômica
Homólogo de Pygopus 2	Q9BRQ0	Nucleoplasma	Ligação de histonas	Via de sinalização Wnt canônica
Alfa-L-fucosidase tecidual	P04066	Citoplasma	Atividade de alfa-L-fucosidase	Processo metabólico da glicose
Fator de iniciação de tradução eucariótica 5A-1	P63241	Citoplasma/núcleo	Atividade do fator de alongamento da tradução	Regulação positiva da via de sinalização apoptótica intrínseca pelo mediador da classe p53
Proteína 2 contendo o domínio MARVEL	Q8N4S9	Citoplasma/membrana plasmática apical	Desconhecido	Organização da junção célula-célula
Proteína 5 que contém o domínio da tiorredoxina	Q8NBS9	Retículo endoplasmático	Atividade da proteína dissulfeto reductase	Regulação negativa do processo apoptótico
Proteína protetora lisossômica	P10619	Lisossomo/retículo endoplasmático	Atividade de carboxypeptidase	regulação negativa da autofagia mediada por chaperonas
Proteína 11A contendo domínio CCCH de dedo de zinco	O75152	Nucleoplasma	Ligação de RNA	Exportação de mRNA poli(A)+ do núcleo
Proteína 3 que contém a bobina espiralada ácida transformadora Arf-GAP com coiled-coil, repetição ANK e proteína 1 contendo domínio PH	Q9Y6A5	Citoplasma/fuso mitótico	Desconhecido	Regulação da organização do fuso mitótico
	Q15027	Reciclagem da membrana do endossomo	Atividade ativadora de GTPase	Transporte de proteínas
Proteína 1 da membrana do Golgi	Q8NBJ4	Aparelho de Golgi/membranas plasmáticas	Desconhecido	regulação do processo metabólico de lipídios
Proteína da membrana do poro do envelope nuclear POM 121	Q96HA1	Núcleo/membrana do retículo endoplasmático	retículo endoplasmático Ligação à sequência de localização nuclear	Transporte nucleocitoplasmático
Proteína tipo Crk	P46109	Citosol/nucleoplasma	Ligação de RNA	Transdução de sinal intracelular
Proteína grande rica em prolina BAG6	P46379	Citoplasma/núcleo	Ligação do receptor de sinalização	Processo apoptótico
Subunidade reguladora não ATPase do proteassoma 26S 2	Q13200	Exossomo/núcleo extracelular	Atividade reguladora da enzima	Processo catabólico de proteína dependente de ubiquitina mediado por proteassoma

Proteína de interação com SEC23	Q9Y6Y8	Citoplasma/cytosol	Ligação de RNA	Transporte intracelular de proteínas
Citidina desaminase	P32320	Citosol/região extracelular	Atividade da citidina desaminase	Regulação negativa do processo metabólico de nucleotídeos
Mediador da subunidade 15 da transcrição da RNA polimerase II	Q96RN5	Núcleo/citoplasma	Atividade do coregulador de transcrição	Regulação positiva do início da transcrição RNA polimerase II
Homólogo da proteína scribble	Q14160	Plasma membrane/extracelular exosome/nucleoplasm	Atividade do adaptador de sinalização	Regulação positiva do processo apoptótico
Proteína de choque térmico 75 kDa, mitochondrial	Q12931	Mitocôndrias/nucleoplasma	Ligação do receptor do fator de necrose tumoral	Regulação negativa da via de sinalização apoptótica intrínseca em resposta ao H ₂ O ₂
Proteína 2 semelhante à AFG3	Q9Y4W6	Mitocôndrias	Atividade de metallopeptidase	Homeostase do íon cálcio mitochondrial
Subunidade beta-1 da laminina	P07942	Exossomo extracelular/lúmen do retículo endoplasmático	Componente estrutural da matriz extracelular	Diferenciação celular
Subunidade J do fator de iniciação de tradução eucariótica 3	O75822	Complexo citosol/fator de iniciação de tradução eucariótica 3	Atividade do fator de iniciação da tradução	Formação do complexo de iniciação da tradução citoplasmática
Enzima conjugadora de modificadores de dobras de ubiquitina 1	Q9Y3C8	Exossomo extracelular	Atividade da enzima de conjugação UFM1	Ufmilação de proteínas
Proteína semelhante ao cromodomínio Y	Q9Y232	Núcleo	Ligação de histonas metiladas	Espermatogênese
Proteína de ponto de controle mitótico BUB3	O43684	Nucleoplasma/cytosol	Ligação à ubiquitina	Sinalização do ponto de verificação da montagem do fuso mitótico
Cadeia de colágeno alfa-3(IV)	Q01955	Espaço extracelular/retículo endoplasmático	Atividade inibidora de metaloendopeptidase	Ativação da atividade da endopeptidase do tipo cisteína envolvida no processo apoptótico
Proteína semelhante ao Sm associada ao U6 snRNA LSm7	Q9UK45	Núcleo/cytosol	Ligação do snRNA U6	Splicing de mRNA, via spliceossomo
Subunidade de proteassoma alfa tipo 5	P28066	Citoplasma/exossomo extracelular/núcleo	Desconhecido	Processo catabólico de proteína dependente de ubiquitina mediado por proteassoma
Proteína 3 associada à RNA polimerase II	Q9H6T	Citosol	Desconhecido	Estabilização de proteínas

Tabela suplementar 2. Proteínas exclusivas do grupo tratado com PepGAT

Nome da proteína	Código Uniprot	Componente celular (CC)	Função molecular (MF)	Processo biológico (BP)
Aminopeptidase sensível à puomicina	P55786	Citoplasma/núcleo	Atividade de aminopeptidase	Processo catabólico de peptídeos
Glucose-6-fosfato 1-desidrogenase	P11413	Citoplasma/exossomo	Atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase	Resposta celular ao estresse oxidativo
Dipeptidil peptidase 3	Q9NY33	Citoplasma	Atividade de aminopeptidase	Processo catabólico de proteínas
S-formilglutathione hydrolase	P10768	Vesícula citoplasmática	Atividade de hidrolase, atuando em ligações de éster	Processo catabólico do formaldeído
Proteína NDRG1	Q92597	Exossomo extracelular/ núcleo	Ligação a pequenas GTPases	Resposta a danos no DNA
Exonuclease MYG1	Q9HB0	Núcleo/citoplasma	Atividade de nuclease	Comportamento de exploração locomotora
Timosina beta-4	P62328	Região extracelular/núcleo/citoplasma	Atividade de sequestro de proteínas	Sequestro de monômeros de actina
Proteína 1 contendo o motivo YLP	P49750	Núcleo	Ligação de RNA	Regulação da manutenção dos telômeros
Enzima conjugadora de ubiquitina E2 variante 2	Q15819	Exossomo extracelular/ núcleo/ citoplasma	Desconhecido	Regulação do reparo do DNA
Proteína semelhante a 4 associada a microtúbulos de equinodermos	Q9HC35	Citosol/citoesqueleto	Ligação de microtúbulos	Processo baseado em microtúbulos
Proteína 2 de ligação à proteína ativadora de GTPase Ras	Q9UN86	Citosol/complexo de ribonucleoproteína	Ligação de RNA	Transdução de sinal da proteína Ras
Proteína de ligação de ácido nucleico de dedo de zinco do tipo CCHC	P62633	Retículo endoplasmático/ ribossomo/cytosol	Atividade reguladora de tradução	Regulação positiva da transcrição contemplada pelo DNA
NEDD8	Q15843	Espaço extracelular/núcleo/cytosol	Ligação da proteína ubiquitina ligase	Processo catabólico de proteínas dependente de ubiquitina
Alfa-fetoproteína	P02771	Citoplasma/espaco extracelular	Ligação de íons metálicos	Processo metabólico da progesterone
Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, mitochondrial	P36957	Matriz mitocondrial/citosol/núcleo	Atividade de acyltransferase	Processo metabólico de succinil-CoA
Endonuclease de DNA (sítio apurínico ou apirimidínico)	P27695	Núcleolo/retículo endoplasmático/ribossomo	Atividade de endonuclease de DNA (sítio apurínico ou apirimidínico)	Reparo do DNA
Proteína 1 que contém o domínio Eps associado à RalBP1	Q96D71	Nucleoplasma/citosol/membrana intracelular	Ligação de íons de cálcio	Transporte endossômico

Subunidade reguladora 10 da fosfatase de proteína serina/treonina 1	Q96QC0	Núcleo	Ligação de RNA	Regulação negativa do ponto de verificação de danos ao DNA mitótico
Cistatina-B	P04080	Citoplasma/núcleo	Atividade inibidora de endopeptidase do tipo cisteína	Regulação negativa da atividade da peptidase
Ômega-amidase NIT2	Q9NQR4	Exossomo extracelular/centro organizador de microtúbulos	Atividade de ômega-amidase	Processo metabólico da glutamina
Proteína 2 ligada ao receptor do fator de crescimento	P62993	Núcleo/ membrana plasmática/ exossomo extracelular	Ligação idêntica de proteínas	Transdução de sinal em resposta a danos no DNA
Proteína de ligação ao heme 1	Q9NRV9	Citoplasma/região extracelular	Encadernação em heme	Ritmo circadiano
Proteína de ligação a RNA Nova-1	P51513	Núcleo/citoplasma	Ligação de mRNA específica da sequência	Regulação do splicing alternativo de mRNA, via spliceossomo
Epsina-2	O95208	Citosol/membrana plasmática/endossomo	Ligação de fosfolipídios	Endocitose
Homólogo da proteína 42 de controle da divisão celular	P60953	Exossomo extracelular/grânulo de ribonucleoproteína citoplasmática	Ligação de proteína quinase	Regulação positiva da migração celular
Proteína cromossômica não-histona HMG-14	P05114	Citoplasma/núcleo	Ligação ao DNA	Regulação positiva da transcrição e da elongação contempladas no DNA
Nucleobindina-2	P80303	Membrana plasmática/espaco extracelular/envelope nuclear	Ligação da subunidade alfa da proteína G	Transdução de sinal mediada por pequenas GTPases
Lamina-B2	Q03252	Filamento intermediário/lâmina nuclear	Componente estrutural do citoesqueleto	Organização do envelope nuclear
Proteína semelhante a CLL/linfoma de células B 9	Q86UU0	Núcleo/complexo beta-catenina-TCF/centro fibrillar	Ligação à beta-catenina	Regulação positiva da transcrição pela RNA polimerase II
Proteína 3 de ligação a elementos a montante	Q96I24	Citoplasma/núcleo	Ligação de RNA	Regulação positiva da transcrição pela RNA polimerase II
Proteína B3 do grupo de alta mobilidade	O15347	Citoplasma/núcleo	Ligação ao DNA	Recombinação de DNA
Endonuclease de retalho 1	P39748	Núcleo/mitocôndrio	Atividade de endonuclease de 5'-flap	Reparo do DNA
Proteína transportadora de esterol 2	P22307	Citosol/ retículo endoplasmático/ mitocôndria	Atividade de transferência de colesterol	Regulação positiva do processo metabólico de esteroides
Proteína quinase de serina/treonina PAK 1	Q13153	Nucleoplasma/citosol/membrana plasmática	Atividade da proteína serina/treonina quinase	Resposta a danos no DNA
Proteína do grupo de alta mobilidade HMGI-C	P52926	Núcleo	Atividade de endonuclease de DNA (sítio apurínico ou apirimidínico)	Regulação negativa do processo apoptótico

Proteína de ligação a RNA Raly	Q9UKM9	Núcleo	Ligação de RNA	Splicing de mRNA, via spliceossomo
Proteína 4B relacionada ao La MKI67 Fosfoproteína nucleolar que interage com o domínio FHA	Q92615	Citosol/ membrana/ nucléolo	Ligação de RNA	Regulação positiva da tradução
Coronina-1C	Q9BYG3	Nucléolo/citoplasma	Ligação de RNA	Processo metabólico do rRNA
Proteína 2 associada à ubiquitina	Q9ULV4	Citoesqueleto de actina	Ligação do filamento de actina	Transdução de sinais
	Q5T6F2	Núcleo/citoplasma	Ligação de RNA	Regulação da expressão gênica
Antiporter de nucleotídeo adenil mitocondrial SLC25A24	Q6NUK1	Membrana/mitocôndrio	Atividade do transportador transmembrana de nucleotídeos de adenine	Transporte mitocondrial
Proteína 2 que interage com o terminal da desoxinucleotidiltransferase	Q5QJE6	Processoma de nucléolo/subunidade pequena	Ligação de RNA	Processamento de RNA
Triagem da nexina-5	Q9Y5X3	Citosol/endossomo	Ligação à caderina	Regulação da macroautofagia
Endofilina-B2	Q9NR46	Nucleoplasma/ membrana/ citoplasma	Ligação à caderina	Organização da membrana
Proteína de ligação Myb 1A	Q9BQG0	Citoplasma/membrana/núcleo	Ligação de DNA específica da sequência	Via de sinalização apoptótica intrínseca mediada pela classe p53
Fator de emenda de processamento de pré-mRNA 8	Q6P2Q9	Etapas catalíticas 2 spliceossomo/ membrana/ núcleo	Ligação intrônica do pré-mRNA	Splicing de RNA, por meio de reações de transesterificação
Classificação da nexina-9	Q9Y5X1	Membrana da vesícula citoplasmática/citosol	Ligação idêntica de proteínas	Regulação positiva da proteólise do ectodomínio da proteína da membrana
Sintaxina-7	O15400	Exossomo extracelular/membrana lisossômica/membrana plasmática	Atividade inibidora do canal de cloreto	Regulação positiva da localização do receptor na sinapse
Proteína da subunidade ribossômica pequena eS28	P62857	Citoplasma/subunidade ribossômica pequena/nucléolo	Componente estrutural do ribossomo	Tradução/processamento de rRNA
NADH desidrogenase [ubiquinona] proteína 6 de ferro-enxofre, mitocondrial	O75380	Complexo I da cadeia respiratória mitocondrial/membrana interna mitocondrial	Atividade da NADH desidrogenase (ubiquinona)	Transporte de elétrons mitocondrial, NADH para ubiquinone
Proteína associada à translina x	Q99598	Núcleo/aparelho de Golgi/citosol	Ligação de RNA e DNA	Diferenciação celular
Proteína 2 relacionada à actina	P61160	Núcleo/citoplasma/citoesqueleto de actina	Componente estrutural do citoesqueleto	Nucleação de actina mediada pelo complexo Arp2/3
Macro histona central H2A.1	O75367	Núcleo/exossomo extracelular	Ligação do DNA à cromatina	Regulação da resposta ao estresse oxidativo
Homólogo de andaime de cluster de ferro-enxofre NFU1, mitochondrial	Q9UMS0	Núcleo/mitocôndrio/citosol	Ligação de 4 aglomerados de ferro e 4 de enxofre	Maturação de proteínas por transferência de cluster de ferro-enxofre

Importina-5	O00410	Poros nuclear/ Aparelho de Golgi/cytosol	Atividade do receptor de sinal de importação nuclear	Importação de proteínas para o núcleo
Fator de transcrição JunB	P17275	Núcleo	Ligação ao DNA	Regulação positiva da transcrição pela RNA polimerase II
Parceiro de Y14 e mago	Q9BRP8	Núcleolo/cytosol	Ligação de RNA	Processo catabólico de mRNA transcrito no núcleo, decaimento mediado por nonsense
Subunidade alfa da proteína 1 do complexo T	P17987	Exossomo extracelular/cromossomo/cytosol	Ligação da proteína ubiquitina ligase	Regulação positiva da localização do RNA da telomerase no corpo de Cajal
Proteína 1 contendo domínio de endonuclease	O94919	Membrana/região extracelular	Atividade de endonuclease	Resposta imune inata
Xaa-Pro dipeptidase	P12955	Exossomo extracelular	Atividade de prolina dipeptidase	Proteólise
Subunidade ativadora da RNA guanina-N7 metiltransferase	Q9BTL3	Núcleo	Atividade do ativador enzimático	Recrutamento da enzima de limitação do mRNA para o complexo da holoenzima da RNA polimerase II
Domínio UBX que contém uma ligação para o GLUT4	Q9BZE9	Membrana da vesícula/núcleo/citoplasma	Translocação do SLC2A4 (GLUT4) a membrana plasmática	Regulação positiva do processo de modificação de proteínas
Proteína da subunidade ribossômica grande uL15	P46776	Citoplasma, ribossomo citosólico	Componente estrutural do ribossomo	Tradução
Proteína de ligação 1 contendo domínio CAP-Gly	P30622	Microtúbulo/núcleo	Ligação de microtúbulos	Organização de microtúbulos
Adaptador SH3BGRL	O75368	Núcleo/citosol/membrana plasmática	Ligação ao domínio SH3	Processo catabólico de proteína dependente de ubiquitina mediado por proteassoma
Proteína 7 contendo o domínio SPRY	Q5W111	Desconhecido	Desconhecido	Desconhecido
Amino peptidase B	Q9H4A4	Exossomo extracelular/membrana plasmática	Atividade de metaloamino peptidase	Proteólise
Citocromo c oxidase subunidade 4 isoforma 1, mitochondrial	P13073	Membrana interna mitochondrial	Atividade da citocromo-c oxidase	Transporte de elétrons mitochondrial, citocromo c para oxigênio
N(G),N(G)-dimetilarginina dimetilaminohidrolase 1	O94760	Citosol/exossomo extracelular	Atividade da dimetilargininase	Processo catabólico da arginina

Farnesil pirofosfato sintase	P14324	Citosol/nucleoplasma	Ligação de RNA	Processo biossintético do colesterol
Prostaglandina redutase 1	Q14914	Citoplasma	Atividade da 2-alkenal redutase (NADP+)	Processo metabólico do leucotrieno B4
Trocador de sódio/cálcio 3	P57103	Mitocôndria/retículo endoplasmático/membrana plasmática	Atividade antiporte de cálcio:sódio	transporte transmembrana de íons de cálcio
Proteína do complexo do poro nuclear Nup98-Nup96	P52948	Envoltório nuclear/cytosol	Componente estrutural do poro nuclear	Importação de proteínas para o núcleo
Proteína 4 contendo o domínio SWIM do dedo de zinco	Q9H7M6	Complexo de ubiquitina ligase Cul2-RING	Ligação de íons de zinco	Complexo de ubiquitina ligase Cul2-RING
Proteína efetora Cdc42 4	Q9H3Q1	Citosol/citoesqueleto/membrana plasmática	Ligação de RNA	Regulação da forma da Célula
Fator de ligação de repetição telomérica 2	Q15554	Núcleo	Ligação de DNA telomérico de fita dupla	Regulação da manutenção dos telômeros
Redutase de peróxido dependente de tioredoxina, mitocondrial	P30048	Mitocôndria/citosol/membrana plasmática	Atividade da tioredoxina peroxidase	Regulação negativa do processo apoptótico
E3 ubiquitina-proteína ligase HUWE1	Q7Z6Z7	Citosol/mitocôndrias/núcleo	atividade da ubiquitina-proteína transferase	Regulação positiva da ubiquitinação de proteínas
Proteína eS1 da subunidade ribossômica pequena	P61247	Citosol/ribossomo/núcleo	Componente estrutural do ribossomo	Biogênese da subunidade pequena ribossômica
Subunidade gama-1 da laminina	P11047	Matriz extracelular	Componente estrutural da matriz extracelular	Migração celular
Proteína 1 de ligação ao fator de iniciação de tradução eucariótica 4E	Q13541	Citosol/núcleo	Ligação do fator de iniciação da tradução	Regulamentação da tradução
Coativador constitutivo da proteína 1 semelhante ao PPAR-gama	Q9NZB2	Núcleo/citosol/membrana plasmática	Ligação de RNA	Componente crítico da sinalização de sobrevivência induzida por estresse oxidativo
Proteína estável ao calor regulada por cálcio 1	Q9Y2V2	Citoplasma	Ligação do mRNA 3'-UTR	Transdução de sinal intracelular
NADH desidrogenase [ubiquinona] 1 subunidade 12 do subcomplexo alfa	Q9UI09	Membrana interna mitochondrial	Atividade da NADH desidrogenase (ubiquinona)	Transporte de elétrons acoplado à síntese de ATP mitochondrial
Antígeno B2 associado ao melanoma	O15479	Núcleo	Antígeno tumoral	Regulação negativa da transcrição pela RNA polimerase II
Argininosuccinato liase	P04424	Citosol	Atividade da argininosuccinato liase	Processo metabólico da arginina

Pequena proteína integral de membrana 20	Q8N5G0	Membrana interna mitochondrial	Ligação de proteínas	Montagem da citocromo c oxidase mitocondrial
Proteína da subunidade ribossômica grande eL38	P63173	Citosol/ribossomo	Componente estrutural do ribossomo	Tradução
Proteína 2 da deficiência de múltiplos fatores de coagulação	Q8NI22	Membrana da vesícula de transporte do RE para Golgi	Ligação de íons de cálcio	Transporte mediado por vesículas
Proteína 2B contendo domínio SH3 e PX	A1X283	Citoplasma/subossomo	Atividade ativadora da NADPH oxidase geradora de superóxido	Processo metabólico de superóxido
Proteína 1 que contém o domínio da descarboxilase dependente de pyridoxal	Q6P996	Aparelho de Golgi/órgão delimitado pela membrana intracelular	Ligação à caderina	Processo metabólico do ácido carboxílico
Proteína 7 de ligação a retinoides	Q96R05	Citosol/núcleo	Ligação ao retinol	Transporte de ácidos graxos
RNA helicase A dependente de ATP	Q08211	Citoplasma/núcleo	Atividade de helicase de RNA e DNA	Regulação positiva da replicação do DNA

Tabela suplementar 3. Proteínas sobrepostas entre o grupo de controle e o grupo tratado com PepGAT

Nome da proteína	Código Uniprot	Componente celular (CC)	Função molecular (FM)	Processo biológico (PB)	Fold Change
NADH desidrogenase [ubiquinona] 1 subunidade 7 do subcomplexo alfa	O95182	Mitocôndrias	Atividade da NADH desidrogenase (ubiquinona)	Respiração aeróbica/transporte de elétrons mitocondrial, NADH para ubiquinone	-6.70
Histona H2B tipo 1-K	O60814	Núcleo/espaco extracelular	Ligação ao DNA	Resposta imune humoral antimicrobiana mediada por peptídeo antimicrobiano	-5.06
NAD(P)H-hidrato epimerase	Q8NCW5	Exossomo extracelular	Atividade da NADHX epimerase	Processo metabólico de nucleotídeos de nicotinamide	-4.10
Lactoilglutationa liase	Q04760	Citoplasma/exossomo extracelular	Atividade da lactoilglutationa liase	Regulação negativa do processo apoptótico	-4.09
Proteína 2 de ligação ao ácido retinoico celular	P29373	Citoplasma/núcleo/espaco extracelular	Ligação a retinoides	Regulação da transcrição contemplada pelo DNA	-4.05
Membro A da família 32 da fosfoproteína nuclear rica em leucina ácida	P39687	Citoplasma/núcleo	Ligação de RNA	Transporte nucleocitoplasmático	-3.85
Proteína 3 semelhante à rica em ácido glutâmico com ligação ao domínio SH3	Q9H299	Citosol/exossomo extracelular	Desconhecido	Organização do citoesqueleto	-3.75
Proteína nuclear Ran de ligação a GTP	P62826	Citoplasma/exossomo extracelular/núcleo	Atividade de GTPase	Processo metabólico de GTP	-3.58
Glutationa S-transferase P	P09211	Citoplasma/espaco extracelular	Atividade da glutatona transferase	Processo metabólico da glutatona	-3.55
Cortactina de substrato Src	Q14247	Citoesqueleto/Citoplasma/adesão focal	Ligação à caderina	Regulação positiva da polimerização do filamento de actina	-3.50
Subunidade beta da peptidase de processamento mitochondrial	O75439	Mitocôndrias	Atividade de metaloendopeptidase	Processamento de proteínas envolvido no direcionamento de proteínas para a mitocôndria	-3.50
Gama-enolase	P09104	Exossomo extracelular/membrana	Atividade da fosfopiruvato hidratase	Processo glicolítico	-3.44
Proteína 2 contendo domínio de hélice enrolada e hélice enrolada	Q9Y6H1	Mitocôndrio/núcleo	Ligação de fator de transcrição de ligação ao DNA	Resposta celular ao estresse oxidativo	-3.35
Subunidade catalítica alfa da proteína fosfatase 3	Q08209	Cytoplasm/plasma membrane	Atividade da proteína serina/treonina fosfatase	Regulação positiva da migração celular	-3.16
Timosina beta-10	P63313	Citoplasma	Ligação do monômero de actina	Regulação da migração celular/sequestro de monômeros de actina	-3.15

Succinil-CoA:3-cetoácido coenzima A transferase 1, mitochondrial	P55809	Mitocôndrias	Atividade da succinil-CoA:3-oxo-ácido CoA-transferase	Processo metabólico do corpo cetônico celular	-3.14
Ribonucleoproteínas nucleares heterogêneas A2/B1	P22626	Citoplasma/núcleo	Ligação de RNA	Processamento primário de miRNA	-3.00
Ribonucleoproteína contendo o domínio SAP	P82979	Núcleo	Ligação de RNA	Exportação de mRNA do núcleo	-2.93
Glucose-6-fosfato isomerase	P06744	Exossomo extracelular/membrana	Atividade da isomerase de glicose-6-fosfato	Processo metabólico da glicose 6-fosfato	-2.67
Adenosil-homocisteinase	P23526	Exossomo extracelular	Atividade da adenosil-homocisteinase	Ciclo da S-adenosilmetionina	-2.66
Gama-sinucleína	O76070	Citoplasma/Exossomo extracelular	Ligação de íons cuprosos	Transmissão sináptica química	-2.63
D-dopacromo descarboxilase	P30046	Citoplasma/espaco extracelular	Atividade da dopacromo isomerase	Regulação positiva da produção do fator de necrose tumoral	-2.61
Aldeído desidrogenase, mitochondrial	P05091	Exossomo extracelular/mitocôndrio	Atividade da aldeído desidrogenase (NAD+)	Processo catabólico de aldeídos	-2.58
Proteína de ligação a ácidos graxos 5	Q01469	Citoplasma/exossomo extracelular/núcleo	Ligação de ácidos graxos	Transporte de ácidos graxos de cadeia longa	-2.57
Proteína Treacle	Q13428	Nucléolo	Ligação de RNA	Regulamentação da tradução	-2.56
Miotrofina	P58546	Complexo de proteínas de cobertura do citoplasma/núcleo/F-actina	Ligação de DNA específica da sequência	Regulação do fechamento do filamento de actina com extremidade farpada	-2.53
Anexina A5	P08758	Exossomo extracelular/adesão focal	Ligação de fosfolipídios dependente de cálcio	Regulação negativa do processo apoptótico	-2.49
Proteína eL29 da subunidade ribossômica grande	P47914	Citoplasma/membrana	Ligação de RNA	Tradução	-2.43
Proteína regulada positivamente pela hipóxia	Q9Y4L1	Exossomo extracelular/membrana	Ligação da chaperona de dobramento de proteínas	Resposta celular à hipóxia	-2.40
Alfa-enolase	P06733	Citoplasma/exossomo extracelular/núcleo	Atividade repressora de transcrição de ligação ao DNA, específica da RNA polimerase II	Regulação negativa da transcrição contemplada pelo DNA	-2.39

Fator 2N associado à proteína de ligação TATA	Q92804	Citoplasma/núcleo	Ligação de RNA	Estabilização de mRNA	-2.39
Tioredoxina, mitochondrial	Q99757	Mitocôndrio/nucleólo	Atividade da peptídeo-metionina (R)-S-óxido reductase	Homeostase redox celular	-2.39
Proteína 2 relacionada ao fator de crescimento derivado do hepatoma	Q7Z4V5	Núcleo	Ligação de histonas metiladas	Remodelagem da cromatina dependente de reparo do DNA	-2.38
Proteína 6A semelhante à actina	O96019	Núcleo	Atividade de coativador de transcrição	Regulação positiva da transcrição contemplada pelo DNA	-2.36
Membro B da família 32 da fosfoproteína nuclear rica em leucina ácida	Q92688	Citoplasma/exossomo extracelular/núcleo	Ligação de histonas	Ativação da atividade da endopeptidase do tipo cisteína envolvida no processo apoptótico	-2.34
Citrato sintase, mitochondrial	O75390	Matriz mitocondrial/núcleo	Atividade da citrato (Si) -sintase	Processo metabólico de carboidratos	-2.32
Proteína relacionada a MARCKS	P49006	Exossomo extracelular	Ligação do filamento de actina	Organização dos filamentos de actina	-2.27
Fosforibosilaminoimidazol carboxilase/fosforibosilaminoimidazol succinocarboxamida sintetase bifunctional	P22234	Citoplasma/exossomo extracelular	Atividade da fosforibosilaminoimidazolesuccinocarboxamida sintase	Processo biossintético de nucleobase de purina	-2.26
Protimosina alfa	P06454	Núcleo	Ligação de fator de transcrição de ligação ao DNA	Regulação negativa do processo apoptótico	-2.25
Proteína sigma 14-3-3	P31947	Citoplasma/exossomo extracelular	Atividade inibidora da proteína quinase C	Regulação negativa da atividade da proteína quinase	-2.22

Histona H1.4	P10412	Núcleo	Ligação da histona desacetilase	Condensação de cromossomos	-2.13
Leucotrieno A-4 hidrolase	P09960	Exossomo extracelular/núcleo	Atividade da hidrolase de leucotrieno-A4	Processo biossintético de leucotrienos	-2.11
Proteína da subunidade ribossômica pequena uS11	P62263	Citoplasma/membrana/núcléolo	Ligação de RNA	Biogênese da subunidade pequena ribossômica	-2.11
Fosfopentomutase	Q96G03	Citosol/exossomo extracelular	Atividade da fosfoglucomutase	Processo metabólico da glicose	-2.07
Glutathione redutase, mitochondrial	P00390	Exossomo extracelular/mitocôndrio	Atividade de transferência de elétrons	Resposta celular ao estresse oxidativo	-2.04
Subunidade 4 do complexo THO	Q86V81	Citoplasma/núcleo	Ligação de RNA	Exportação de RNA do núcleo	-2.02
Substrato de C-quinase rico em alanina miristoilada	P29966	Citoesqueleto de actina	Ligação de calmodulina	Organização dos filamentos de actina	-2.02
Proteína do complexo do poro nuclear Nup214	P35658	Lado citoplasmático do poro nuclear/envelope nuclear	Atividade do receptor de sinal de exportação nuclear	Transporte nucleocitoplasmático	-2.01
Proteína de migração nuclear nudC	Q9Y266	Citoplasma/fuso mitótico	Ligação à caderina	Alinhamento de cromossomos em metáfase mitótica	-1.92
Prolil endopeptidase	P48147	Citoplasma/membrana	Atividade de peptidase do tipo serina	Proteólise	-1.91
Ribonucleoproteína nuclear heterogênea L	P14866	Citoplasma/Exossomo extracelular/membrana/núcleo	Ligação de RNA	Regulação do splicing alternativo de mRNA, via spliceossomo	-1.91
Aconitate hydratase, mitochondrial	Q99798	Mitocôndrias	Atividade da hidrata de acônito	Geração de metabólitos precursores e energia	-1.89
Homólogo associado ao microtúbulo Jupiter	Q9UK76	Microtúbulo citoesqueleto	Desconhecido	Desconhecido	-1.88
Provável 28S rRNA (citosina-C(5))-metiltransferase	P46087	Núcleo	Atividade de ligação de RNA/rRNA (citosina-C5-)-metiltransferase	Processamento de rRNA	-1.88
Proteína 14-3-3 eta	Q04917	Exossomo extracelular/membrana plasmática	Atividade reguladora do canal de sódio	Regulação da atividade do transportador transmembrana de Na ⁺	-1.86
Proteína de ligação ao RNA 14	Q96PK6	Citoplasma/núcleo	Ligação de RNA	Regulação positiva da transcrição pela RNA polimerase II	-1.81

ATP sintase subunidade beta, mitocondrial	P06576	Membrana/mitocôndrio/núcleo	Atividade da ATP sintase de transporte de prótons	Processo biossintético de ATP	-1.81
Fator de transcrição associado ao Bcl-2 1	Q9NYF8	Núcleo	Ligação ao DNA	Resposta a danos no DNA	-1.79
Serpina B5	P36952	Citoplasma	Atividade inibidora de endopeptidase tipo serina	Regulação da proliferação de células epiteliais	-1.79
14-3-3 proteína theta	P27348	Citoplasma/exossomo extracelular/membrana	Ligação idêntica de proteínas	Regulação negativa da transcrição contemplada pelo DNA	-1.78
Caldesmon	Q05682	Citoesqueleto	Ligação à caderina	Montagem de feixes de filamentos de actina	-1.77
Subunidade beta-1 da importina	Q14974	Citoplasma/membrana/núcleo	Atividade do receptor de sinal de importação nuclear	Importação de RNA para o núcleo	-1.76
Fator regulador da adipogênese	Q15847	Exossomo/núcleo extracelular	Desconhecido	Regulação positiva da diferenciação de células adiposas	-1.74
Proteína semelhante à Ataxina-2	Q8WWM7	Grânulo de estresse citoplasmático/mancha nuclear	Ligação de RNA	Processo metabólico do mRNA	-1.73
NADH-citocromo b5 redutase 3	P00387	Complexo citoplasma/membrana/óxido nítrico sintase	Atividade da citocromo b5 redutase, atuando sobre NAD(P)H	Processo biossintético de óxido nítrico	-1.71
Fosfoglicerato quinase 1	P00558	Exossomo/membrana extracelular	Atividade da fosfoglicerato quinase	Resposta celular à hipóxia	-1.71
Proteína 2 relacionada à diidropirimidinase	Q16555	Citosol/exossomo extracelular/membrana plasmática	Atividade de diidropirimidinase	Endocitose	-1.70
Proteína multifuncional 1 que interage com o complexo da aminoacil tRNA sintase	Q12904	Citosol/membrana	Ligação ao tRNA	Regulação negativa da proliferação de células endoteliais	-1.70
Antígeno CD44	P16070	Exossomo extracelular/membrana plasmática	Ligação do ácido hialurônico	Regulação negativa do processo apoptótico	-1.69
Homólogo 2 associado ao microtúbulo Jupiter	Q9H910	Citoplasma/núcleo	Desconhecido	Regulação da sinalização mediada por cálcio	-1.69
Inositol-3-fosfato sintase 1	Q9NPH2	Citoplasma/citosol	Atividade da sintase de inositol-3-fosfato	Processo biossintético de inositol	-1.68

Proteína 14-3-3 beta/alfa	P31946	Citoplasma/exossomo extracelular/membrana	Atividade inibidora de proteína quinase	Regulação negativa da via de sinalização do receptor acoplado à proteína G	-1.67
14-3-3 proteína gama	P61981	Exossomo/membrana extracelular	Atividade inibidora da proteína quinase C	Regulação negativa da atividade da proteína quinase	-1.67
1-fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato fosfodiesterase beta-3	Q01970	Complexo contendo proteínas	Atividade da fosfatidilinositol fosfolipase C	Processo metabólico do fosfatidilinositol	-1.66
Copina-3	O75131	Citoplasma/núcleo	Atividade da proteína serina/treonina quinase	Regulação positiva da migração celular	-1.63
Proteína da subunidade ribossômica grande eL13	P26373	Subunidade ribossômica grande citosólica/núcleo	Componente estrutural do ribossomo	Tradução citoplasmática	-1.63
Proteína 3 relacionada à diidropirimidinase	Q14195	Citosol/actina filamentosa	Ligação de filamina	Montagem de feixes de filamentos de actina	-1.63
Peroxirredoxina-6	P30041	Citoplasma/núcleo	Atividade da glutathione peroxidase	Resposta ao estresse oxidativo	-1.62
Galectina-1	P09382	Matriz extracelular/citoplasma	Ligação de RNA	Processo apoptótico	-1.62
Proteína FAM3C	Q92520	Exossomo extracelular	Atividade de citocinas	Desconhecido	-1.61
Peroxirredoxina-4	Q13162	Exossomo extracelular/núcleo	Atividade de adaptador molecular	Fosforilação de I-kappaB	-1.60
Triosefosfato isomerase	P60174	Núcleo/exossomo extracelular	Atividade da isomerase de triose-fosfato	Processo biossintético do gliceraldeído-3-fosfato	-1.60
Proteína S100-A6	P06703	Citoplasma/exossomo extracelular/núcleo	Ligação de proteína dependente de cálcio	Regulação positiva da proliferação de fibroblastos	-1.59
Cadeia alfa-3 da tropomiosina	P06753	Citoesqueleto/exossomo extracelular	Ligação do filamento de actina	Organização dos filamentos de actina	-1.59
Fator de splicing, rico em prolina e glutamine	P23246	Núcleo/citosol	Ligação de DNA e ligação de RNA	Regulação positiva da via de sinalização apoptótica intrínseca induzida por estresse oxidativo	-1.58
Peptidil-prolil cis-trans isomerase A	P62937	Citoplasma/exossomo extracelular/núcleo	Atividade da peptidil-prolyl cis-trans isomerase	Processo apoptótico	-1.58

Septina-9	Q9UHD8	Citoplasma	Atividade de GTPase	Regulação positiva da montagem de cílios não móveis	-1.58
Fator inibitório da migração de macrófagos	P14174	Citoplasma/exossomo extracelular/região extracelular	Atividade de citocinas	Regulação negativa da quimiotaxia de macrófagos	-1.57
Proteína S100-A4	P26447	Região extracelular/núcleo	Ligação de RNA	Regulação positiva da transdução de sinal NF-kappaB canônico	-1.57
Proteína 2 de ligação a elementos a montante	Q92945	Membrana/núcleo	Ligação de RNA	Splicing de RNA	-1.57
Proteína 14-3-3 zeta/delta	P63104	Citosol/exossomo extracelular/núcleo	Ligação de resíduos de fosfoserina	Regulação negativa do processo apoptótico	-1.54
Proteína alfa semelhante à ERO1	Q96HE7	Retículo endoplasmático/espço extracelular/membrana	Atividade de oxidoreductase	Processo de modificação de proteínas	-1.53
Cofilina-1	P23528	Citoplasma/espço extracelular/núcleo	Ligação do filamento de actina	Organização do citoesqueleto	-1.53
Proteína da subunidade ribossômica grande uL4	P36578	Citoplasma/adesão focal/núcleo	Componente estrutural do ribossomo	Tradução citoplasmática	-1.53
Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, específica do testículo	O14556	Núcleo/cytosol	Atividade da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (NAD+) (fosforilação)	Regulação positiva do processo glicolítico	-1.51
Proteína de corpo multivesicular carregado 1a	Q9HD42	Exossomo extracelular/matriz nuclear/membrana plasmática	Atividade de metallopeptidase	Autofagia	-1.51
Proteína de ligação a octâmero que não contém domínio POU	Q15233	Membrana/núcleo	Ligação de RNA	Splicing de RNA	-1.51
Proteína de ancoragem da quinase A 12	Q02952	Adesão focal	Ligação da proteína quinase A	Regulação da sinalização da proteína quinase A	-1.50
Proteína 5 com domínio PDZ e LIM	Q96HC4	Junção de aderência	Ligação de caderina envolvida na adesão célula-célula	Crescimento celular envolvido no desenvolvimento de células musculares cardíacas	-1.49
Proteína transportadora de acila, mitochondrial	O14561	Mitocôndria	Ligação da subunidade ribossômica mitochondrial	Transporte de elétrons mitochondrial, NADH ubiqu	-1.48

Malato desidrogenase, citoplasmática	P40925	Citoplasma	Atividade da L-malato desidrogenase	Processo metabólico do NADH	-1.48
Transaldolase	P37837	Citoplasma/núcleo	Atividade de transaldolase	Metabolismo de carboidratos	-1.47
Proteína da subunidade ribossômica pequena uS17	P62280	Citoplasma/membrana/nucléolo	Componente estrutural do ribossomo	Biogênese da subunidade pequena ribossômica	-1.47
Domínio G-patch e proteína contendo motivos KOW	Q92917	Núcleo/complexo spliceossômico	Ligação de RNA	Splicing de mRNA, via spliceossomo	-1.45
Superóxido dismutase [Cu-Zn]	P00441	Citoplasma/núcleo	Atividade da superóxido dismutase	Processo metabólico de espécies reativas de oxigênio	-1.44
Proteína de ligação ao retinol 1	P09455	Gotículas de lipídios	Ligação ao all-trans-retinol	Homeostase lipídica	-1.44
Cofilina-2	Q9Y281	Exossomo extracelular	Ligação do filamento de actina	Despolimerização do filamento de actina	-1.43
Subunidade beta da proteína de capeamento de f-actina	P47756	Citoesqueleto de actina	Ligação da actina	Organização do citoesqueleto	-1.43
Glutamato bifuncional/prolina--tRNA ligase	P07814	Citoplasma/membrana	Atividade da glutamato-tRNA ligase	Aminoacilação de glutamyl-tRNA	-1.41
Ornitina aminotransferase mitochondrial	P04181	Matriz mitochondrial	Atividade da ornitina aminotransferase	Percepção visual	-1.41
Membro 10 da família 38 de transportadores de solute	Q9HBR0	Aparelho de Golgi/membranas	Atividade do transportador transmembrana de L-aminoácido	Transporte transmembrana de aminoácidos	-1.40
Proteína da subunidade ribossômica pequena eS12	P25398	Citoplasma/membrana	Componente estrutural do ribossomo	Biogênese da subunidade pequena ribossômica	-1.40
Proteína 2 reguladora do ciclo celular e do apoptose	Q8N163	Citoplasma/núcleo	Ligação do complexo da RNA polimerase II	Regulação negativa da via de sinalização apoptótica intrínseca em resposta a danos no DNA	-1.38
Proteína 1 associada à adenilil cyclase	Q01518	Adesão focal	Ligação da adenilato ciclase	Ativação da atividade da adenilato ciclase	-1.38

Tioredoxina redutase 1, citoplasmática	Q16881	Exossomo extracellular	Atividade da tioredoxina-dissulfeto redutase (NADPH)	Transdução de sinais	-1.37
Perilipina-3	O60664	Citoplasma/membrana	Ligação à caderina	Armazenamento de lipídios	-1.37
Proteína 7 da doença de Parkinson	Q99497	Citoplasma/mitocôndrias/núcleo	Ligação à quinase	Resposta celular ao estresse oxidativo	-1.36
Caseína ubíqua nuclear e substrato 1 da quinase dependente de ciclina U2 pequena	Q9H1E3	Citoplasma/núcleo	Ligação de DNA de fita dupla	Regulação do alongamento da fita de DNA	-1.34
ribonucleoproteína nuclear A'	P09661	Núcleo	Ligação de RNA	Montagem de pré-espliceossomos do tipo U2	-1.33
Histona H2AX	P16104	Exossomo/núcleo extracellular	Ligação de histonas	Resposta a danos no DNA	-1.33
Subunidade 2 da pré-foldina	Q9UHV9	Citoplasma/núcleo	Chaperona de dobramento de proteínas	Dobramento de proteínas	-1.33
Fator de iniciação de tradução eucariótica 6	P56537	Citoplasma/exossomo extracellular/núcleo	Ligação de ribossomos	Montagem do ribossomo citosólico	-1.33
Succinato--CoA ligase [formadora de GDP]	Q96199	Complexo de succinato-CoA ligase (formador de GDP)	Atividade da succinato-CoA ligaseformadora GDP	Processo catabólico de succinil-CoA	-1.32
Fator 1 relacionado à diferenciação endotelial	O60869	Citoplasma/núcleo	Ligação de DNA e RNA	Diferenciação de células endoteliais	-1.31
Dihidrolipoil desidrogenase, mitochondr	P09622	Mitocôndrio/núcleo	Atividade da dihidrolipoil desidrogenase	Processo biossintético de acetil-CoA partir piruvato	-1.30
Proteína 4L de choque térmico 70 kDa	O95757	Citosol/núcleo	Ligação de ATP	Dobramento de proteínas	-1.29
Adenina fosforibosiltransferase	P07741	Exossomo extracellular	Atividade da adenina fosforibosiltransferase	Ligação de AMP	-1.28
Proteína de matriz repetitiva serina/arginina 2	Q9UQ35	Núcleo	Ligação de RNA	Splicing de mRNA, via spliceossomo	-1.27
Proteína de ligação à calciclina	Q9HB71	Exossomo/núcleo extracellular	Atividade de homodimerização de proteínas	Desenvolvimento do coração	-1.27
Adenilato quinase 2, mitochondrial	P54819	Exossomo extracellular/citoplasma	Atividade da adenilato quinase	Interconversão de moléculas pequenas contendo nucleobase	-1.23

Proteína 1 de ligação a poli(rC)	Q15365	Citoplasma/membrana	Ligação de RNA	Replicação do genoma do RNA viral	-1.18
Ribonucleoproteína nuclear heterogênea H	P31943	Etapa catalítica 2 spliceossomo/núcleo	RNA binding	Regulação do splicing de RNA	-1.17
Fosfoproteína estimulada por vasodilatador	P50552	Citoesqueleto de actina	Ligação à caderina	Organização do citoesqueleto de actina	1.21
Fator de iniciação de tradução eucariótica 4H	Q15056	Complexo 4F do fator de iniciação da tradução eucariótica/membrana	Atividade do fator de tradução, ligação ao RNA	Regulação do início da tradução	1.22
Matrin-3	P43243	Membrana/membrana interna nuclear	Ligação de RNA	Regulação pós-transcricional da expressão gênica	1.24
Proteína relacionada a Ras Rab-1A	P62820	Retículo endoplasmático	Ligação à caderina	Autofagia	1.25
Tirosina--tRNA ligase, citoplasmática	P54577	Citoplasma/núcleo	Atividade da tirosina-tRNA ligase	Aminoacilação de tirosil-tRNA	1.25
Subunidade do complexo MICOS MIC60	Q16891	Membrana/mitocôndrio	Ligação de RNA	Organização da membrana mitocondrial	1.26
Catepsina B	P07858	Matriz extracelular	Atividade de peptidase	Regulação da apoptose	1.26
Proteína do retículo endoplasmático da homeostase do cálcio	Q8IWX8	Citoplasma/membrana	Ligação do transportador transmembrane	Regulação negativa da proliferação celular	1.27
C-1-tetrahidrofolato sintase, citoplasmática	P11586	Membrana/mitocôndrio extracelular	Atividade da ligase de formato-tetrahidrofolato	Processo biossintético de nucleotídeos de purina	1.29
Proteína 5 complementar de reparo de raios X	P13010	Núcleo/ribonucleoproteína	Atividade de hidrólise de ATP	Resposta a danos no DNA	1.29
Proteína 7 com domínio PDZ e LIM	Q9NR12	Junção de aderência	Ligação da actina	Endocitose mediada por receptors	1.30
Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	P04406	Núcleo/citoplasma	Ligação idêntica de proteínas	Resposta imune antimicrobiana por peptídeo antimicrobiano	1.31
Fator de emenda de ligação de poli(U) PUF60	Q9UHX1	Nucleoplasma	Ligação idêntica de proteínas	Splicing alternativo de mRNA, via spliceossomo	1.31
Proteína semelhante ao Sm associada U6 snRNA LSm5	Q9Y4Y9	Citoplasma/núcleo	Ligação de RNA	Catabolismo de mRNA	1.32

Proteína S100-A10	P60903	Membrana plasmática	Ligação do transportador transmembrane	Regulação positiva do reparo da membrana	1.32
Proteína A associada à proteína de membrana associada à vesícula	Q9P0L0	Retículo endoplasmático/Membrana de Golgi	Ligação à caderina	Transporte mediado pelo retículo endoplasmático para a vesícula de Golgi	1.33
Membro 2 da família 12 de transportadores de solute	P55011	Exossomo extracelular/vesícula extracelular/membrana plasmática	Atividade do simportador de sódio:potássio:cloreto	Importação de cátions inorgânicos através da membrana plasmática	1.33
Histona H2A tipo 1	P0C0S8	Núcleo extracelular	Ligação enzimática	Formação de heterocromatina	1.34
Peroxirredoxina-2	P32119	Citoplasma	Atividade antioxidante	Resposta celular ao estresse oxidativo	1.36
Proteína quinase rica em prolina-alanina relacionada a STE20/SPS1	Q9UEW8	Citoplasma/nucleoplasma	Atividade da proteína serina/treonina quinase	Transdução de sinal intracelular	1.36
Proteína de choque térmico de 10 kDa, mitochondrial	P61604	Membrana/mitocôndrio	Ligação de RNA	Ativação da atividade da endopeptidase do tipo cisteína envolvida no processo apoptótico	1.36
Pirfosfatase inorgânica	Q15181	Citoplasma/exossomo extracelular	Atividade de fosfatase de difosfato inorgânico	Processo metabólico de compostos contendo fosfato	1.39
Fosfoproteína 1 induzida por estresse	P31948	Aparelho de Golgi/núcleo	Ligação de RNA	Resposta celular à interleucina-7	1.40
Proteína 5 de morte celular programada	O14737	Citoplasma/exossomo extracelular/núcleo	Atividade ativadora da acetiltransferase	Regulação do processo apoptótico	1.41
Proteína 3 de interação com a polimerase delta	Q9BY77	Citoplasma	Ligação de RNA	Regulação positiva da tradução	1.43
Nucleoproteína TPR	P12270	Citoplasma/núcleo	Ligação da cromatina	Regulação da separação mitótica das cromátides irmãs	1.43
Proteína do complexo do poro nuclear Nup153	P49790	Membrana/poro nuclear	Componente estrutural do poro nuclear	Montagem do complexo do poro nuclear	1.44
Proteína associada ao CD2	Q9Y5K6	Citoesqueleto de actina	Componente estrutural do citoesqueleto	Organização dos filamentos de actina	1.46

Xaa-Pro aminopeptidase 1	Q9NQW7	Citosol/exossomo extracelular	Atividade de aminopeptidase	Regulação negativa da morte celular programada	1.48
Coativador transcricional p15 da RNA polimerase II ativada	P53999	Complexo regulador de transcrição	Atividade de coativador de transcrição	Regulação da transcrição pela RNA polimerase II	1.48
Proteína semelhante à beta-actina 2	Q562R1	Exossomo extracelular	Ligação de proteína quinase	Motilidade celular	1.49
Fator de iniciação de tradução eucariótica 4 γ -1	Q04637	Citoplasma/membrana/núcleo	Atividade do fator de iniciação da tradução	Regulação da resposta celular ao estresse	1.50
PC4 e proteína de interação com SFRS1	O75475	Citosol/núcleo	Ligação de RNA	Resposta ao estresse oxidativo	1.51
Plastina-3	P13797	Filamento de actina/citoplasma	Ligação do filamento de actina	Formação da rede de filamentos de actina	1.56
Proteína 1 do fator de alongamento transcrição A	P23193	Complexo do fator de transcrição TFIID	Ligação ao DNA	Transcrição contemplada pelo DNA	1.57
Ladinin-1	O00515	Exossomo extracelular	Ligação de caderina	Desconhecido	1.58
Proteína 1 de ligação à quinase contendo domínio SH3	Q96B97	Citoplasma	Ligação ao domínio SH3	Migração celular	1.59
Proteína de ligação à fosfatidiletanolamina 1	P30086	Exossomo extracelular	Ligação de proteína quinase	Regulação negativa da cascata de MAPK	1.64
Proteína 6 complementar de reparo de raios X	P12956	Membrana/núcleo	Atividade de hidrólise de ATP	Regulação positiva da atividade da proteína quinase	1.65
Proteína 1 de ligação à proteína ativadora de GTPase Ras	Q13283	Citoplasma/núcleo	Ligação de RNA	Transdução de sinal da proteína Ras	1.68
Interator 1 não convencional da pré-foldina RPB5	O94763	Citoplasma/núcleo	Ligação da cromatina	Regulação negativa da via de sinalização apoptótica intrínseca	1.70
Proteína semelhante ao ciclo de divisão celular 5	Q99459	Citoplasma/membrana/núcleo	Ligação ao DNA	Sinalização do ponto de controle de danos ao DNA	1.70
Queratina, citoesqueleto do tipo II 8	P05787	Citoplasma/núcleo	Ligação à proteína do andaime	Via de sinalização apoptótica extrínseca	1.72
Ribonucleoproteína nuclear heterogênea A/B	Q99729	Núcleo	Ligação de RNA	Modificação do mRNA	1.72

Drebrin	Q16643	Citoplasma	Ligação da actina	Sequestro citoplasmático de proteínas	1.72
Enzima conjugadora de SUMO UBC9	P63279	Citoplasma/núcleo	SUMO transferase activity	Regulação positiva da migração celular	1.74
Subunidade G do fator de iniciação de tradução eucariótica 3	O75821	Citoplasma	Ligação de RNA	Formação do complexo de iniciação da tradução citoplasmática	1.74
Proteína K de interação com a huntingtina	Q9NX55	Citoplasma/núcleo	Chaperona de dobramento de proteínas	Regulação negativa do processo apoptótico	1.77
Proteína de ligação de RNA de dedo de zinco	Q96KR1	Núcleo	Ligação de RNA	Desconhecido	1.79
Enzima conjugadora de ubiquitina E2 D3	P61077	Exossomo extracelular	Atividade de ubiquitina-proteína transferase	Catabolismo de proteína dependente de ubiquitina mediado por proteassoma	1.81
Subunidade do complexo de controle de qualidade do ribossomo TCF25	Q9BQ70	Complexo núcleo/RQC	Atividade de corepressor de transcrição	Regulação negativa da transcrição pela RNA polimerase II	1.81
Desoxicitidilato desaminase	P32321	Citoplasma	Atividade de N-glicosidase de desoxirribonucleosídeo 5'-monofosfato	Nucleoside salvage	1.83
Ribonucleoproteína Q nuclear heterogênea	O60506	Citosol/membrana/núcleo	Ligação de RNA	Processamento de RNA	1.83
Subunidade alfa da peptidase de processamento mitocondrial	Q10713	Complexo de peptidase de processamento mitocondrial	Atividade de metaloendopeptidase	Processamento de proteínas envolvido no direcionamento de proteínas para mitocôndria	1.86
Subunidade de 65 kDa do fator de splicing U2AF	P26368	Núcleo	Ligação de RNA	Regulação negativa do splicing de mRNA, via spliceossomo	1.87
Proteína 3 da membrana associada ao transportador de secreção	O14828	Exossomo extracelular	Ligação da proteína ubiquitina ligase	Transporte mediado por vesículas pós-Golgi	1.91
Uroporfirinogênio descarboxilase	P06132	Citosol/nucleoplasma	Catabolismo de compostos contendo porfirina	Metabolismo de compostos contendo porfirina	1.96
Proteína Lupus La	P05455	Citoplasma/núcleo	Ligação de RNA	Processo catabólico de mRNA de histona nuclear	1.98

Paladino	Q8WX93	Filamento de actina/núcleo	Ligação da alfa-actinina muscular	Organização do citoesqueleto	1.99
Transgelina-2	P37802	Exossomo extracelular	Ligação à caderina	Diferenciação de células epiteliais	2.02
Intensificador da proteína 4 de decapagem de mRNA	Q6P2E9	Citoplasma/núcleo	Desconhecido	Decapagem independente de deadenilação do mRNA transcrito no núcleo	2.05
Proteína semelhante ao Sm associada ao U6 snRNA LSm2	Q9Y333	Citoplasma/núcleo	Ligação de RNA	Splicing de mRNA, via spliceossomo	2.09
Subunidade 1 do complexo ativador do proteassoma	Q06323	Complexo de proteassoma	Atividade do ativador de endopeptidase	Regulação da transição G1/S do ciclo celular	2.15
Transcetolase	P29401	Exossomo/vesícula extracelular	Atividade da transcetolase	Processo biossintético do gliceraldeído-3-fosfato	2.18
Enzima conjugadora de ubiquitina E2 L3	P68036	Citoplasma/núcleo	Atividade de ubiquitina-proteína transferase	Regulação positiva da ubiquitinação de proteínas	2.22
Plastina-1	Q14651	Filamento de actina	Componente estrutural do citoesqueleto	Formação da rede de filamentos de actina	2.22
Subunidade delta da proteína 1 do complexo T	P50991	Complexo T contendo centrossomo/chaperonina	Chaperona de dobramento de proteínas	Dobramento de proteínas mediado por chaperonas	2.25
DNA (citosina-5)-metiltransferase 1	P26358	Núcleo	Atividade de DNA-metiltransferase	Manutenção da metilação do DNA cromossômico após a replicação do DNA	2.27
Proteína 2 que contém o domínio da isocorismatase	Q96AB3	Citoplasma/núcleo	Desconhecido	Desestabilização de proteínas	2.36
3-mercaptopiruvato sulfurtransferase	P25325	Exossomo extracelular	Atividade da 3-mercaptopiruvato sulfurtransferase	Resposta à substância tóxica	2.37
Proteína de ligação a RNA 12	Q9NTZ6	Nucleoplasma	Ligação de RNA	Regulação do splicing de RNA	2.74
Proteína PRRC2C	Q9Y520	Membranas	Ligação de RNA	Montagem de grânulos de estresse	2.79
Peptidil-prolyl cis-trans isomerase FKBP3	Q00688	Núcleo	Ligação de RNA	Desconhecido	2.82
Fator de alongamento 2	P13639	Citoplasma/exossomo extracelular/núcleo	Atividade do fator de alongamento da tradução	Alongamento da tradução	2.98

Subunidade 5A da citocromo c oxidase, mitocondrial	P20674	Membrana mitocondrial	Atividade da citocromo-c oxidase	Respiração celular	3.04
Co-chaperona Cdc37 da Hsp90	Q16543	Complexo de chaperona HSP90-CDC37	Ligação à quinase	Regulação da atividade da proteína serina/treonina quinase dependente de ciclina	3.20
Aspartato aminotransferase mitocondrial	P00505	Mitocôndrio/membrana plasmática	Atividade de ligação ao RNA/L-aspartato	Processo catabólico de aspartato	3.25
Proteína 1 associada à DAZ	Q96EP5	Complexo de ribonucleoproteína	Ligação de RNA	Regulação positiva do splicing de mRNA, via spliceossomo	3.48
Intensificador de homólogo rudimentar	P84090	Núcleo	Ligação de RNA	Processo metabólico de nucleosídeos de pirimidina	3.83
Adenosina desaminase específica de RNA de fita dupla	P55265	Citoplasma/membrana/núcleo	Atividade de adenosina desaminase de RNA de fita dupla	Edição de adenosina para inosine	4.15
Manosil-oligossacarídeo 1,2-alfa-manosidase IA	P33908	Vesícula citoplasmática	Atividade de mannosidase	Via ERAD	4.41
Provável E3 ubiquitina-proteína ligase IRF2BPL	Q9H1B7	Espaço extracelular/núcleo	Atividade da proteína ubiquitina ligase	Regulação negativa da transcrição pela RNA polimerase II	4.61
Proteína 1 de ligação a danos no DNA	Q16531	Citoplasma/núcleo	Ligação ao DNA	Resposta a danos no DNA	4.82
Homólogo de VTA1 da proteína vacuolar	Q9NP79	Exossomo/citosol extracelular	Desconhecido	Macroautofagia	5.76
Subunidade 2 da dinactina	Q13561	Complexo centrossomo/dinactina	Ligação de proteína quinase	Alinhamento de cromossomos em metáfase mitótica	8.42
Enzima conjugadora de ubiquitina E2 (independente de E3)	Q9C0C9	Núcleo	Atividade da ubiquitina-proteína transferase	Regulação positiva da via de sinalização BMP	38.18