



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS
NÚCLEO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS

FRANCISCO LAIO DE OLIVEIRA

ANÁLISE DE DESEMPENHO DOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS
ANTIMICROBIANOS *IN VITRO* E *IN SÍLICO* CONTRA A LINHAGEM
COLORRETAL HCT-116

FORTALEZA-CE

2024

FRANCISCO LAIO DE OLIVEIRA

ANÁLISE DE DESEMPENHO DOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS
ANTIMICROBIANOS *IN VITRO* E *IN SÍLICO* CONTRA A LINHAGEM
COLORRETAL HCT-116

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

Área de concentração: Oncologia

Orientadora: Prof. Dra. Raquel Carvalho Montenegro

Coorientador: Prof. Dr. Felipe Pantoja Mesquita

FORTALEZA

2024

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)

- D32a de Oliveira, Francisco Laio.
ANÁLISE DE DESEMPENHO DOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS ANTIMICROBIANOS IN VITRO E IN SÍLICO CONTRA A LINHAGEM COLORRETAL HCT-116 / Francisco Laio de Oliveira. – 2024.
95 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Fortaleza, 2024.
Orientação: Prof. Dr. Raquel Carvalho Montenegro.
Coorientação: Prof. Dr. Felipe Pantoja Mesquita.
1. Câncer de colón. 2. Câncer de colorretal. 3. Peptídeos sintéticos. 4. 5-Fluorouracil (5-FU). I. Título.

CDD 610

FRANCISCO LAIO DE OLIVEIRA

ANÁLISE DE DESEMPENHO DOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS
ANTIMICROBIANOS *IN VITRO* E *IN SÍLICO* CONTRA A LINHAGEM DE
COLORRETAL HCT-116

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

Área de concentração: Oncologia

Orientadora: Prof. Dra. Raquel Carvalho
Montenegro

Coorientador: Prof. Dr. Felipe Pantoja
Mesquita

Aprovado em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dra. Raquel Carvalho Montenegro (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof.^a Dra. Roberta Jeane Bezerra Jorge
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof.^a Dra. Marne Carvalho de Vasconcellos
Universidade Federal do Amazonas (UFAM)

AGRADECIMENTOS

Eu agradeço primeiramente minha família, em especial, aos meus pais, que investiram tempo e dedicação em mim. Espero que tenha valido apenas cada conquista nesse percurso até aqui, por sempre me apoiarem nas minhas decisões e estarem ao meu lado em todos os momentos, mesmo que isso significasse passar a semana fora de casa, e ao meu irmão por sempre pegar no meu pé, para melhorar meu desempenho profissional e pessoal, me tornando o homem que sou hoje.

Agradeço a minha orientadora professora Dra. Raquel Carvalho Montenegro e ao meu coorientador professor Dr. Felipe Pantoja Mesquita por me aceitarem nessa jornada, mesmo sem experiência previa na vida acadêmica como IC e por me ensinarem as técnicas e fundamentos para a pesquisa. Obrigado também por me conduzirem para um caminho de grande conhecimento e uma preparação para a vida toda.

Aos meus amigos do laboratório de Farmagen que me ajudaram nessa caminhada com muito entusiasmo e dedicação. Eu tenho muito a agradecer a cada um de vocês por tudo que fizeram por mim.

Agradeço ao meu segundo coorientador professor Dr. Pedro Filho Noronha de Souza por me ajudando nessa caminhada de mestrado e por ter me ensinado as técnicas de bioinformática, estas que serão muito úteis nas futuras jornadas.

Agradeço profundamente aos órgãos de fomento, como CAPES, FUNCAP e CNPq, bem como ao Núcleo de Pesquisa de Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM), por tornar possível a realização da minha pesquisa.

RESUMO

O câncer colorretal (CCR) representa um desafio significativo para a saúde pública em escala global, sendo o terceiro câncer mais prevalente no Brasil, excluindo os tumores de pele não melanoma. Devido à sua natureza assintomática nos estágios iniciais, o diagnóstico frequentemente ocorre em fases avançadas, limitando a possibilidade de intervenção cirúrgica curativa e necessitando de tratamentos alternativos, como a quimioterapia. No entanto, os agentes quimioterápicos tradicionais, como o Fluorouracil (5-FU), podem induzir efeitos adversos consideráveis nos pacientes, destacando a urgência de desenvolver compostos citotóxicos que minimizem os danos ao organismo.

Os peptídeos sintéticos estão se destacando como uma alternativa promissora devido à sua capacidade de serem modificados sem perderem suas funcionalidades. Isso permite a remoção de resíduos de aminoácidos associados à toxicidade. Nesse contexto, o presente estudo visa avaliar *in vitro* e *in silico*, o potencial efeito citotóxico de dois peptídeos sintéticos, denominados PepGAT e PepKAA, como agentes quimioterápicos contra a linhagem celular HCT-116.

Os ensaios de invasão celular realizados demonstraram uma redução significativa de 70% e 75% no potencial invasivo das células tratadas com os peptídeos PepGAT e PepKAA, respectivamente. O provável mecanismo de ação desses peptídeos está associado à interação com a membrana celular, como evidenciado pela análise da viabilidade da membrana e da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), indicando irregularidades na membrana e aumento de ROS nas células tratadas com os peptídeos.

Além disso, observou-se que os peptídeos interferem no ciclo celular, resultando em uma redução na fase S e um aumento na fase-G2/M, que pode indicar interrupção da formação do fuso mitótico e na fase Sub-G1, indicativos de fragmentação do DNA que levam a morte celular, confirmada pela ativação das caspases 3 e 7. Análises *in silico* sugeriram que os peptídeos sintéticos podem interagir com a proteína KRAS, causando distorções conformacionais na sua estrutura tridimensional e comprometendo sua função.

Os resultados obtidos indicam que os peptídeos PepGAT e PepKAA apresentam um potencial terapêutico promissor contra o CCR, demonstrando seletividade para

células tumorais sem causar danos às células normais. Essas descobertas destacam a importância desses peptídeos como candidatos a agentes citotóxicos que merecem investigações adicionais para sua aplicação clínica.

Palavras-chave: Câncer de colón. Câncer de colorretal. Peptídeos sintéticos. 5-Fluorouracil (5-FU)

ABSTRACT

Colorectal cancer (CRC) represents a significant public health challenge on a global scale, being the third most prevalent cancer in Brazil, excluding non-melanoma skin tumors. Due to its asymptomatic nature in the early stages, diagnosis often occurs in advanced stages, limiting the possibility of curative surgical intervention and requiring alternative treatments, such as chemotherapy. However, traditional chemotherapy agents, such as Fluorouracil (5-FU), can induce considerable adverse effects in patients, highlighting the urgency of developing cytotoxic compounds that minimize damage to the body.

Synthetic peptides are emerging as a promising alternative due to their ability to be modified without losing their functionality. This allows for the removal of amino acid residues associated with toxicity. In this context, the present study aims to evaluate *in vitro* and *in silico*, the potential cytotoxic effect of two synthetic peptides, called PepGAT and PepKAA, as chemotherapeutic agents against the HCT-116 cell line.

The cell invasion assays performed found a significant reduction of 70% and 75% in the invasive potential of cells treated with PepGAT and PepKAA peptides, respectively. The likely mechanism of action of these peptides is associated with interaction with the cell membrane, as evidenced by analysis of membrane prediction and generation of reactive oxygen species (ROS), decreased membrane irregularities and increased ROS in subordinate cells with the peptides.

Furthermore, it was observed that the peptides interfere with the cell cycle, resulting in a reduction in the S phase and an increase in the G2/M phase, which may indicate interruption of the formation of the mitotic spindle, and in the Sub-G1 phase, indicative of fragmentation of DNA that lead to cell death, confirmed by the activation of caspases 3 and 7. *In silico* analyzes suggested that synthetic peptides can interact with the KRAS protein, causing conformational distortions in its three-dimensional structure and compromising its function.

The results obtained demonstrate that the PepGAT and PepKAA peptides show potential therapeutic promise against CRC, demonstrating selectivity for tumor cells without causing damage to normal cells. These findings highlight the importance of these peptides as candidate cytotoxic agents that deserve further investigation for their clinical application.

Keywords: Colon cancer. Colorectal cancer. Synthetic peptides. 5-Fluorouracil (5-FU)

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Introdução

Figura 1 – Estágio do câncer.....	18
Figura 2 – Gene KRAS, principais mutações ocorrem nos códons 12, 13 e 61.....	19
Figura 3 – Anatomia do intestino grosso e reto, e pólipos no intestino grosso.....	20
Figura 4 – Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2023 por sexo, exceto pele não melanoma.....	23
Figura 5 – Fatores de risco para o câncer de colorretal.....	25
Figura 6 – Estrutura do uracil e 5-fluorouracil (5-FU)	28
Figura 7 – Metabolismo 5-fluorouracil (5-FU)	30
Figura 8 – Modos de permeabilização da membrana lipídica por peptídeos.....	35

Capítulo 1

Figure 1 – Cell viability assay was performed to evaluate the viability against five cell lines.....	66
Figure 2 – Cell cycle distribution of HCT-116 cells after treatment with PepGAT and PepKAA.....	68
Figure 3 – Cell death determination of HCT-116 cells after treatment with PepGAT and PepKAA.....	69
Figure 4 – (A) caspase 3/7-mediated (CellEvent™ Caspase-3/7 Detection Reagent) apoptosis and (B) ROS (DCFH-DA dye)	70
Figure 5 – SEM analysis of HCT-116 cells after treatment with PepGAT and PepKAA at IC50 and 5-FU at IC50.....	71
Figure 6 – (A) membrane permeabilization analysis by PI uptake assay and (B) membrane pore formation analysis by uptake of a 6-kDa Dextran-FITC in HCT-116 cells.....	72

Figure 7 – Cell invasion after treatment with PepGAT and PepKAA at IC50 and 5-FU (23 nM) for 24h.....	73
Figure 8 – Molecular docking assay of PepGAT and PepKAA against the KRAS protein from CRC.....	74

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1 – IC 50 dos peptídeos e do 5-FU.....	67
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGP-01	Células tumorais de adenocarcinoma gástrico
AMPs	Peptídeos antimicrobianos
ANOVA	Análise de variação
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CCR	Câncer de colorretal
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CO₂	Dióxido de carbono
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EMT	Transdiferenciação epitelial para mesenquima
FBS	Fetal bovine serum
FdUMP	Monofosfato fluorodesoxiuridina
FdUTP	Trifosfato fluordesoxiurina
FUNCAP	Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico
FUTP	Trifosfato fluorouridina
HaCaT	Células queratinócitos normais humanos
HCT-116	Células tumorais de adenocarcinoma colorretal
IC₅₀	Concentração inibitória em 50% de atividade celular
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IR	Ionizing radiation
KRAS	Sarcoma de Kirsten Rato
MCF7	Células tumorais de adenocarcinoma pulmão
MD	Molecular docking
MEC	Matriz extracelular
MRC5	Células fibroblásticas não malignas
NAG	N-acetil-D-glicosamina
OMS	Organização Mundial da Saúde
PET	Positron-emission tomography
PI	Propidium iodide

PSOF	Pesquisa de sangue oculto nas fezes
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SAMPs	Peptídeos antimicrobianos sintéticos
SEM	Scanning electron microscopy
SKMEL19	Células tumorais de adenocarcinoma pele
SOF	Sangue oculto nas fezes
TS	Timidilato sintase

SUMÁRIO

Introdução	15
1. Referencial teórico.....	16
1.1 Câncer.....	16
1.2 Câncer de colorretal.....	20
1.2.1 Epidemiologia do CCR.....	22
1.2.2 Sintomas e diagnóstico.....	23
1.2.3 Fatores de risco.....	24
1.2.4 Tratamento.....	26
1.2.4.1 5-Fluorouracil.....	28
1.3 Peptídeos.....	31
1.3.1 Peptídeos naturais.....	31
1.3.2 Peptídeos sintéticos.....	32
1.3.3 Mecanismos de ação.....	34
2. Objetivo.....	37
2.1 Objetivo geral.....	37
2.2 Objetivos específicos.....	37
3. Metodologia	38
3.1 Cultivo celular.....	38
3.2 Avaliação da Citotoxicidade.....	38
3.3 Análise do ciclo celular.....	39
3.4 Avaliação da integridade de membrana.....	39
3.5 Acúmulo de ROS.....	40
3.6 Análise de Apoptose.....	40
3.7 Ensaio de Invasão celular.....	41
3.8 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	42
3.9 Obtenção de estruturas 3D.....	42
3.10 Ensaio de acoplamento molecular (MD).....	43
3.11 Análise estatística.....	43
Referências	44
Capítulo 1	55
1. Introduction.....	58
2. Methodology.....	59
2.1. Cell culture.....	59
2.2. Cytotoxicity by Almar Blue assay.....	60
2.3. Cell cycle analysis.....	60
2.4. Apoptosis analysis.....	61
2.5. Fluorescence microscopy.....	61
2.6. Invasion assay.....	61
2.7. Cell membrane integrity assay.....	62
2.8. ROS overproduction and apoptosis induction.....	62
2.9. Scanning electron microscopy (SEM).....	63
2.10. 3D structures obtention.....	64

2.11. Molecular docking (MD) assays.....	64
2.12. Statistical analysis.....	65
3. Results	66
3.1. Synthetic peptides display cytotoxic against colorectal cancer cell line.....	66
3.2. Induction of cell cycle arrest on HCT-116 cells by PepGAT and PepKAA.....	67
3.3. PepGAT and PepKAA with and without 5-FU induces caspase 3 and 7 and activates the apoptosis pathway in HCT-116 by promoting ROS overproduction.....	68
3.4. PepGAT and PepKAA induce morphological changes and damage in the membrane of HCT-116 cells.....	70
3.5. PepGAT and PepKAA inhibit invasion in HCT-116 cell lines.....	72
3.6. Molecular docking analysis.....	73
DISCUSSION	75
REFERENCE	85
CONCLUSÃO	93

Introdução

Referencial teórico

Francisco Laio de Oliveira

1. Referencial teórico

1.1 Câncer

O câncer é um desafio significativo para a saúde pública em todo o mundo, sendo uma das principais causas de morte e um obstáculo importante para o aumento da expectativa de vida global. Em diversos países, o câncer é uma das principais causas de morte prematura, ocorrendo antes dos 70 anos de idade, ocupando frequentemente a primeira ou segunda posição nesse cenário. Essa realidade destaca o grande impacto do câncer na sociedade, ressaltando a urgência de implementar estratégias eficazes de prevenção, detecção prévia e tratamento. Combater a neoplasia é fundamental não apenas para melhorar a qualidade de vida das pessoas, mas também para alcançar progressos significativos na saúde pública global (INCA., 2022; SUNG et al., 2021).

O processo de envelhecimento, acompanhado de mudanças no comportamento e no ambiente, como alterações estruturais, tem um efeito importante na mobilidade, atividades recreativas, dieta e exposição a poluentes ambientais. Essas mudanças favorecem o aumento da incidência e mortalidade por câncer. O envelhecimento populacional, frequentemente associado a hábitos de vida prejudiciais e exposição prolongada a fatores de risco ambientais, contribui para o desenvolvimento e progressão de vários tipos de tumores malignos (WILD; WEIDERPASS; STEWART, 2020).

A homeostase celular, caracterizada pelo equilíbrio dinâmico entre a proliferação celular e a apoptose, é vital para a saúde do organismo. A oncogênese tem sua origem na instauração de alterações genéticas em células, resultando na perda da capacidade de submissão à morte celular programada. Estas mutações comprometem as vias regulatórias normais, conferindo às células um fenótipo defectivo. As mutações no DNA são transmitidas durante as divisões celulares subsequentes, perpetuando as anormalidades genéticas. Esse desequilíbrio entre proliferação celular descontrolada e morte celular, causado por essas alterações, leva ao acúmulo de células defeituosas, um evento fundamental na patogênese do câncer (WILD; WEIDERPASS; STEWART, 2020; NCI, 2023).

O câncer é uma doença caracterizada pelo crescimento descontrolado e desordenado das células, comprometendo os tecidos (INCA 2022); dependendo do

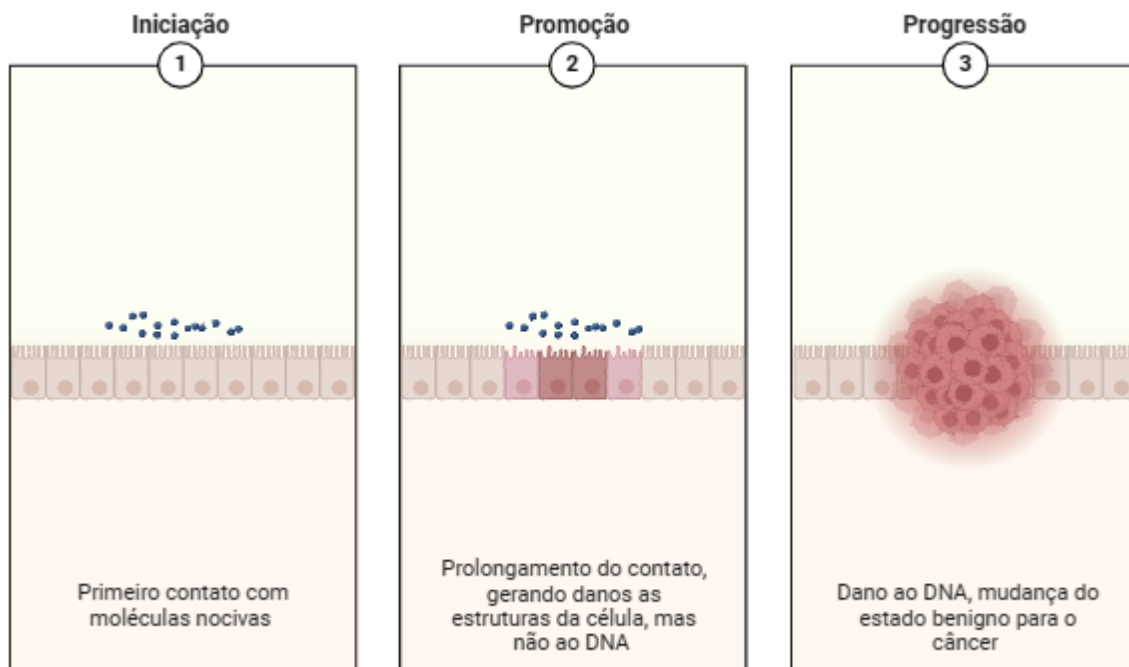
tipo de tecido onde o crescimento ocorre, o câncer pode ser classificado de diferentes maneiras. Quando o crescimento se origina nos tecidos epiteliais, como a pele, é chamado de carcinoma; se ocorrer nos tecidos conjuntivos, como músculo ou osso, é chamado de sarcoma; se derivar do tecido do sistema hematopoiético, como as células do sistema adaptativo, é denominado leucemia ou linfoma; e quando surge no cérebro ou na medula espinhal, é conhecido como tumor do sistema nervoso central (GUPTA; DWIVEDI, 2017; HASSANPOUR; DEHGhani, 2017).

A mudança de uma célula normal para uma célula cancerígena é um processo gradual, caracterizado por estágios distintos, incluindo iniciação, promoção e progressão. Essa transição ocorre ao longo do tempo (INCA 2022; LIU et al., 2015). No estágio inicial, chamado de iniciação, ocorre o primeiro contato entre o composto iniciador (moléculas cancerígenas ou carcinogênicos) e o microambiente celular, resultando em alterações em alguns genes que não são reparados. Quanto maior o tempo de exposição à substância cancerígena, maior é a probabilidade de desenvolver oncogênese (IRIGARAY; BELPOMME, 2010; INCA, 2011).

No estágio de promoção, o segundo estágio, ocorre após as células já terem iniciado a mutação. Nesse estágio, o promotor (agente mitogênico) necessita de um longo tempo de exposição ao microambiente para alterar as vias de sinalização, acelerando a proliferação celular sem afetar diretamente o DNA. Os agentes promotores não são capazes de formar o tumor por si só; em vez disso, eles amplificam as lesões das células já iniciadas, promovendo a geração de células malignas. No entanto, interromper a exposição ao promotor pode suspender o processo nesse estágio (KLAUNIG; KAMENDULIS; XU, 2000; INCA, 2011).

No estágio final, conhecido como progressão da carcinogênese, ocorrem danos permanentes no DNA e várias transformações na célula. Ela passa de um estado normal (benigno) para um estado maligno. Nessa etapa, ocorrem mudanças no genótipo celular que são irreversíveis e uma taxa exacerbada de proliferação descontrolada. Isso confere ao tumor a capacidade de invadir tecidos adjacentes, o que pode levar ao processo de metástase. Além disso, as inúmeras mutações provocam alterações bioquímicas e morfológicas (OLIVEIRA et al., 2007; MAREEL & LEROY, 2003; INCA, 2011).

Figura 1 -Estágio do câncer.



Fonte: Produção própria do autor (www.biorender.com).

No câncer, as alterações genéticas podem ser adquiridas ou hereditárias, sendo a primeira a mais comum. Essas mudanças ocorrem devido à exposição a vários fatores químicos, físicos ou biológicos, que podem estar relacionados ou não ao estilo de vida e aos hábitos da pessoa, como consumo de álcool, tabagismo e outros (INCA, 2020). A exposição prolongada favorece o acúmulo de danos e alterações no processo de replicação do DNA, resultando em mutações irreversíveis. Isso pode levar à ativação de oncogenes e à inativação de genes de reparo de DNA e/ou supressores de tumores. Os proto-oncogenes desempenham diversas funções relacionadas ao crescimento e desenvolvimento celular. Quando sofrem alterações no DNA, tornam-se oncogenes, levando a um aumento da proliferação celular e outras alterações (ABBAS et al., 2010; NCI, 2023).

Alguns desses genes são responsáveis por sobrevivência celular, capacidade de invasão, morte celular e proliferação celular. Esses genes são cuidadosamente regulados para evitar a proliferação celular descontrolada (Bertram, 2020; WANG et al., 2018). Entre esses genes o KRAS desempenha um

papel crucial como regulador nas vias de transdução de sinal celular, especialmente nas vias de sinalização PI3K-Akt e RAS-RAF-MAPK. Essas vias são essenciais para a regulação da proliferação celular, coordenando uma série de eventos moleculares que orientam o crescimento e a divisão celular. O KRAS atua como um interruptor molecular, desempenhando um papel-chave na ativação dessas vias de sinalização e influenciando a resposta celular a estímulos externos. Sua regulação adequada é crucial para manter a homeostase celular e prevenir o desenvolvimento descontrolado de processos proliferativos, que podem estar associados a condições patológicas, incluindo o câncer (YOSHIZAWA et al., 2017; KOLCH., 2000).

Figura 2: Domínio G do gene KRAS, principais mutações ocorrem nos códons 12, 13, 61 e 146, as marcas azuis sinalizam os pontos de “P loop”, “switch 1” e “switch 2”, onde a mutação dos códons 12 e 13 ocorrem no “ciclo P” e a mutação do códon 61 ocorre no “interruptor 2” do domínio G e a marca em rosa indica a região de hipervariável.



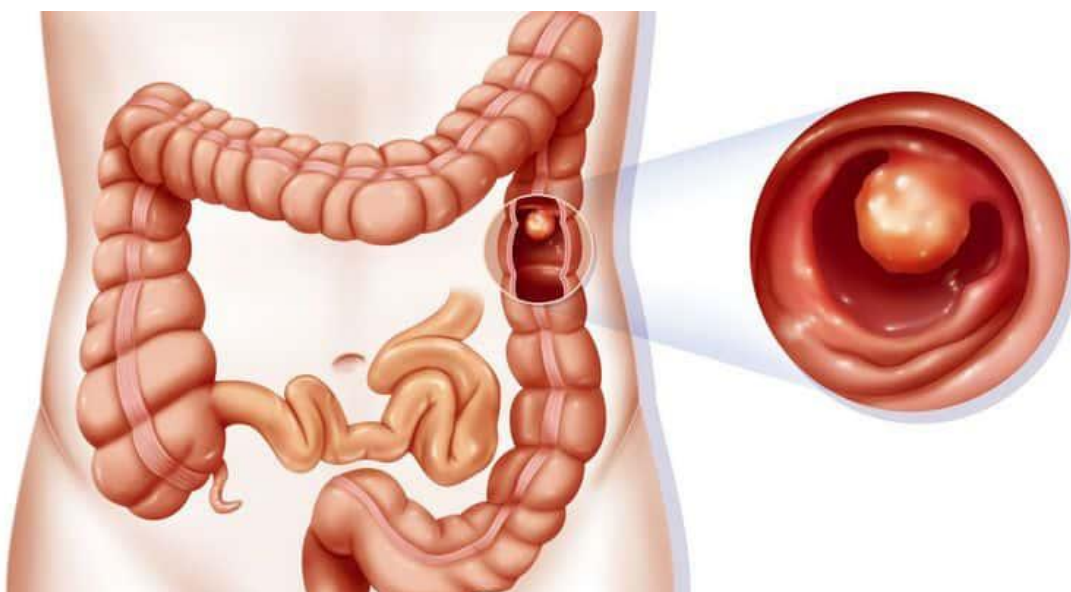
Fonte: adaptado de Wicki (2010).

As mutações que ocorrem nos códons 12, 13 ou 61 do gene *RAS* têm um impacto significativo nas vias de sinalização intracelular. Essas alterações genéticas resultam na produção de proteínas RAS constitutivamente ativas. Essas proteínas RAS ativadas continuamente traduzem sinais provenientes de proteínas tirosina quinases, que estão envolvidas em vias de sinalização intracelular, como a via PI3K-Akt e RAS-RAF-MAPK. O efeito dessa estimulação persistente é a promoção do crescimento celular contínuo. Células que possuem essas mutações tornam-se propensas a um estado de proliferação descontrolada, aumentando assim a suscetibilidade ao desenvolvimento de câncer. O crescimento celular contínuo e desregulado é uma característica fundamental nos processos cancerígenos, sendo as mutações no gene *RAS* frequentemente associadas ao câncer Colorretal (CCR) (CROCE., 2008; CHU et al., 2018; TSUNODA et al., 2010).

1.2 Câncer de Colorretal

O câncer de cólon e reto, também conhecido como câncer colorretal (CCR), surge do crescimento anormal das células do revestimento interno do intestino grosso e do reto, chamado de mucosa. Essas células podem se proliferar, formando pólipos (SUNG et al., 2021), dos quais 50% estão localizados no reto e 30% no ceco (INCA, 2021). Esses pólipos são responsáveis por aproximadamente 85% a 90% dos casos esporádicos de câncer colorretal (KEUM; GIOVANNUCCI, 2019).

Figura 3 – Anatomia do intestino grosso e reto, e pólipo no intestino grosso.



Fonte: Ilustrasi Polip di Kolon (Credit: BSIP SA / Alamy Stock Photo).

O CCR é uma doença com diferentes manifestações clínicas, morfológicas e moleculares, composta principalmente por tumores esporádicos que se desenvolvem ao longo de duas vias moleculares distintas: a via adenoma-carcinoma convencional, ou instabilidade cromossômica, e a via serrilhada (WILD; WEIDERPASS; STEWART, 2020; MATHEWS; DRAGANOV; YANG, 2021). Essas vias contribuem, respectivamente, com aproximadamente 70-75% e 25-30% dos casos de câncer colorretal esporádico.

A via adenoma-carcinoma, responsável pela maioria dos casos, é um processo comum na progressão do câncer colorretal. No entanto, é relevante notar que a transformação maligna não ocorre imediatamente nos adenomas, pois a

progressão do adenoma para carcinoma é um processo complexo e envolve múltiplos estágios de mutações genéticas que alteram o funcionamento normal das células. Esse processo evolutivo, que pode se estender por mais de duas décadas, culmina na progressão para adenocarcinoma. (WILD; WEIDERPASS; STEWART, 2020; BONNINGTON; RUTTER, 2016; KEUM; GIOVANNUCCI, 2019).

A segunda via de formação do câncer colorretal é chamada serrilhada, devido à presença de vários pólipos serrilhados com lesões precursoras. Essa via representa cerca de 25% a 30% dos cânceres colorretal. Embora menos comum que a via do adenoma, sua manifestação tende a ser mais agressiva e os tumores crescem mais rapidamente, levando aproximadamente uma década para se desenvolverem, crescerem e se transformarem em tumores cancerígenos. Isso pode dificultar o diagnóstico precoce (INCA 2021).

Estima-se que 90% dos casos globais de câncer colorretal ocorram após os 50 anos de idade, com uma significativa elevação a partir dos 60 anos (SIEGEL et al., 2021). Cerca de 16% a 41% das pessoas acima de 50 anos apresentam pólipos, sendo a maioria deles benignos, porém, essas pessoas têm duas a três vezes mais chances de desenvolver câncer, uma vez que os pólipos estão associados a mutações genéticas (CHAO et al., 2000). Durante o crescimento dos pólipos, ocorrem erosões e pequenos sangramentos, e quanto maior o pólipo, maior é a chance de se tornar maligno (BONNINGTON, RUTTER, 2016; BURNETT-HARTMAN et al., 2014).

As alterações moleculares e genéticas também são consideradas componentes importantes no desenvolvimento do câncer colorretal (ARNOLD et al., 2017; SAWICKI et al., 2021; SIEGEL et al., 2022). Com relação ao perfil molecular do câncer colorretal, a classificação mais comumente utilizada foi proposta pela Consensus Molecular Subtype (CMS), que categoriza os tumores em quatro subtipos: CMS1 (MSI-imune), CMS2 (canônico), CMS3 (metabólico) e CMS4 (mesenquimal) (GUINNEY et al., 2015). Embora seja um fator prognóstico, alguns casos apresentam parâmetros comuns a mais de um subtipo, devido à alta heterogeneidade tumoral. Paralelamente, um grupo de pesquisadores usou o modelo de Patient-Derived Xenografts (PDX) para identificar subtipos intrínsecos do câncer colorretal (CRIS - Colorectal Cancer Intrinsic Subtypes). Eles identificaram 5 subtipos moleculares: CRIS-A (tumores mucinosos, com ativação de vias

glicolíticas, MSI ou mutações em KRAS), CRIS-B (ativação da via do TGF- β , transdiferenciação epitelial para mesenquimal (EMT) e prognóstico desfavorável), CRIS-C (alta atividade da sinalização de EGFR, sensibilidade a seus inibidores), CRIS-D (ativação da via de sinalização mediada por WNT, amplificação de IGF2) e CRIS-E (fenótipo semelhante às células de Paneth, mutações em *TP53*) (ISELLA et al., 2017). Ambas as classificações mostram que o câncer colorretal é uma doença molecular e fenotipicamente diversa, o que é importante para as novas abordagens terapêuticas.

O fator hereditário configura-se como uma das principais causas do desenvolvimento do câncer colorretal não polipoide, sendo responsável por cerca de 20% a 30% dos casos de CCR (COTTI et al., 2000). Genes mutados e alterações cromossômicas podem estar presentes nesse processo de carcinogênese. A hipometilação do DNA no proto-oncogene K-RAS, alterações nos cromossomos 6 e 11, no cromossomo 17p, incluindo deleções e mutações no gene *TP53*, e nos cromossomos 18q com perdas de heterozigidade são apenas algumas das alterações genéticas e cromossômicas comuns no câncer colorretal (MAUGHAN & QUIRKE, 2003). Várias outras alterações podem ocorrer em diferentes estágios da progressão tumoral, e compreender complexos mecanismos celulares e moleculares que levam à aquisição do fenótipo maligno desse câncer é um campo promissor para pesquisa.

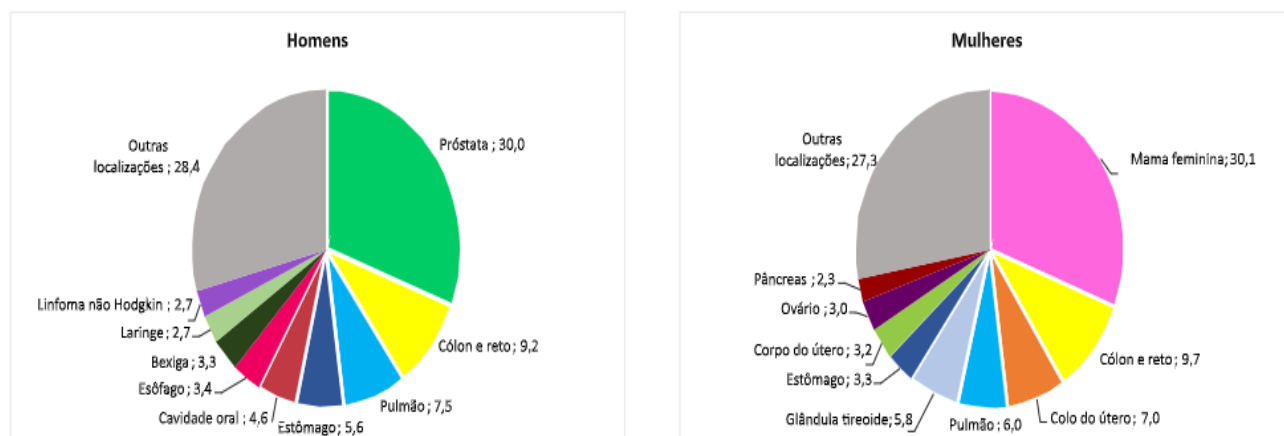
1.2.1 Epidemiologia do CCR

O Câncer Colorretal (CCR) é uma doença multifatorial, e o seu desenvolvimento está intimamente relacionado a interação de fatores ambientais e genéticos (DOMINGO; NADAL, 2017; THANIKACHALAM; KHAN, 2019). Estimativas revelam que o CCR é o terceiro tipo mais comum de câncer e a segunda principal causa de mortalidade em todo o mundo, resultando em mais de 935 mil mortes em 2020 (GLOBOCAN, 2020).

No Brasil, segundo dados do Instituto Nacional de Câncer 2022 e Santos et al., 2023, quando se exclui o câncer de pele não melanoma, o CCR é o segundo tipo de câncer com a maior incidência em ambos os sexos, incidência essa que ocorre em maiores proporções nos estados das regiões Sul e Sudeste do país. Com

estimativas de cerca de 21.970 novos casos para homens e 23.660 novos casos entre mulheres, para o triênio de 2023 a 2025, esses dados indicam um risco entre 20,78 e 21,41 novos casos por 100 mil habitantes para homens e mulheres, respectivamente (INCA, 2022).

Figura 4 – Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2023 por sexo, exceto o câncer de pele não melanoma.



Fonte: (Santos et al., 2023).

1.2.2 Sintomas e diagnóstico

O diagnóstico do câncer colorretal baseia-se em aspectos preventivos, e na detecção dos sinais e sintomas. O CCR geralmente não apresenta sintomas específicos, porém, quando surgem, são associados a outras doenças com menos magnitude (SANTOS JUNIOR, 2007; MENEZES et al., 2016). Os sintomas mais comuns associados ao CCR incluem diarreia, desconforto, constipação, dores abdominais, fraqueza, anemia, alteração do hábito intestinal, fezes afiladas, escuras ou com sangue visível, podendo também ocorrer sangramento anal e emagrecimento. (BALLESTER et al., 2016).

O tumor pode ser detectado precocemente através de dois exames principais: pesquisa de sangue oculto nas fezes e endoscopia (colonoscopia ou retossigmoidoscopia) (U.S. PREVENTIVE SERVICES TASK FORCE et al., 2016).

O método mais eficaz para avaliar o intestino grosso é a colonoscopia, pois permite a identificação e remoção de pólipos, prevenindo sua evolução para malignidade. O Exame proctológico ou exame do toque retal, feito periodicamente, também auxilia no

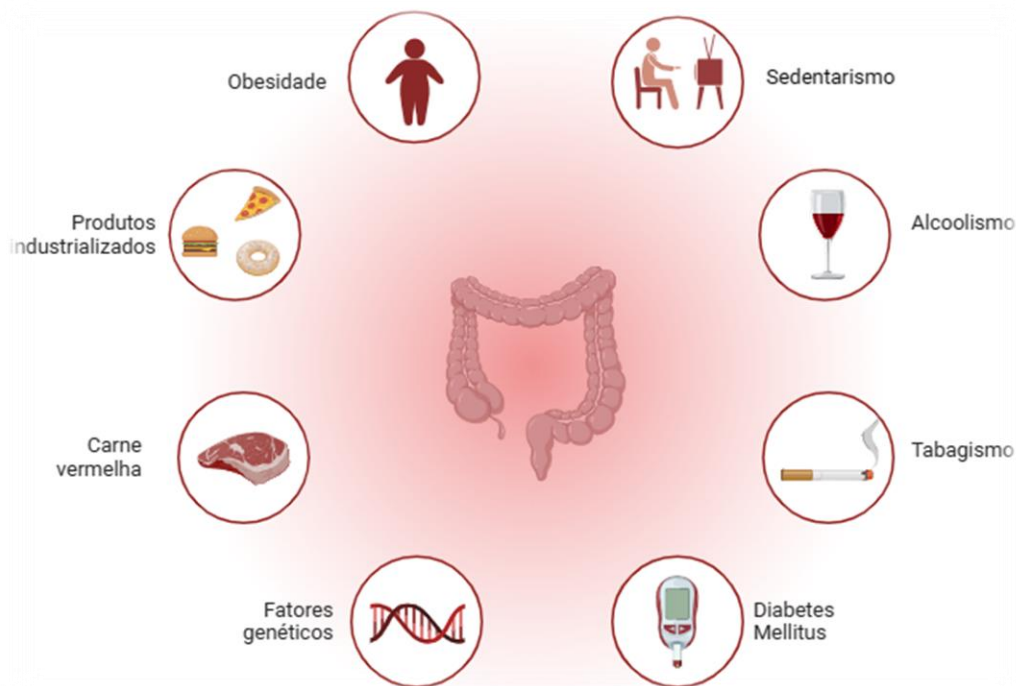
diagnóstico, especialmente por detectar tumores na região do segmento retal, região com cerca de 80% de assertividade precoce, com a necessidade de exames complementares para a confirmação (SANTS JUNIOR, 2007). Esses exames devem ser realizados em indivíduos que apresentam sintomas sugestivos de câncer colorretal ou naqueles sem sinais, porém pertencentes a grupos de risco (LOPES et al., 2008).

1.2.3 Fatores de risco

O câncer colorretal é uma doença heterogênea e possui como principais fatores de risco: a idade, padrões alimentares inadequados, doenças inflamatórias intestinais, o consumo excessivo de bebidas alcoólicas, obesidade, tabagismo, sedentarismo, além de alguns genes envolvidos no processo carcinogênico (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019; INCA, 2019).

O excesso de gordura corporal definido pelo Índice de Massa Corporal (IMC) também está associado ao aumento do risco de CCR. Os elevados níveis de insulina, a inibição do processo de apoptose, e um estado de inflamação crônica no organismo são algumas alterações relacionadas ao aumento de gordura. Essas alterações também desempenham papéis importantes na etiologia do CCR, estando associadas a promotores de carcinogênese das células do intestino (INCA 2021; WILD; WEIDERPASS; STEWART, 2020).

Figura 5: fatores de riscos para o câncer de colorretal.



Fonte: Produção própria do autor (www.biorender.com).

Outros fatores podem contribuir para o desenvolvimento do câncer colorretal. Mutações que afetam os genes envolvidos no processo de regulação celular, doenças inflamatórias intestinais, histórico de pólipos no cólon e diabetes mellitus estão associados a um aumento do risco de CCR. Dados indicam que indivíduos com diabetes apresentam um risco aumentado em 30% de desenvolver CCR, com uma taxa de mortalidade 26% maior em comparação com aqueles sem a doença. Manter os níveis adequados de insulina e gordura corporal pode reduzir as chances de desenvolver câncer colorretal (RUTTER et al., 2012; BINEFA et al., 2014; AL-SHAMSI et al., 2016; PEARSON-STUTTARD et al., 2018; MURPHY et al., 2018).

O consumo de produtos industrializados e de carne vermelha está associado ao desenvolvimento do CCR. Estima-se que o consumo diário de carne processada aumenta em 18% o risco de câncer colorretal. No caso da carne vermelha não processada, observa-se um efeito dose-resposta para o câncer: quanto maior o consumo, maior o risco. (INCA 2021; WILD; WEIDERPASS; STEWART, 2020; TABUNG et al., 2017). Também se observou aumento do risco de CCR no consumo de álcool indicando que quanto maior o consumo, maior o risco. Comparado àqueles que não consomem álcool, o risco aumenta em 16%, podendo aumentar ainda mais

dependendo do nível de consumo (INCA 2021; PELSER et al., 2014; DEKKER et al., 2019).

O sedentarismo contribui para o aumento de peso, enquanto a atividade física é importante, pois reduz os marcadores de inflamação e o tempo de digestão. Isso diminui o tempo de contato das substâncias potencialmente carcinogênicas com a mucosa do intestino. A adoção de hábitos saudáveis, incluindo uma alimentação equilibrada e rica em fibras, oferece proteção em diferentes estágios da carcinogênese e pode reduzir a resistência à insulina (DEKKER et al., 2019; BECERRA et al., 2016; SBOC, 2023).

1.2.4 Tratamento

Os mecanismos envolvidos no desenvolvimento dos tumores colorretais são variados, destacando a diversidade entre os tumores. As alternativas e intervenções terapêuticas empregadas em pacientes oncológicos são determinadas a partir de alguns componentes, que incluem: o tamanho, localização e extensão do tumor, o grau de comprometimento, inclinações do paciente, presença de metástase, avaliação dos possíveis riscos e efeitos colaterais dos agentes farmacológicos (FENG & CHIEN 2003; VALDERRAMA-TREVIÑO, et al., 2017; SERETIS et al., 2018; RECIO-BOILES & CAGIR, 2022).

O tratamento padrão para o câncer colorretal geralmente envolve uma combinação de cirurgia, quimioterapia e radioterapia, que dependendo do tipo de CCR podem ser combinadas ou realizadas em sequência. A ressecção cirúrgica é considerada o principal método de tratamento para o CCR em estágios iniciais da doença. A cirurgia é uma opção dependendo da localização e estágio do tumor, enquanto a radioterapia é utilizada em todos os estágios e frequentemente é combinada com a cirurgia para melhorar os resultados. A quimioterapia é um método em crescimento, envolvendo fármacos que interferem no crescimento, desenvolvimento, disseminação e invasão das células cancerígenas, com o objetivo de reduzir e/ou impedir o avanço do tumor. A poliquimioterapia, que combina diferentes fármacos, é amplamente utilizada devido à sua eficácia e resposta satisfatória, combinando diferentes mecanismos de ação (SAUZA et al., 2007; CARVALHO, 2003; JEMAL et al., 2017; BROUWER et al., 2018).

O tratamento do câncer pode variar dependendo do estágio da doença e há uma grande diversidade de quimioterápicos e esquemas terapêuticos utilizados no tratamento farmacológico do CCR. Alguns dos regimes terapêuticos descritos na literatura incluem a combinação do 5-fluorouracil com oxaliplatina e/ou irinotecan em conjunto com a leucovorina; agentes antiangiogênicos, que inibem os fatores de crescimento do endotélio vascular (VEGF) como bevacizumabe ou aflibercept; e cetuximabe ou panitumumabe, anti-EGFR, que atuam nas proteínas responsáveis pelo controle dos receptores do fator de crescimento epidérmico (EGFR) (ARMAGHANY, et al., 2012; CARETHERS & JUNG, 2015).

Alguns dos esquemas terapêuticos para o tratamento do câncer colorretal (CCR) em estágio avançado com metástases incluem FOLFOX (5-FU + leucovorina + oxaliplatina), FOLFIRI (5-FU + leucovorina + irinotecano) e FOLFOXIRI (5-FU + leucovorina + oxaliplatina + irinotecano). Esses regimes podem ser combinados com terapias-alvo direcionadas para o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) para melhorar a eficácia do tratamento. No entanto, é crucial verificar o status do gene RAS antes de usar medicamentos que inibem o EGFR, como cetuximabe e panitumumabe. Se o gene RAS estiver mutado, esses medicamentos podem não ser eficazes e não devem ser utilizados, pois podem não oferecer benefícios significativos no tratamento do CCR. Portanto, a avaliação do status do gene RAS é fundamental para orientar a escolha do tratamento mais adequado para cada paciente. (VAN CUTSEM., et al 2016; Ministério da Saúde, 2022).

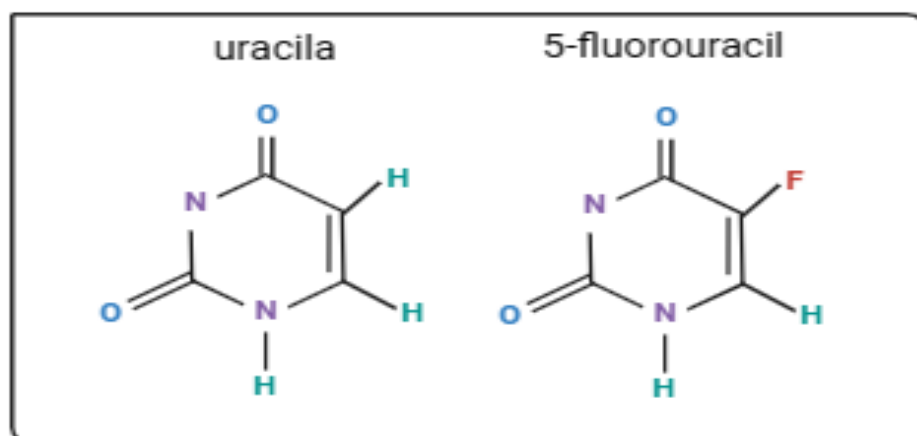
Apesar dos avanços e das diversas opções terapêuticas disponíveis atualmente, o prognóstico para pacientes com câncer colorretal ainda é desfavorável. O diagnóstico geralmente ocorre em estágios avançados do tumor primário, frequentemente com metástases, e muitos pacientes apresentam resistência aos agentes quimioterápicos ou sofrem com alta toxicidade dos regimes de quimioterapia. Além disso, a heterogeneidade tumoral também representa um desafio significativo para o controle eficaz dessa neoplasia, uma das neoplasias malignas mais agressivas e de difícil tratamento (AOULLAY, et al., 2020; GOBRAN, et al., 2020).

1.2.4.1 5-Fluorouracil

O fármaco 5-Fluorouracil (5-FU) é considerado um dos quimioterápicos mais utilizados em todo mundo. Devido ao seu custo acessível e eficácia em diversos tratamentos oncológicos, esse medicamento é utilizado principalmente no câncer colorretal, que apresenta uma das maiores taxas de incidência e mortalidade entre todos os cânceres (CHIONH et al., 2017; FREEMAN et al., 2015; JOAG et al., 2017; SAIF et al., 2009; WIGLE et al., 2019).

O 5-FU é uma droga citotóxica imunossupressora análoga de pirimidina, antineoplásica e pertencente a classe das fluoropirimidinas, (RIABI-CHEBBI et al., 2019; WILHELM et al., 2016; MAGALHÃES, 2018; SETHY, KUNDU, 2021). O 5-FU possui uma estrutura orgânica aromática heterocíclica semelhante à uracila, mas se distingue pela presença de um átomo de flúor no carbono-5 do anel pirimidínico, em vez de um átomo de hidrogênio (ZHANG et al., 2008; KUMAR et al., 2010). Agente antimetabólico inibidor da síntese de DNA, afeta as células de maior grau de divisão mitótica em tecidos de rápida proliferação, principalmente as células neoplásicas (SMITH et al., 2008).

Figura 6 - Estrutura da uracila e 5-fluorouracil.



Fonte: Produção própria do autor (www.biorender.com).

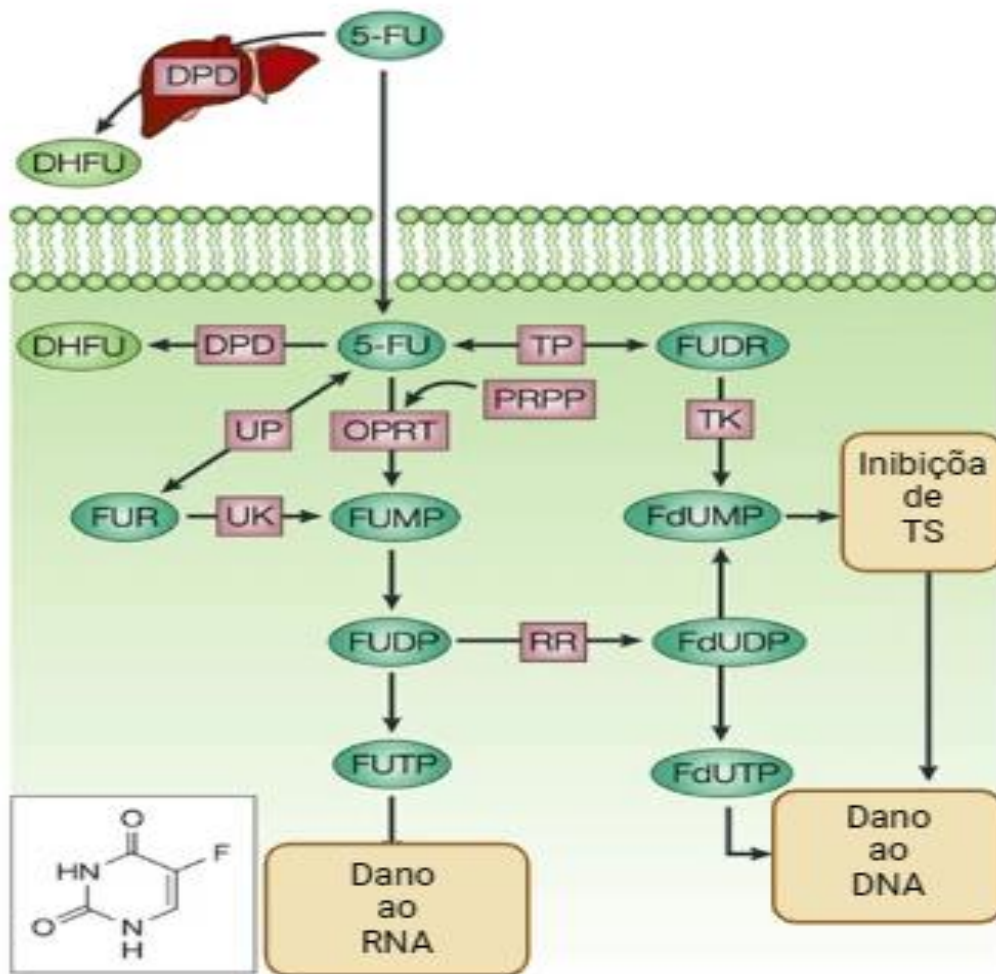
O mecanismo de ação do 5-FU está relacionado à sua estrutura química, que se assemelha à uracila, uma base nitrogenada presente nos ácidos nucleicos, incluindo o ácido ribonucleico (RNA). O 5-FU foi desenvolvido com o propósito de interferir nos processos vitais, como a incorporação de nucleotídeos em moléculas de DNA e/ou RNA, essenciais para a síntese e o metabolismo de novas células. Sua estrutura bioquímica permite que seja reconhecido pelo organismo, porém, incapaz

de desempenhar suas funções normais. Isso resulta em uma alteração no metabolismo celular, levando a efeitos terapêuticos específicos. (RUTMAN, et al., 1954).

Após entrar nas células, o 5-fluorouracil (5-FU) é metabolizado em três principais metabolitos ativos: monofosfato de fluorodesoxiuridina (FdUMP), trifosfato de fluorodesoxiuridina (FdUTP) e trifosfato de fluorouridina (FUTP). O 5-fluorouridina monofosfato (FUMP) é gerado direta ou indiretamente por meio de diversas enzimas, como orotato fosforilase (OPRT), fosforibosiltransferase (PRPP), uridina fosforilase (UP) e uridina quinase (UK). A FUMP é então fosforilada em difosfato de fluoruridina (FUDP), convertendo-se no metabólito ativo fluorodesoxiuridina trifosfato (FUTP), que causa danos no RNA, ou no metabólito ativo difosfato de fluorodesoxiuridina (FdUDP), responsável por danos no DNA após conversão pela ribonucleotídica redutase (RNR) (SETHY, KUNDU. 2021; LONGLEY, HARKIN. 2003).

Além disso, o 5-FU pode ser convertido em monofosfato de fluorodesoxiuridina (FdUMP) por meio de um processo indireto envolvendo ação sequencial da timidina fosforilase (TP) e timidina quinase (TK), ou pela redução do FUDP. A ligação do FdUMP à timidilato sintase (TS) resulta na formação de um complexo que interrompe significativamente a síntese e reparo do DNA (SETHY, KUNDU. 2021; LONGLEY, HARKIN. 2003).

Figura 7. O 5-Fluorouracil (5-FU) é um medicamento que atua interferindo na síntese de DNA e RNA dentro das células. Após entrar na célula, o 5-FU passa por processos metabólicos e se converte em três metabólitos ativos principais: fluorodeoxiuridina monofosfato (FdUMP), fluorodeoxiuridina trifosfato (FdUTP) e 5-fluorouridina trifosfato (FUTP). O FdUMP tem a capacidade de se ligar à enzima timidilato sintase, causando um desequilíbrio nos nucleotídeos e, como resultado, inibindo a síntese de DNA. Por outro lado, o FUTP é incorporado ao RNA, o que leva à perda funcional desse componente e, conseqüentemente, à morte celular.



Fonte: adaptado de (LONGLEY, HARKIN. 2003).

O catabolismo do 5-FU ocorre principalmente no fígado, onde é transformado em diidrofluorouracil (DHFU), que por sua vez forma α -fluoro- β -alanina (FBAL) e ácido propiônico α -fluoro- β -ureido (FUPA). Esses produtos de degradação são então excretados pelos rins (SETHY, KUNDU. 2021; LONGLEY, HARKIN. 2003).

Devido à ampla utilização do 5-fluorouracil (5-FU), há uma preocupação geral com a resistência dos tumores a esse fármaco, o que muitas vezes leva ao aumento da concentração do medicamento (DO CARMO et al., 2018). O 5-FU pode induzir vários efeitos adversos no organismo devido à sua toxicidade, afetando células saudáveis, como células epiteliais e a medula óssea (DO CARMO et al., 2018; ZHANG et al., 2016). Esses efeitos adversos incluem reações cutâneas (HADDOCK;

COHEN, 2016), alopecia, fadiga (MINHAS et al., 2016), isquemia, cardiomiopatia entre outras (FOCAC CETTI et al., 2015).

1.3 Peptídeos

Diante dos avanços da biologia molecular há um aumento significativo na utilização de moléculas terapêuticas. Muitas dessas moléculas são derivadas de produtos naturais, que são fontes de compostos biologicamente ativos. Entre essas moléculas, os peptídeos se destacam, pois estão presentes em quase todos os organismos vivos (LIMA et al, 2021) e desempenham um papel fundamental na linha de defesa contra patógenos em organismos multicelulares e unicelulares. Eles são frequentemente referidos como peptídeos de defesa do hospedeiro devido à sua capacidade de modular e/ou executar uma resposta do sistema imunológico inato (ZHANG & GALLO, 2016). Essas moléculas possuem várias finalidades, permitindo que sejam utilizadas de várias formas (SOUZA et al, 2020).

1.3.1 Peptídeos naturais

Os peptídeos são moléculas curtas compostas de 5 a 50 aminoácidos que possuem características desejáveis, que apresentam um amplo espectro de atividade. São geralmente carregados positivamente, devido à presença de aminoácidos como lisina e arginina, característica que facilita a interação com a membrana celular, que é negativamente carregada (OLIVEIRA et al, 2019). Devido a essa interação, os peptídeos possuem em suas estruturas um teor de 40% a 50% de aminoácidos hidrofóbicos, o que lhes confere a capacidade de interagir com as membranas celulares. Esse fenômeno é considerado seu principal mecanismo de ação contra a membrana (HU, et al., 2016; QIAO, et al., 2019; SAUZA et al, 2020).

A estrutura dos peptídeos determina suas propriedades físicas, químicas e biológicas, e é fundamental para sua função, que geralmente envolve interações com as membranas celulares ou com alvos específicos dentro das células. Alguns peptídeos interagem especificamente com a membrana celular devido à presença de resíduos de aminoácidos com carga positiva e hidrofóbicos em sua estrutura. Esses resíduos permitem que os peptídeos se fixem à membrana, causando uma desestabilização na sua estrutura. Essa desestabilização da membrana celular também depende da estrutura molecular quando estão em meio aquoso. Alguns

peptídeos adotam estruturas secundárias específicas, como a α -hélice que possui uma extremidade polar e outra apolar, e a folha β . que é mantida por pontes dissulfeto, conferindo-lhe estabilidade estrutural (LIMA et al, 2021).

Embora os peptídeos naturais demonstrem potencial terapêutico devido à sua ação na membrana biológica, algumas características inconvenientes limitam sua utilização (LIMA et al, 2021). Estudos recentes indicam que esses peptídeos podem apresentar toxicidade, afetando as células sanguíneas normais e causando hemólise. Além disso, essas moléculas têm uma susceptibilidade à degradação por proteínas do hospedeiro, o que compromete sua seletividade e hidrossolubilidade indesejável (CAPECCHI et al, 2021). Além disso, a extração de peptídeos naturais geralmente requer um processo de purificação, que pode resultar em baixos rendimentos de moléculas purificadas. Esse baixo rendimento aumenta os custos de produção, tornando a produção em larga escala inviável (OLIVEIRA et al, 2019).

1.3.2 Peptídeos sintéticos

Algumas desvantagens dos peptídeos naturais destacam a importância do desenvolvimento e utilização de peptídeos sintéticos na pesquisa e terapia. Sua atividade hemolítica, maior susceptibilidade à degradação por enzimas no organismo, interação com uma variedade de alvos e sua variada composição e estrutura, faz-se necessário desenvolver moléculas sintéticas para suprimir essas desvantagens, bem como reduzir toxicidade, aumentar a estabilidade e potencializar efeitos terapêuticos (MORAVEJ et al., 2018; SINHA; SHUKLA, 2019; LEI et al, 2019).

Os peptídeos sintéticos são projetados com base em sua estrutura para otimizar sua atividade terapêutica. Isso permite ajustar a sequência de aminoácidos para melhorar suas propriedades biológicas, como a capacidade de interagir com alvos específicos, aumentar a estabilidade e reduzir a toxicidade (TAN et al., 2021). Modificações químicas na sequência de aminoácidos e de resíduos de aminoácidos para melhorar a afinidade ou seletividade também são pontos importantes. Para se obter uma sequência de aminoácidos desejada e funcional, os peptídeos são desenhados a partir de uma proteína natural com atividade conhecida e com características semelhantes da função que se deseja. Para alcançar esse objetivo, utiliza-se a bioinformática, uma ferramenta que ajuda a selecionar a sequência

proteica mais adequada, indicando quais dessas proteínas podem gerar peptídeos com atividades semelhantes às desejadas (SOUZA et al, 2020).

Os peptídeos antimicrobianos sintéticos GATIRAVNSR (PepGAT) e KAAARIKYFQ (PepKAA) obtido a partir de uma proteína quinase *Arabidopsis thaliana*, descrito por Souza e colaboradores em 2020, sedo destacado pela suas excelentes performas, com uma ótima atividade antimicrobiana sem apresentar hemólise e sendo resistente à digestão gástrica. Foram testadas também contra células normais como, fibroblasto de pulmão fetal humano (MRC-5) e queratinócitos humanos (HaCaT), demonstrando não apresenta nem uma toxicidade, para melhor verificação foi utilizado larvas e embriões de peixe zebra confirmando não apresenta toxicidade contra células normais (SOUZA et al, 2022).

Os peptídeos (PepGAT) e (PepKAA) foram caracterizados e avaliados quanto ao seu potencial antimicrobiano. Ambos apresentam características importantes para essa atividade como carga positiva com +2 e +3 para os peptídeos respectivamente, uma porcentagem favorável de hidrofobicidade de 40% e um baixo índice de Boman de 2,5 (medida que quantifica a eficácia dos peptídeos com base em suas propriedades físico-químicas). Análises de bioinformática indicam que PepGAT possui um potencial antifúngico de 60% e um potencial antibacteriano de 77%, enquanto o PepKAA exibe um potencial antifúngico de 89% e um potencial antibacteriano de 60% (Yibing; Jinfeng; Yuxin 2010; Souza et al, 2020).

Os peptídeos PepGAT e PepKAA foram previstos para adotar uma estrutura secundária de hélice curta, mas apresentaram diferenças na conformação: PepGAT exibiu uma hélice de duas voltas, enquanto PepKAA mostrou uma hélice de uma volta e meia. Essas variações estruturais podem influenciar suas interações com as membranas celulares dos microrganismos alvos. A atividade antimicrobiana desses peptídeos é atribuída principalmente a dois tipos de interação com a membrana celular: interações eletrostáticas, impulsionadas por forças de atração entre os peptídeos e a membrana; e interações hidrofóbicas ou apolares, que facilitam a inserção dos peptídeos na membrana. Os peptídeos apresentaram atividade antibacteriana contra *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *B. subtilis* e *S. enterica*, com PepGAT mostrando um efeito melhor do que PepKAA em relação às bactérias. Por outro lado, PepKAA obteve o melhor resultado na atividade antidermatofítica, contra

T. mentagrophytes e *T. rubrum* (Yibing et al., 2010; Souza et al., 2020; Pflaller & Diekema, 2007).

Na atualidade existem poucos estudos que analisam peptídeos direcionados a diferentes tipos de cânceres. Won e colaboradores (2006) em seus estudos examinou a atividade anticâncer dos peptídeos GGN5 e V8W-GGN5 contra algumas linhagens celulares tumorais, como A498, MCF-7, SK-MEL-2 e HCT116 e encontrou resultados que indicam que ambos possuem atividades favoráveis para o desenvolvimento terapêutico com atividade anticâncer moderada apesar da alta atividade antimicrobiana. Os autores relataram potencial tóxico contra células não cancerosas. Hsu e colaboradores (2022) também discute a eficácia do peptídeo Ple e Ple-a no tratamento de infecções bacterianas e câncer, demonstrando citotoxicidade seletiva contra várias linhagens de células cancerosas, incluindo adenocarcinoma pulmonar e gástrico, induzindo apoptose e autofagia nas células cancerosas. Os pesquisadores examinaram os valores de IC50 dos peptídeos Ple e Ple-a em relação ao câncer colorretal e relataram que o peptídeo Ple não atingiu IC50 mesmo com valores superiores a 500 µM. Esses achados sugerem o potencial desses peptídeos como agentes anticâncer promissores, com potenciais aplicações terapêuticas e biotecnológicas.

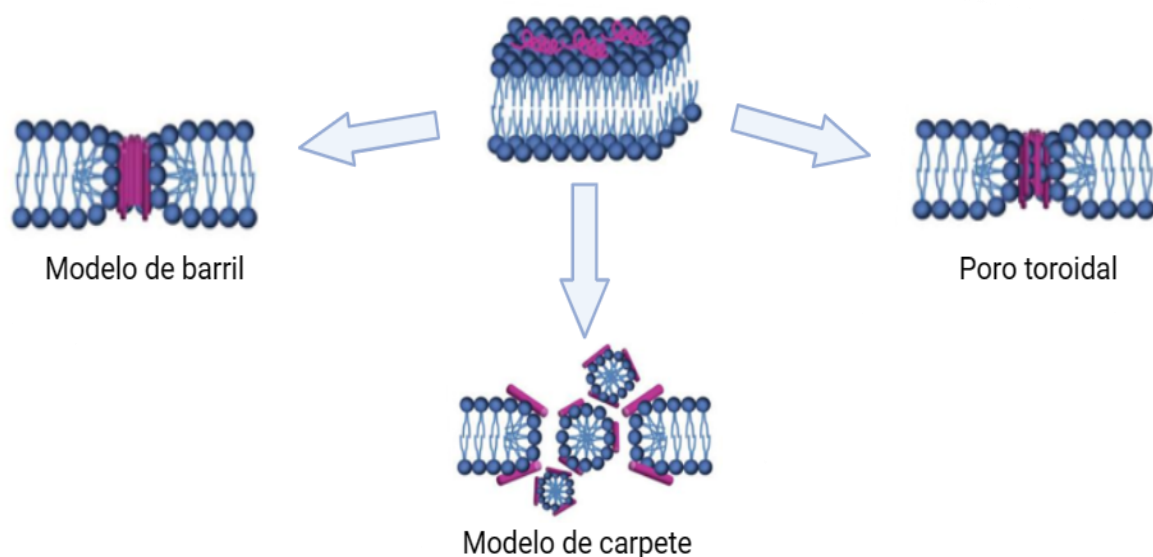
1.3.3 Mecanismos de ação

A membrana celular representa o primeiro obstáculo que os peptídeos precisam superar para alcançar o interior da célula e exercer seus mecanismos de ação subsequentes (LIMA et al., 2021). Os peptídeos são moléculas anfipáticas, possuindo regiões com carga elétrica positiva e negativa em sua estrutura. Quando os peptídeos interagem com a membrana celular, a região da molécula que possui carga elétrica negativa é atraída pela carga elétrica positiva presente na membrana celular. Essa capacidade de atravessar a membrana celular é fundamental para que os peptídeos possam agir em processos biológicos intracelulares. (AKBARI et al, 2018).

Além de interferir na membrana celular, os peptídeos também podem exercer seus efeitos por meio de diferentes mecanismos de ação (CORRÊA et al., 2019). Dentre esses, três mecanismos são possíveis: o modelo de barril, que consiste na formação de poros na membrana celular devido à concentração dos peptídeos,

que se organizam e interagem entre si, formando uma abertura hidrofóbica na porção lipídica da membrana (LIMA et al., 2021); o de poro toroidal, no qual os peptídeos não interagem entre si, mas com a membrana celular, mais especificamente com a porção carregada dos fosfolipídios, formando um canal hidrofóbico na membrana da célula (LIMA et al., 2021); e o modelo de tapete que sugere que os peptídeos não formam poros na membrana, mas desestabilizam-na devido à interação da carga positiva dos peptídeos com a carga negativa dos fosfolipídios da membrana. Isso promove uma desestabilização da estrutura da membrana, resultando na formação de micelas (BOGDANOVA et al., 2020).

Figura 8 - Modos de permeabilização da membrana lipídica por peptídeos. Os peptídeos antimicrobianos catiônicos inicialmente se ligam à superfície da membrana externa, que é carregada negativamente, em uma orientação paralela. Os modelos para a subsequente permeabilização da membrana, incluem os mecanismos "modelo de barril", "toroidal" e "tapete".



Fonte: Adaptado de Silva et al. 2014.

Os peptídeos possuem como alvo diversos componentes presentes na membrana celular, tais como polímeros de N-acetil-D-glicosamina (NAG), β -glucanos (MAGANA et al., 2020) e quitina, além de outras estruturas (AMARAL et al., 2021). Muitos conseguem penetrar na membrana celular sem formar poros, direcionando-se para alvos intracelulares específicos. Isso pode levar ao mau funcionamento do metabolismo celular, inibição da replicação e transcrição, além de afetar enzimas

importantes (MORAVEJ et al, 2018). Além disso, estudos mostram que os peptídeos podem induzir a superprodução de espécies reativas de oxigênio, causando instabilidade em proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos e desregulando o metabolismo celular, embora o princípio exato desse processo ainda não seja completamente compreendido (LIMA et al, 2020). Estes mecanismos permitem que os peptídeos exerçam sua atividade terapêutica, como a permeabilização da membrana e a indução de citotoxicidade em células tumorais.

2. Objetivo

2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial efeito citotóxico *in vitro* e *in silico* dos peptídeos sintéticos antimicrobiano PepGAT e PepKAA na linhagem de câncer de colón HCT-116.

2.2 Objetivos específicos

- Estabelecer a CI50 dos peptídeos sintéticos PepGAT e PepKAA na linhagem celular HCT-116;
- Verificar se os efeitos dos peptídeos sintéticos PepGAT e PepKAA influencia no ciclo celular da linhagem HCT-116;
- Avaliar a morte celular, e a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) na linhagem celular HCT-116 sob os efeitos dos peptídeos sintéticos PepGAT e PepKAA;
- Averiguar se os peptídeos sintéticos PepGAT e PepKAA têm a capacidade de impedir/diminuir a invasão celular na linhagem celular HCT-116;
- Avaliar a estrutura da proteína KRAS em um modelo tridimensional (3D) *in silico* na presença dos peptídeos sintéticos PepGAT e PepKAA.

3. Metodologia

3.1 Cultivo celular

Nesse estudo inicialmente foram utilizadas quatro linhagens de células de câncer humano para os ensaios *in vitro*: HCT-116 (carcinoma de colón), AGP-01 (adenocarcinoma gástrico), MCF7 (adenocarcinoma de mama), SKMEL19 (melanoma humano). As cinco linhagens foram mantidas em meio DMEM (Meio Eagle - Modificado por Dulbecco), suplementado com 10% de SBF (Soro Bovino Fetal) e 1% penicilina/estreptomicina (5000U/5000µg/mL). As células foram incubadas em uma estufa úmida contendo 5% de dióxido de carbono (CO₂) e a 37°C. A confluência celular foi observada com o auxílio de um microscópio invertido.

O crescimento das culturas será monitorado regularmente usando um microscópio invertido (Leica DMIL LED) até atingir uma confluência de 80%. Além disso, o consumo de nutrientes do meio de cultura foi avaliado através de alterações no pH e coloração do meio. Quando as células atingem a confluência desejada, a manutenção da cultura será realizada. Primeiramente, o meio contido na garrafa será desprezado e as células serão lavadas com tampão fosfato-salino (PBS) 1x (NaCl 137 mM, Fosfato 10 mM e KCl 2,7 mM e pH 7.4). Em seguida, foi adicionado tripsina-EDTA (0,25% v/v em PBS 1x) durante 5 minutos em estufa de CO₂ a 37°C para dissociação das células. Após, a tripsina foi inativada com meio DMEM acrescido de 10% de SBF. A solução foi homogeneizada e uma porção foi descartada. Posteriormente, foi adicionado meio de cultura à garrafa para dar continuidade à cultura.

3.2 Avaliação da Citotoxicidade

O Alamar Blue foi empregado para determinar a citotoxicidade dos peptídeos na concentração única (100 µg/mL) e utilizado o 5-FU como controle positivo, contra as quatro linhagens celulares. A linhagem que apresentou a melhor resposta com os peptídeos foi escolhida para realizado uma curva das concentrações, de (0 µg/mL – 200 µg/mL) para os peptídeos e de (0 nM – 40 nM) para o 5-FU, para poder determinar suas IC₅₀, assim definindo suas concentrações nos demais experimentos.

Em duas placas de 96 poços, foi semeado 3x10³ células por poço, depois de 24 horas foram tratadas, a primeira placa foi tratada com os peptídeos em dose

única de 100 µg/mL contra as cinco linhagens celulares, por um tempo de tratamento de 72 horas, após o tempo de incubação, foi acrescentado o Alamar Blue na concentração de 0,2 mg/mL e incubado por 3 horas. Em seguida foi levado ao BioTek Synergy H1 (BioTek, Winooski, VT) para ser lido a fluorescência, na excitação de 560nm e emissão de 590nm. A segunda placa realizada somente com a melhor linhagem celular da placa 1, foi tratada com uma diluição seriada de peptídeos na concentração de 200 µ g/mL até 0 µ g/mL e de 5-FU de 40 nM até 0 nM, e incubado por 72horas, em seguida foi realizada os mesmos passos da placa número um, e lida no mesmo equipamento.

3.3 Análise do Ciclo celular

Neste ensaio foi utilizada apenas a linhagem HCT-116 que foi plaqueada na concentração 3×10^4 células por poço, em placa de 24 poços e incubadas durante 24 horas para aderência celular. Em seguida, foram tratadas com os peptídeos na sua IC50 e 5-FU na concentração de 23nM e seguiu-se a incubação por 24 horas. Após o período de incubação, o meio foi removido dos poços e os poços foram lavados com PBS 1x. As células foram então desagregadas com tripsina-EDTA (0,25%) por 5 minutos, neutralizadas com DMEM e transferida para um eppendorf. Em seguida, a suspensão celular foi centrifugada a 1.500 rpm por 5 minutos e o *pellet* foi ressuspenso em álcool 80% a 4°C por 30 minutos. Posteriormente, as células foram centrifugadas novamente a 1.500 rpm por 5 minutos, o *pellet* celular foi então ressuspenso em solução de marcação com IP (50 µg/mL) e incubado a 25°C, protegido da luz, por 25 minutos. Por fim, a amostra foi centrifugada novamente e ressuspenso em PBS 1x para análise posterior por citometria de fluxo em 10.000 eventos por amostra (BD FACSVerser™) com a fluorescência do IP (Ex/Em: 535/617 nm). O software FlowJo foi utilizado para analisar os dados de citometria de fluxo.

3.4 Avaliação da integridade de membrana

Em placa de 24 poços, a linhagem HCT-116 foi semeada na concentração de 3×10^4 células por poço e seguiu-se incubação por 24 horas. Em seguida, os peptídeos e o 5-FU, nas suas IC50, foram acrescentados e seguiu-se incubação por 24 horas. Após a incubação o sobrenadante foi retirado e os poços lavados com PBS 1x, as células foram retiradas com a tripsina-EDTA (0,25%) por 5 minutos,

neutralizadas com DMEM e transferida para um eppendorf. Posteriormente, a suspensão foi centrifugada a 1500 rpm por 5 minutos e o *pellet* ressuspensionado no escuro com iodeto de propídeo (5 µg/mL) por 30 minutos em temperatura ambiente no escuro. Por fim, a suspensão de células foram centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos, o *pellet* ressuspenido em PBS 1x e analisadas por microscopia de fluorescência (Olympus System BX60) no comprimento de onda de excitação de 488 nm e emissão de 525nm. No mesmo experimento também foi tratada com 10 µM de isotiocianato de fluoresceína conjugado (FITC)-Dextrano com tamanho de 6 kDa por 30 minutos em temperatura ambiente, lida no mesmo microscópio que o IP e analisada no comprimento de onda de excitação de 490 nm e emissão de 520 nm.

3.5 Acúmulo de EROs

A linhagem HCT-116 foi plaqueada com 3×10^4 células por poço, em placa de 24 poços. Após a aderência celular, os peptídeos e o 5-FU, nos valores das suas IC50, foram acrescentados e seguiu-se incubação por 24 horas a 37°C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado, os poços foram lavados com PBS 1x e as células foram removidas usando tripsina-EDTA (0,25%), neutralizada com DMEM e transferida para um eppendorf. A suspensão de células foi centrifugada a 1500 rpm por 5 minutos e o *pellet* foi ressuspensionado no escuro com DCFH-DA na concentração de 10µM por 30 minutos em temperatura ambiente. Após a incubação as células foram lavadas duas vezes com PBS 1x, ressuspensionadas em PBS 1x e devolvidas para a placa para posteriormente análise no microscópio de fluorescência (Olympus System BX 41, Tóquio, Japão) nos comprimentos de onda de excitação de 535 nm e emissão de 617 nm.

3.6 Análise de Apoptose

A linhagem HCT-116 foi plaqueada com 3×10^4 células por poço, em placa de 24 poços. Após a aderência celular, os peptídeos e o 5-FU, nos valores das suas IC50, foram acrescentados e seguiu-se incubação por 24 horas a 37°C. Em seguida o sobrenadante foi descartado e os poços foram lavados com PBS 1x. Posteriormente, as células foram removidas usando tripsina-EDTA (0,25%), neutralizadas com DMEM e transferidas para um eppendorf. A suspensão de células foi centrifugada por 1500 rpm por 5 minutos e o *pellet* ressuspensionado em 200ul de tampão de ligação de anexina consistindo em 4 µL de anexina V-FITC, que em

seguida foi incubado com IP por 20 minutos a 25°C no escuro. Posteriormente as células foram lavadas com PBS 1x e ressuspendidas em PBS 1x. As amostras foram analisadas por citometria de fluxo (BD FACS Verse™).

O kit CellEvent® Caspase-3/7 (Thermo Scientific, EUA) foi usado para determinar a ativação da caspase 3/7 em um Cytation 3 Cell Multi-mode Reader (Biotek®), conforme o protocolo do fabricante. O perfil apoptótico foi identificado quando as células apresentavam núcleos verdes brilhantes, indicando a ativação da caspase 3/7. Posteriormente, as células foram coletadas, centrifugadas e o pellet celular foi suspenso em uma solução de evento celular contendo 5 µM de detecção de reagente CellEvent® Caspase-3/7 em PSB com soro a 5%, conforme as instruções do fabricante. A atividade da caspase 3/7 foi avaliada usando o kit no Cytation™ 3. Células com perfil apoptótico mostraram aumento na atividade da caspase 3/7, evidenciado por núcleos verdes brilhantes, enquanto células normais/viáveis exibiram fluorescência mínima (Mesquita et al., 2018).

3.7 Ensaio de invasão celular

Para o ensaio de invasão celular foram utilizadas um inserto, pastilhas Transwell com poros com diâmetro de 8µm, adicionado no interior deles, matrigel (20 µL) diluída em DMEM puro na proporção de 1:6 e incubado na estufa até a solução solidificar. Posteriormente, em placa de 6 poços, as células HCT-116 (40×10^4) foram semeadas em meio DMEM (1 mL) sem FBS. O tratamento foi realizado na câmara superior com peptídeos (100 µg/mL) e 5-FU (10 nM e 23 nM). Em seguida, o meio DMEM (2 mL) suplementado com 10% de FBS foi adicionado no poço e incubado por 24 horas a 37 °C. Após o tempo de incubação foi descartado os meios DMEMs e retirada a matrigel. As células que foram capazes de invadir através da camada de matrigel, atingindo o outro lado da membrana inserto, foram fixadas com metanol, ácido acético e água na concentração de 1:1:8, coradas com Giensa diluído em 1:10, e posteriormente analisado em microscópio invertido

3.8 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A linhagens HCT-116 foi semeada em uma placa de 6 poços na concentração de 10×10^4 células por poço. Após 24 horas de crescimento as células

foram tratadas com peptídeos e 5-FU nas suas IC50 por 72 horas, em seguida, o sobrenadante foi retirado e lavado com PBS 1x, as células foram dissociadas com a tripsina-EDTA (0,25%) por 5 minutos, neutralizado com DMEM e transferida para um eppendorf. Levadas 3 vezes com PBS 1x e fixadas com glutaraldeído a 1% (v/v) em tampão fosfato de sódio 0,15M a pH 7,2 durante 16 horas. Em seguida a células passaram por um processo de desidratação em etanol nas concentrações de 30%, 50%, 70%, 100% e 100% (v/v) por 10 minutos cada entre uma concentração e outra era centrifugado a 1500 por 5 minutos e o sobrenadante descartado e colocado a concentração adjacente, para finalizar a desidratação foi utilizado hexametildissilano 50% (v/v) (HDMS, Sigma, St. Louis, MI, EUA) por 10 minutos, diluído em etanol por 10 min, centrifugado e por fim desidratado com HDMS 100%. Em seguida, as células foram colocadas em um suporte e cobertas com uma nuvem de ouro utilizando o equipamento de revestimento (Emitech-Q150TES, Quorum Technologies, Lewes, Inglaterra) e uma tomografia por emissão de pósitrons (PET), em seguida foi realizada a análise em um microscópio eletrônico de varredura (Quanta 450 FEG, FEI, Waltham, MA) com uma ampliação de 20.000x.

3.9 Obtenção de estruturas 3D

Os genes mais relevantes identificados foram posteriormente empregados para obter a estrutura tridimensional das proteínas correlacionadas, utilizando o Protein Data Bank (PDB) ou AlphaFold. Para os acessos do PDB, selecionou-se o melhor modelo com base na resolução de raios X. No caso do AlphaFold, considerou-se o escore de confiança por resíduo (pLDDT) fornecido pelo banco de dados de estruturas de proteínas AlphaFold, juntamente com a análise de cobertura da sequência de aminoácidos FASTA, para a seleção da estrutura tridimensional. O sistema de gráficos moleculares PyMOL (versão 2.5.4, Schrödinger, LLC) foi utilizado para análise das estruturas 3D das proteínas, enquanto as ferramentas BIOVIA Discovery Studio Visualizer (versão 21.1.0.20298) foram empregadas para analisar a conformação do complexo proteína-ligante e os tipos de interações envolvidas.

3.10 Ensaio de acoplamento molecular (MD)

Foram conduzidos ensaios de docking cego por dinâmica molecular (MD) no ClusPro (<https://cluspro.org/help.php>) para acoplar proteínas-proteínas e proteínas-peptídeos. O receptor foi designado como a proteína alvo, enquanto os

peptídeos foram tratados como ligantes. Após os ensaios de docking, as poses geradas pelo ClusPro foram analisadas e comparadas com um ligante natural do alvo. Em seguida, as melhores poses foram selecionadas com base no maior valor de docking para determinar a pose ideal. Ao término do processo de acoplamento molecular, os compostos finais foram classificados de acordo com sua energia de ligação mínima com o alvo. As ferramentas PyMOL Molecular Graphics System (versão 2.5.4, Schrödinger, LLC) e BIOVIA Discovery Studio Visualizer (versão 21.1.0.20298) foram empregadas para analisar a conformação do complexo proteína-ligante e os tipos de interações envolvidas.

3.11 Análise estatística

Os dados foram analisados com os resultados com desvio médio, a partir da condução de três repetições biológicas e três repetições técnicas para cada experimento. Na análise *in vitro*, comparou-se o controle negativo (0,1% DMSO) com os grupos tratados utilizando ANOVA com pós-teste de Bonferroni ou teste t de Student. Consideraram-se diferenças significativas com um intervalo de 95% ($p < 0,05$). A análise de dados e o design gráfico foram realizados utilizando o GraphPad e o Prism 5.01.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; FAUTO, N.; KUMAR, V. **Robbins & Cotran - Patologia - Bases Patológicas das Doenças**, 8ª ed., Elsevier/Medicina Nacionais, Rio de Janeiro, 2010.

ADDOCK, E. S.; COHEN, P. R. 5-Fluorouracil-induced exacerbation of rosácea. **Dermatology Online Journal**, v. 22, n. 11, 2016.

- AMARAL JL, SOUZA PFN, OLIVEIRA JTA, Freire VN, Sousa DOB. Computational approach, scanning electron and fluorescence microscopies revealed insights into the action mechanisms of anticandidal peptide Mo-CBP₃-PepIII. **Life Sciences**. 2021 Sep 15;281:119775.
- ASLAN M, HSU EC, LIU S, STOYANOVA T. Quantifying the invasion and migration ability of cancer cells with a 3D Matrigel drop invasion assay. **Biol Methods Protoc**. 2021 Jul 21;6(1):bpab014.
- BAI, JINGWEN; LI, YAOCHEN; ZHANG, GUOJUN. Cell cycle regulation and anticancer drug discovery. **Cancer Biology & Medicine**, v. 14, n. 4, p. 348–362, 2017.
- BANERJEE P, MUKHERJEE D, MAITI TK, SARKAR N. Unveiling the Self-Assembling Behavior of 5-Fluorouracil and its N,N'-Dimethyl Derivative: A Spectroscopic and Microscopic Approach. **Langmuir**. 2017 Oct 17;33(41):10978-10988.
- BARRETO, M. da S.; CARREIRA, L. MARCON, S. S. Envelhecimento populacional e doenças crônicas: reflexões sobre os desafios para o Sistema de Saúde Pública. **Revista Kairós Gerontologia**, São Paulo, n. 18, n. 1, p. 325-339, jan./mar. 2015.
- BECERRA AZ, BERHO ME, PROBST CP, AQUINA CT, TEJANI MA, GONZALEZ MG, XU Z, SWANGER AA, NOYES K, MONSON JR, FLEMING FJ. Variation in Hospital-Specific Rates of Suboptimal Lymphadenectomy and Survival in Colon Cancer: Evidence from the National Cancer Data Base. **Ann Surg Oncol**. 2016 Dec;23(Suppl 5):674-683.
- BERMAN HM, WESTBROOK J, FENG Z, GILLILAND G, BHAT TN, WEISSIG H, SHINDYALOV IN, BOURNE PE. The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Res**. 2000 Jan 1;28(1):235-42.
- BERTRAM JS. A biologia molecular do câncer. **Mol Aspectos Med** 2000 Dez; 21(6):167-223.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Protocolos de encaminhamento da atenção básica para a atenção especializada. Brasília, DF: **Ministério da Saúde**, 2016. v. 7.
- BROUWER NPM, BOS ACRK, LEMMENS VEPP, TANIS PJ, HUGEN N, NAGTEGAAL ID, DE WILT JHW, VERHOEVEN RHA. An overview of 25 years of incidence, treatment and outcome of colorectal cancer patients. **Int J Cancer**. 2018 Dec 1;143(11):2758-2766.
- BILSKI P, BELANGER AG, CHIGNELL CF. Photosensitized oxidation of 2',7'-dichlorofluorescein: singlet oxygen does not contribute to the formation of fluorescent oxidation product 2',7'-dichlorofluorescein. **Free Radical Biology & Medicine**. 2002 Oct 1;33(7):938-46.
- BOGDANOVA LR, VALIULLINA YA, FAIZULLIN DA, KURBANOV RK, ERMAKOVA EA. Spectroscopic, zeta potential and molecular dynamics studies of the interaction of antimicrobial peptides with model bacterial membrane. **Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc**. 2020 Dec 5;242:118785.

BONNINGTON SN, RUTTER MD. Surveillance of colonic polyps: Are we getting it right? **World Journal of Gastroenterology**. 2016 Feb 14;22(6):1925-34.

BURNETT-HARTMAN AN, NEWCOMB PA, HUTTER CM, PETERS U, PASSARELLI MN, SCHWARTZ MR, UPTON MP, ZHU LC, POTTER JD, MAKAR KW. Variation in the association between colorectal cancer susceptibility loci and colorectal polyps by polyp type. **American Journal of Epidemiology**. 2014 Jul 15;180(2):223-32.

CHAO A, THUN MJ, JACOBS EJ, HENLEY SJ, RODRIGUEZ C, CALLE EE. Cigarette smoking and colorectal cancer mortality in the cancer prevention study II. **J Natl Cancer Inst**. 2000 Dec 6;92(23):1888-96.

CHU PC, LIN PC, WU HY, LIN KT, WU C, BEKAIL-SAAB T, LIN YJ, LEE CT, LEE JC, CHEN CS. Mutant KRAS promotes liver metastasis of colorectal cancer, in part, by upregulating the MEK-Sp1-DNMT1-miR-137-YB-1-IGF-IR signaling pathway. **Oncogene**. 2018 Jun;37(25):3440-3455.

COTTI GCC, SANTOS FPS, MORENO F, MARTINO RB. Genética do câncer colorretal. Genetics of colorectal cancer. **Rev Med (São Paulo)**, 79(2/4): 45-64, 2000.

CORRÊA, JAF, EVANGELISTA AG, NAZARETH TM, LUCIANO FB. Fundamentals on the molecular mechanism of action of antimicrobial peptides. **Materialia**, v. 8, p. 100494, 2019.

CROCE CM. Oncogenes and cancer. **N Engl J Med**. 2008 Jan 31;358(5):502-11.

DE SOUSA PORTILHO AJ, DA SILVA EL, BEZERRA ECA, MORAES REGO GOMES CBS, FERREIRA V, DE MORAES MEA, DA ROCHA DR, BURBANO RMR, MOREIRA-NUNES CA, MONTENEGRO RC. 1,4-Naphthoquinone (CNN1) Induces Apoptosis through DNA Damage and Promotes Upregulation of H2AFX in Leukemia Multidrug Resistant Cell Line. **Int J Mol Sci**. 2022 Jul 23;23(15):8105.

DEKKER E, TANIS PJ, VLEUGELS JLA, KASI PM, WALLACE MB. Colorectal cancer. **Lancet**. 2019 Oct 19;394(10207):1467-1480.

DOBASHI Y, TAKEHANA T, OOI A. Perspectives on cancer therapy: cell cycle blockers and perturbators. **Curr Med Chem**. 2003 Dec;10(23):2549-58.

DOBASHI Y. Cell cycle regulation and its aberrations in human lung carcinoma. **Pathol Int**. 2005 Mar;55(3):95-105.

DIX D, The role of aging in câncer incidence: Na epidemiological stdy. **J Gerontol, USA** 1989; 44: 10-18

CORDEIRO BF, OLIVEIRA ER, DA SILVA SH, SAVASSI BM, ACURCIO LB, LEMOS L, ALVES JL, CARVALHO ASSIS H, VIEIRA AT, FARIA AMC, FERREIRA E, LE LOIR Y, JAN G, GOULART LR, AZEVEDO V, CARVALHO RDO, DO CARMO FLR. Whey Protein Isolate-Supplemented Beverage, Fermented by *Lactobacillus casei* BL23 and *Propionibacterium freudenreichii* 138, in the Prevention of Mucositis in Mice. **Frontiers in Microbiology**. 2018 Sep 12;9:2035.

FOCACCETTI C, BRUNO A, MAGNANI E, BARTOLINI D, PRINCIPI E, DALLAGLIO K, BUCCI EO, FINZI G, SESSA F, NOONAN DM, ALBINI A. Effects of 5-fluorouracil on morphology, cell cycle, proliferation, apoptosis, autophagy and ROS production in endothelial cells and cardiomyocytes. **PLoS One**. 2015 Feb 11;10(2):e0115686.

FRANCO OE, SHAW AK, STRAND DW, HAYWARD SW. Cancer associated fibroblasts in cancer pathogenesis. **Semin Cell Dev Biol**. 2010 Feb;21(1):33-9.

FIDLER IJ. MOLECULAR BIOLOGY OF CANCER: INVASION AND METASTASIS. IN: DEVITA VT, HELLMAN S, ROSEMBERG AS (eds). Cancer: principles & practice of oncology. **Lipincott-Raven Publishers**, Philadelphia, 135-52, 1997.

FENG SS, CHIEN S. Chemotherapeutic engineering: Application and further development of chemical engineering principles for chemotherapy of cancer and other diseases. **Chem Eng Sci**, 58:4087–4114, 2003.

GREM JL. Mechanisms of Action and Modulation of Fluorouracil. **Semin Radiat Oncol**. 1997 Oct;7(4):249-259.

GUCWA K, KUSZNIEREWICZ B, MILEWSKI S, VAN DIJCK P, SZWEDA P. Antifungal Activity and Synergism with Azoles of Polish Propolis. **Pathogens**. 2018 Jun 19;7(2):56.

GUPTA A, DWIVEDI T. A Simplified Overview of World Health Organization Classification Update of Central Nervous System Tumors 2016. **Journal of Neurosciences in Rural Practice**. 2017 Oct-Dec;8(4):629-641.

HASSANPOUR SH, DEGHANI M. Review of cancer from perspective of molecular. **Journal of Cancer Research and Practice**, 2017 v. 4, n. 4, p. 127–129.

HAGENKORT, A. Exploiting Nucleotide Metabolism to Improve Cancer Therapy. 2016. 71 f. Tese (Doutorado em Bioquímica Médica e Biofísica). **Department of Medical Biochemistry and Biophysics**, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden, 2016.

HSU HC, CHEN MH, YEH ML, CHEN WJ. Antibacterial and Anticancer Activities of Pleurocidin-Amide, a Potent Marine Antimicrobial Peptide Derived from Winter Flounder, *Pleuronectes americanus*. **Mar Drugs**. 2022 Aug 14;20(8):519.

HOLTEDAHL K, BORGQUIST L, DONKER GA, BUNTINX F, WELLER D, CAMPBELL C, MÅNSSON J, HAMMERSLEY V, BRAATEN T, PARAJULI R. Symptoms and signs of colorectal cancer, with differences between proximal and distal colon cancer: a prospective cohort study of diagnostic accuracy in primary care. **BMC Fam Pract**. 2021 Jul 8;22(1):148.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer / **Instituto Nacional de Câncer**, Rio de Janeiro: Inca, 2011.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER José Alencar Gomes da Silva. Detecção precoce do câncer / **Instituto Nacional de Câncer**, José Alencar Gomes da Silva, Rio de Janeiro: INCA, 2021

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). Estimativa 2023 : incidência de câncer no Brasil / **Instituto Nacional de Câncer**, Rio de Janeiro : INCA, 2022.

IRIGARAY P, BELPOMME D. Basic properties and molecular mechanisms of exogenous chemical carcinogens. **Carcinogenesis**. 2010 Feb;31(2):135-48.

JAN, REHMAT; CHAUDHRY, GUL-E-SABA. Understanding Apoptosis and Apoptotic Pathways Targeted Cancer Therapeutics. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 9, n. 2, p. 205–218, 2019.

JEMAL A, WARD EM, JOHNSON CJ, CRONIN KA, MA J, RYERSON B, MARIOTTO A, LAKE AJ, WILSON R, SHERMAN RL, ANDERSON RN, HENLEY SJ, KOHLER BA, PENBERTHY L, FEUER EJ, WEIR HK. Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975-2014, Featuring Survival. **J Natl Cancer Inst**. 2017 Sep 1;109(9).

JUMPER J, EVANS R, PRITZEL A, GREEN T, FIGURNOV M, RONNEBERGER O, TUNYASUVUNAKOOL K, BATES R, ŽÍDEK A, POTAPENKO A, BRIDGLAND A, MEYER C, KOHL SAA, BALLARD AJ, COWIE A, ROMERA-PAREDES B, NIKOLOV S, JAIN R, ADLER J, BACK T, PETERSEN S, REIMAN D, CLANCY E, ZIELINSKI M, STEINEGGER M, PACHOLSKA M, BERGHAMMER T, BODENSTEIN S, SILVER D, VINYALS O, SENIOR AW, KAVUKCUOGLU K, KOHLI P, HASSABIS D. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. **Nature**. 2021 Aug;596(7873):583-589.

JUNTTILA MR, DE SAUVAGE FJ. Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. **Nature**. 2013 Sep 19;501(7467):346-54.

Keum N, Giovannucci E. Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**. 2019 Dec;16(12):713-732.

KLAUNIG JE, KAMENDULIS LM, XU Y. Epigenetic mechanisms of chemical carcinogenesis. **Human & Experimental Toxicology**. 2000 Oct;19(10):543-55

KOLCH W. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. **Biochem J**. 2000 Oct 15;351 Pt 2(Pt 2):289-305

KUMAR, S. Anticancer drug 5-fluorouracil induces reproductive and developmental defects in *Caenorhabditis elegans*. **Reproductive Toxicology**, v. 29, p. 415–420, 2010.

LEI J, SUN L, HUANG S, ZHU C, LI P, HE J, MACKEY V, COY DH, HE Q. The antimicrobial peptides and their potential clinical applications. **American Journal of Translational Research**. 2019 Jul 15;11(7):3919-3931.

LIOTTA LA, KOHN EC. The microenvironment of the tumour-host interface. **Nature**. 2001 May 17;411(6835):375-9. doi: 10.1038/35077241.

LODISH, B.; BERK, A.; ZIPURSKY, S.L.; MATSUDAIRA, P.; BALTIMORE, D.; DARNELL, J. **Molecular cell biology**. 5th ed. New York: W. H. Freeman; 2004.

LOPES, A; IYAYASU, H; CASTRO, RMRPS. **Oncologia para a graduação**. 2ª. edição. São Paulo-SP: Tecmed, 2008. 739p.

Longley, D., Harkin, D. & Johnston, P. 5-Fluorouracil: mecanismos de ação e estratégias clínicas. **Nat Rev Câncer** 3, 330–338 (2003).

LIMA PG, SOUZA PFN, FREITAS CDT, BEZERRA LP, NETO NAS, SILVA AFB, OLIVEIRA JTA, SOUSA DOB. Synthetic peptides against *Trichophyton mentagrophytes* and *T. rubrum*: Mechanisms of action and efficiency compared to griseofulvin and itraconazole. **Life Sciences**. 2021 Jan 15;265:118803.

LIMA PG, OLIVEIRA JTA, AMARAL JL, FREITAS CDT, SOUZA PFN. Synthetic antimicrobial peptides: Characteristics, design, and potential as alternative molecules to overcome microbial resistance. **Life Sciences**. 2021 Aug 1;278:119647.

LIU Y, YIN T, FENG Y, CONA MM, HUANG G, LIU J, SONG S, JIANG Y, XIA Q, SWINNEN JV, BORMANS G, HIMMELREICH U, OYEN R, NI Y. Mammalian models of chemically induced primary malignancies exploitable for imaging-based preclinical theragnostic research. **Quantitative Imaging in Medicine and Surgery**. 2015 Oct;5(5):708-29.

MAGALHÃES, TAFM. Efeito de uma suplementação com polpa de açaí (*Euterpe oleracea* Martius) em camundongos BALB/c com mucosite intestinal induzida por 5-fluorouracil. 2018. 114 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Nutrição, 68 Laboratório de Epidemiologia Molecular, **Universidade Federal de Ouro Preto**, Ouro PretoMg, 2018.

MAUGHAN NJ, QUIRKE P. Modern management of colorectal cancer - a pathologist's view. **Scandin J Surg**. 2003;92(1):11-9.

MARLEY AR, NAN H. Epidemiology of colorectal cancer. **Int J Mol Epidemiol Genet**. 2016 Sep 30;7(3):105-114.

Mareel M, Leroy A. Clinical, cellular, and molecular aspects of cancer invasion. **Physiol Rev**, 2003, v.83, p.337-376.

MATHEWS AA, DRAGANOV PV, YANG D. Endoscopic management of colorectal polyps: From benign to malignant polyps. **World J Gastrointest Endosc**. 2021 Sep 16;13(9):356-370.

Medema JP. Células-tronco cancerígenas: os desafios futuros. **Nat Cell Biol**. 2013 Abr; 15(4):338-44.

MESQUITA FP, MOREIRA-NUNES CA, DA SILVA EL, LIMA LB, DANIEL JP, ZUERKER WJ, BRAYNER M, DE MORAES MEA, MONTENEGRO RC. MAPK14 (p38 α) inhibition effects against metastatic gastric cancer cells: A potential biomarker and pharmacological target. **Toxicol In Vitro**. 2020 Aug;66:104839.

Mesquita FP, Pinto LC, Soares BM, de Sousa Portilho AJ, da Silva EL, de Farias Ramos IN, Khayat AS, Moreira-Nunes CA, Bezerra MM, de Lucas Chazin E, Vasconcelos TRA, Burbano RMR, de Moraes MEA, Montenegro RC. Small

benzothiazole molecule induces apoptosis and prevents metastasis through DNA interaction and c-MYC gene suppression in diffuse-type gastric adenocarcinoma cell line. **Chem Biol Interact**. 2018 Oct 1;294:118-127.

Ministério da Saúde. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para o Tratamento do Câncer Colorretal Metastático. Brasília: **Agência Nacional de Saúde Suplementar**, 2022.

MINHAS MU, AHMAD M, KHAN S, ALI L. Synthesis and characterization of β -cyclodextrin hydrogels: crosslinked polymeric network for targeted delivery of 5-fluorouracil. **Cellulose Chem and Technol**, 2016, v. 50, n. 2, p. 233-242.

MAGANA M, PUSHPANATHAN M, SANTOS AL, LEANSE L, FERNANDEZ M, IOANNIDIS A, GIULIANOTTI MA, APIDIANAKIS Y, BRADFUTE S, FERGUSON AL, CHERKASOV A, SELEEM MN, PINILLA C, DE LA FUENTE-NUNEZ C, LAZARIDIS T, DAI T, HOUGHTEN RA, HANCOCK REW, TEGOS GP. The value of antimicrobial peptides in the age of resistance. **Lancet Infectious Diseases**. 2020 Sep;20(9):e216-e230.

MORAVEJ H, MORAVEJ Z, YAZDANPARAST M, HEIAT M, MIRHOSSEINI A, MOOSAZADEH MOGHADDAM M, MIRNEJAD R. Antimicrobial Peptides: Features, Action, and Their Resistance Mechanisms in Bacteria. **Microbial Drug Resistance**. 2018 Jul/Aug;24(6):747-767.

MURPHY N, JENAB M, GUNTER MJ. Adiposity and gastrointestinal cancers: epidemiology, mechanisms and future directions. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**. 2018 Nov;15(11):659-670

NCI, 2023. Disponível em: www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer. Acesso em 20/fev. 2023.

OLIVEIRA JTA, SOUZA PFN, VASCONCELOS IM, DIAS LP, MARTINS TF, VAN TILBURG MF, GUEDES MIF, SOUSA DOB. Mo-CBP₃-PepI, Mo-CBP₃-PepII, and Mo-CBP₃-PepIII are synthetic antimicrobial peptides active against human pathogens by stimulating ROS generation and increasing plasma membrane permeability. **Biochimie**. 2019 Feb;157:10-21.

OLIVEIRA PA, COLAÇO A, CHAVES R, HENRIQUE GP. Chemical carcinogenesis. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 2007, v. 79, n. 4, p. 593–616.

PATRA S, PRADHAN B, NAYAK R, BEHERA C, ROUT L, JENA M, EFFERTH T, BHUTIA SK. Chemotherapeutic efficacy of curcumin and resveratrol against cancer: Chemoprevention, chemoprotection, drug synergism and clinical pharmacokinetics. **Semin Cancer Biol**. 2021 Aug;73:310-320.

PETUCO V, MARTINS CL. A experiência da pessoa estomizada com câncer: uma análise segundo o Modelo de Trajetória da Doença Crônica proposto por Morse e Johnson. **Revista Brasileira de Enfermagem**. 2006 mar-abr, v. 59, n. 2, p. 134- 41.

PEARSON-STUTTARD J, ZHOU B, KONTIS V, BENTHAM J, GUNTER MJ, EZZATI M. Worldwide burden of cancer attributable to diabetes and high body-mass index: a comparative risk assessment. **Lancet Diabetes Endocrinol**. 2018 Jun;6(6):e6-e15.

PELSE C, AREM H, PFEIFFER RM, ELENA JW, ALFANO CM, HOLLENBECK AR, PARK Y. Prediagnostic lifestyle factors and survival after colon and rectal cancer diagnosis in the National Institutes of Health (NIH)-AARP Diet and Health Study. **Cancer**. 2014 May 15;120(10):1540-7.

Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev*. 2007 Jan;20(1):133-63.

QUAIL DF, JOYCE JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. **Nature Medicine**. 2013 Nov;19(11):1423-37.

ROLÓN M, VEGA C, ESCARIO JA, GÓMEZ-BARRIO A. Development of resazurin microtiter assay for drug sensibility testing of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Parasitology Research, Germany*, v. 99, n. 2, p. 103-7. Jul. 2006.

RUTMAN RJ, CANTAROW A, PASCHKIS KE. The catabolism of uracil in vivo and in vitro. **J Biol Chem**. 1954 Sep;210(1):321-9.

RUTTER CM, JOHNSON EA, FEUER EJ, KNUDSEN AB, KUNTZ KM, SCHRAG D. Secular trends in colon and rectal cancer relative survival. **J Natl Cancer Inst**. 2013 Dec 4;105(23):1806-13

SANTOS JJCM. Câncer Ano-Reto-Cólico: Aspectos Atuais II – Câncer Colorretal – Fatores de Riscos e Prevenção. **Rev bras Coloproct** .2007 27(4): 459-473.

Santo La M de C. Estimativa de Incidência de Câncer No Brasil, 2023-2025. **Rev. Bras. Cancerol**. [Internet]. 6º de febril de 2023 [Citado 26º de Maio de 2024]; 69 (1): E-213700. Disponível em: <https://rbc.inca.gov.br/index.php/revista/article/view/3700>

SINHA R, SHUKLA P. Antimicrobial Peptides: Recent Insights on Biotechnological Interventions and Future Perspectives. **Protein & Peptide Letters**. 2019;26(2):79-87.

Silva PM, Gonçalves S, Santos NC. Defensins: antifungal lessons from eukaryotes. **Front Microbiol**. 2014;5:97. Published 2014 Mar 20.

SETHY C, KUNDU CN. 5-Fluorouracil (5-FU) resistance and the new strategy to enhance the sensitivity against cancer: Implication of DNA repair inhibition. **Biomed Pharmacother**. 2021 May;137:111285

SIEGEL RL, MILLER KD, FUCHS HE, JEMAL A. Cancer Statistics, 2021. **CA Cancer J Clin**. 2021 Jan;71(1):7-33.

SMITH CL, GEIER MS, YAZBECK R, TORRES DM, BUTLER RN, HOWARTH GS. *Lactobacillus fermentum* BR11 and fructo-oligosaccharide partially reduce jejunal inflammation in a model of intestinal mucositis in rats. **Nutr Cancer**. 2008;60(6):757-67.

SÓRIA DAC, BITTENCOURT AR, MENEZES MFB, SOUZA CAC, SOUZA SR. Resiliência na área da Enfermagem em Oncologia. **Acta Paulista deenfermagem**. 2009 v. 22, n. 5, p. 702-706.

SOUZA PFN, MARQUES LSM, OLIVEIRA JTA, LIMA PG, DIAS LP, NETO NAS, LOPES FES, SOUSA JS, SILVA AFB, CANEIRO RF, LOPES JLS, RAMOS MV, FREITAS CDT. Synthetic antimicrobial peptides: From choice of the best sequences to action mechanisms. *Biochimie*. 2020 Aug;175:132-145.

SOUZA MVN, GONÇALVEZ RSB, PINHEIRO AC, FERREIRA MLL. Produtos naturais em fase avançada de testes clínicos no tratamento contra o câncer. *Natural Products in Advance Clinical Trials Applied to Cancer*. 2007 **Revista Fitos**, 3:25–42.

SONOBE HM, BARICHELLO E, ZAGO MMF. A visão do colostomizado sobre o uso da bolsa de colostomia. **Revista Brasileira de Cancerologia**, 2002; 48(3): 341-48.

SERETIS C, KAISARI P, WANIGASOORIYA K, SHARIFF U, YOUSSEF H. Malnutrition is associated with adverse postoperative outcome in patients undergoing elective colorectal cancer resections. **J BUON**. 2018 Jan-Feb;23(1):36-41

Sociedade Brasileira de Oncologia Clínica – SBOC Recomendações de atividade física durante e após tratamento oncológico. / Sociedade Brasileira de Oncologia Clínica. Instituto Nacional de Câncer. **Sociedade Brasileira de Atividade Física e Saúde**, São Paulo: SBOC, 2023.

SUNG H, FERLAY J, SIEGEL RL, 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 Cancer J Clin**. 2021 May;71(3):209-249.

SOUZA PFN, MARQUES LSM, OLIVEIRA JTA, LIMA PG, DIAS LP, NETO NAS, LOPES FES, SOUSA JS, SILVA AFB, CANEIRO RF, LOPES JLS, RAMOS MV, FREITAS CDT. Synthetic antimicrobial peptides: From choice of the best sequences to action mechanisms. **Biochimie**. 2020 Aug;175:132-145.

STANISZEWSKA, M. *et al.* Morfologias de *Candida albicans* reveladas por análise de microscopia eletrônica de varredura. **Brasileiro J. Microbiol.** 44 , 813–821 (2013).

TABUNG FK, BROWN LS, FUNG TT. Dietary Patterns and Colorectal Cancer Risk: A Review of 17 Years of Evidence (2000-2016). **Curr Colorectal Cancer Rep**. 2017 Dec;13(6):440-454.

TAN, P. F. *et al.* Design, optimization, and nanotechnology of antimicrobial peptides: From exploration to applications. **Nano Today**, v. 39, p. 101229, 2021.

THANIKACHALAM K, KHAN G. Colorectal Cancer and Nutrition. **Nutrients**. 2019 Jan 14;11(1):164.

TSUNODA T, TAKASHIMA Y, FUJIMOTO T, KOYANAGI M, YOSHIDA Y, DOI K, TANAKA Y, KUROKI M, SASAZUKI T, SHIRASAWA S. Three-dimensionally specific inhibition of DNA repair-related genes by activated KRAS in colon crypt model. **Neoplasia**. 2010 May;12(5):397-404.

US PREVENTIVE SERVICES TASK FORCE; BIBBINS-DOMINGO K, GROSSMAN DC, CURRY SJ, DAVIDSON KW, EPLING JW JR, GARCÍA FAR, GILLMAN MW, HARPER DM, KEMPER AR, KRIST AH, KURTH AE, LANDEFELD CS, MANGIONE CM, OWENS DK, PHILLIPS WR, PHIPPS MG, PIGNONE MP, SIU AL. Screening for Colorectal Cancer: US Preventive Services Task Force Recommendation Statement. **JAMA**. 2016 Jun 21;315(23):2564-2575.

US PREVENTIVE SERVICES TASK FORCE; DAVIDSON KW, BARRY MJ, MANGIONE CM, CABANA M, CAUGHEY AB, DAVIS EM, DONAHUE KE, DOUBENI CA, KRIST AH, KUBIK M, LI L, OGEDEGBE G, OWENS DK, PBERT L, SILVERSTEIN M, STEVERMER J, TSENG CW, WONG JB. Screening for Colorectal Cancer: US Preventive Services Task Force Recommendation Statement. **JAMA**. 2021 May 18;325(19):1965-1977.

Van Cutsem E, Cervantes A, Adam R, et al. ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. **Ann Oncol**. 2016;27(8):1386-1422.

VARADI M, ANYANGO S, DESHPANDE M, NAIR S, NATASSIA C, YORDANOVA G, YUAN D, STROE O, WOOD G, LAYDON A, ŽÍDEK A, GREEN T, TUNYASUVUNAKOOL K, PETERSEN S, JUMPER J, CLANCY E, GREEN R, VORA A, LUTFI M, FIGURNOV M, COWIE A, HOBBS N, KOHLI P, KLEYWEGT G, BIRNEY E, HASSABIS D, VELANKAR S. AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. **Nucleic Acids Res**. 2022 Jan 7;50

WILHELM M, MUELLER L, MILLER MC, LINK K, HOLDENRIEDER S, BERTSCH T, KUNZMANN V, STOETZER OJ, SUTTMANN I, BRAESS J, BIRKMANN J, ROESSLER M, MORITZ B, KRAFF S, SALAMONE SJ, JAEHDE U. Prospective, Multicenter Study of 5-Fluorouracil Therapeutic Drug Monitoring in Metastatic Colorectal Cancer Treated in Routine Clinical Practice. **Clin Colorectal Cancer**. 2016 Dec;15(4):381-388.

Wicki A, Herrmann R, Christofori G. Kras in metastatic colorectal cancer. *Swiss Med Wkly*. 2010;140:w13112. **Published** 2010 Nov 19.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2020. Cancer key factors. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today/en/dataviz/globe> . Acesso em: 10/dez. 2023.

Yibing Huang, Jinfeng Huang, Yuxin Chen, Alpha-helical cationic antimicrobial peptides: relationships of structure and function, *Protein & Cell*, Volume 1, Issue 2, February 2010, Pages 143–152

YOSHIZAWA R, UMEKI N, YANAGAWA M, MURATA M, SAKO Y. Single-molecule fluorescence imaging of RalGDS on cell surfaces during signal transduction from Ras to Ral. **Biophys Physicobiol**. 2017 Jun 1;14:75-84.

WANG LH, WU CF, RAJASEKARAN N, SHIN YK. Loss of Tumor Suppressor Gene Function in Human Cancer: An Overview. **Cell Physiol Biochem**. 2018;51(6):2647-2693.

WILD CP, WEIDERPASS E, STEWART BW. (ed.) World cancer report: cancer research for cancer prevention. Lyon, France. **International Agency for Research on Cancer**, 2020.

WON, HS *et al.* Determinantes estruturais para a interação de membrana de novos undecapeptídeos bioativos derivados de gaegurina 5. *J. Med. Química*. 49 , 4886–4895 (2006).

ZHANG N, YIN Y, XU SJ, CHEN WS. 5-Fluorouracil: mechanisms of resistance and reversal strategies. **Molecules**. 2008 Aug 5;13(8):1551-69.

ZHANG Q, LIU RX, CHAN KW, HU J, ZHANG J, WEI L, TAN H, YANG X, LIU H. Exosomal transfer of p-STAT3 promotes acquired 5-FU resistance in colorectal cancer cells. **J Exp Clin Cancer Res**. 2019 Jul 19;38(1):320.

ZHANG LJ, GALLO RL. Antimicrobial peptides. **Curr Biol**. 2016 Jan 11;26(1):R14-9.

ZHANG JT, ZHOU WL, HE C, LIU T, LI CY, WANG L. 5-Fluorouracil induces apoptosis of colorectal cancer cells. **Genet Mol Res**. 2016 Mar 4;15(1):15017326.

Capítulo 1

Repositioning synthetic antimicrobial peptides against cancer

Francisco Laio de Oliveira

Submetido para: Scientific Reports FI: 4.996

Repositioning synthetic antimicrobial peptides against cancer

Felipe P. Mesquita^{1†}, Francisco L. de Oliveira^{1†}, Emerson L. da Silva¹, Daiane M. S. Brito²,
Maria E. A. de Moraes¹, Pedro F. N. Souza^{1,2*}, Raquel C. Montenegro^{1,3*}

¹Pharmacogenetics Laboratory, Drug Research and Development Center (NPDM), Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, 60430-275, Brazil.

²Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil

³Red Latinoamericana de Implementación y Validación de guías clínicas Farmacogenómicas (*RELIVAF*).

† **These authors share the first authorship**

* **These authors are Correspondent authors:**

Raquel C. Montenegro (rcm.montenegro@gmail.com - R.C.M.)

Pedro F. N. Souza (pedrofilhobio@gmail.com - P.F. N. S)

Address: Laboratory of Pharmacogenetics, Drug Research and Development Center (NPDM), Federal University of Ceará, Street Cel. Nunes de Melo, 1000 – Rodolfo Teófilo, Fortaleza, Ceará, Brazil. Phone: +55 (85) 3366-8033.

Abstract

Cancer resistance to drugs and chemotherapy is a problem faced by public health systems worldwide. Repositioning antimicrobial peptides could be an efficient strategy to overcome that problem. This study aimed at repositing antimicrobial peptides, PepGAT and PepKAA for cancer treatment. After screening against several cancers, PepGAT and PepKAA presented an IC₅₀ of 125.42 and 40.51 μ M toward colorectal cancer (CRC) cells. The mechanisms of action revealed that both peptides induced cell cycle arrest and drove HCT-116 cells to death by triggering apoptosis. Yet, peptides induced ROS overaccumulation, increased membrane permeabilization, pore formation and loss of internal content, leading to death. Additionally, peptides were able to inhibit the cell invasion. *In silico* analysis predicted that peptides could interact with the KRAS receptor, inducing conformational changes in 3D structure suggesting impairment in its activity. Previous studies from the same group attested no toxicity to normal human cells. Thus, PepGAT and PepKAA have great potential to be candidates as anticancer molecules.

Keywords: Anticancer peptides; colorectal cancer; synthetic peptides.

INTRODUCTION

Cancer is a global problem, with an estimated 19.3 million new cases being one of the leading causes of death worldwide, accounting for nearly 10 million deaths in 2020. The most common types of cancer worldwide are breast cancer, lung cancer, gastric cancer, leukemia, and colorectal cancer. Cancer can be treated in various ways, depending on the severity of the patient's condition and the stage of the cancer. Surgical resection is mostly employed for localized non-metastatic stages depending on the location of the tumor and the stage of the cancer¹⁻³.

Yet, chemotherapy is a rapidly growing method that utilizes drugs to interfere with the processes in cancer cells, such as their growth, development, dissemination, migration, and invasion, thus reducing the tumor or preventing cancer progression. This treatment can be carried out using a single drug or a combination of drugs, which is the most used approach due to its higher efficiency and more satisfactory response⁴⁻⁶. Chemotherapy aims to stimulate cell death mechanisms, which can be triggered by direct or indirect DNA damage, resulting in the dysregulation of tumor replication by genotoxic agents. These agents can be endogenous, such as reactive oxygen species (ROS), and exogenous, such as UV light, ionizing radiation (IR), and chemotherapeutic agents^{7,8}.

The huge problem in cancer therapy is the development of resistance, limiting the cure in patients. Cancer can develop resistance virtually to all types of therapies, such as radiotherapy, chemotherapy and even targeted therapies⁹. Natural and adaptative resistance of cancer cells results from complex and collaborative events in the cellular response to drugs¹⁰. Cancer resistance is classified as pharmacokinetic, which is the alteration of intracellular concentration of drugs, and pharmacodynamic, related to failure to induce toxicity¹⁰. This scenario urgently requires the development of new drugs to overcome the resistance or even help the already available drugs to become effective again.

Regarding alternative molecules, synthetic peptides (SAMPs) have already been studied and used as antimicrobial peptides due to their low toxicity levels and high activity^{11,12}. Recent studies have revealed that the mechanism of action of antimicrobial synthetic peptides involves inducing the formation of pores in the cell membrane, thereby increasing intracellular concentration¹¹⁻¹⁴, which could also affect cancer cells. Therefore, this study explored how antimicrobial SAMPs could be repositioned to induce cytotoxicity in cancer cells and reveal insight into the mechanism of action behind anticancer activity.

Methodology

Ethical Statement

Not applied for this study.

Cell culture

AGP-01 (gastric adenocarcinoma), HCT-116 (colon cancer), MCF7 (cancer of breast) and SKMEL19 (malignant skin melanoma), cell line was thawed and maintained with DMEM medium (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) supplemented with 10% FBS (fetal bovine

serum) and 1% antibiotics (penicillin/streptomycin 5000U/5000 μ g/mL). The cells were regularly maintained in a CO₂ incubator at 37 °C monitored using an inverted microscope (Leica DMIL LED). For maintenance or experimental manipulation, the cells were subjected to one wash with sterile PBS (Phosphate Buffer Solution) and detached using trypsin-EDTA 0.5% (0.25% v/v in 1x PBS). After dissociation, the trypsin-EDTA was inactivated, cells were counted, and experiments were carried out.

Cytotoxicity by Alamar Blue assay

The Alamar Blue reagent evaluated the cytotoxicity of anticancer peptides and the positive control 5-FU (Fluorouracil). First, the anticancer peptides were tested with a single concentration (100 μ g/mL) against all cancers. Second, a curve concentration response for peptides (0 μ g/mL – 200 μ g/mL), 5-FU (0 nM – 40 nM). For both experiments, 3 x 10³ cells per well were seeded in a 96-well plate with a total treatment time of 72 hours. Following the treatment, the Alamar Blue was added at 0.2 mg/mL and incubated for 3 hours. Finally, the fluorescent signal was read by BioTek Synergy H1 (BioTek, Winooski, VT) plate reader at 560/590nm excitation/emission¹⁵.

Cell cycle analysis

In investigating the effects of peptides and 5-FU on the cell cycle, cells (3 x 10⁴ cells per well) were plated in a 24-well and incubated for 24 hours. Afterward, they were treated with 5-FU (23 nM) and peptides at IC₅₀ for 24 hours. Subsequently, the cells were harvested from all wells, collected, and centrifuged at 1500 RPM for 5 minutes. The pellet was then resuspended and fixed in 80% ethanol solution at 4°C for 30 minutes to allow cell permeabilization. After centrifugation, the cells were resuspended and incubated with propidium iodide (50 μ g/mL) for 25 minutes. The cells were then centrifuged again and

resuspended in 1X PBS. A total of 10,000 events for each sample were analyzed by flow cytometry (BD FACSVerser™). FlowJo software was used to analyze the flow cytometry data^{16,17}.

Apoptosis Analysis

The apoptosis induction in HCT-116 cells was performed by plating 3×10^4 cells per well in a 12-well plate and treating for 24 h with the peptides (IC50) and 5-FU (IC50). After treatment, cells were washed with PBS and resuspended in 200 μ L annexin binding buffer consisting of 4 μ L annexin V-FITC and further incubated with propidium iodide (PI) for 20 minutes (BD Pharmingen™ FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I). Afterward, they were resuspended in PBS and a total of 10,000 events for each sample were analyzed by flow cytometry (BD FACSVerser™).

Fluorescence microscopy

PI was used and analyzed by flow cytometry to investigate the integrity of the cell membrane. HCT-116 cells (3×10^4 cells per well) were seeded in a 24-well plate and incubated with peptides for 24 hours, after, for 24h with the peptides (IC50) and 5-FU (IC50). At the end of the treatment, the cells were removed from the plate, centrifuged, and resuspended in different fluorophore dyes for membrane porosity determination, reactive oxygen species (ROS), and caspase 3 and 7 activation. For membrane permeability, the cells were incubated with propidium iodide (5 μ g/mL) for 15 minutes and Dextran-FITC (10 μ M) for 1 hour. The cells were incubated with DCFH-DA dye (10 μ M) for 30 minutes for ROS determination. Cells were stained for caspase 3 and 7 activation using the CellEvent Caspase-3/7 kit (Thermo Fisher Scientific) with 5 μ M for 30 minutes. After that, the cells were analyzed under a fluorescence microscope (Olympus System BX60, Olympus, Tokyo, Japan).

Invasion assay

The invasion assay used Transwell inserts with 8 μm pore size and Matrigel coating in 6-well plates (FALCON®). Matrigel (20 μL) diluted in pure DMEM at a 1:6 ratio was added to the inside of each insert and incubated at 37 °C with 5% CO_2 until the solution solidified (Vasconcelos et al., 2018; Mesquita et al., 2018). Next, 1 mL of serum-free DMEM with a concentration of 40×10^4 HCT-116 cells were added to each insert and treated (upper chamber) with 5-FU (10 nM and 23 nM) and with synthetic peptides (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). In the outside wells, 2 mL of DMEM with 10% FBS was added. After 24 hours of incubation, the inner part of the insert was discarded, and the remaining cells that had invaded the matrix and reached the other side of the membrane were fixed and stained. The cells that crossed the pores and remained on the lower surface of the insert were stained with Giemsa dye and counted using an inverted microscope¹⁸.

Cell membrane integrity assay

It was also evaluated whether peptides could induce pore formation in the membranes of HCT-116 cancer cell lines by performing the PI uptake assay described by Oliveira et al. ¹². After the anticancer assay (under the same conditions described above), the samples were washed three times with 0.15 M NaCl (centrifuged 5000 x g 5 min at 4 °C), incubated with PI at 1 μM for 30 min at room temperature in the dark, and analyzed under a fluorescence microscope (Olympus System BX60) with an excitation wavelength of 488 nm and an emission wavelength of 525 nm. In the same experiment, cells were also incubated with 10 μM of conjugated fluorescein isothiocyanate (FITC)-Dextran with a size of 6 kDa (Sigma Aldrich, SP, SP, Brazil), 30 min at 25 °C in the dark, washed as the same for PI and analyzed with an excitation wavelength of 490 nm and emission wavelength of 520 nm following the method described by Oliveira et al. ¹².

ROS overproduction and apoptosis induction

To evaluate the peptide-induced ROS generation (H_2O_2), a fluorometric assay with DCFH-DA (2',7' dichlorofluorescein diacetate) was performed. After the anticancer assay, the samples were washed with NaCl 0.15 M (centrifuged 5000 x g for 10 min at 4 °C). Next, 9 μ L of DCFH-DA was added, and cells were incubated for 20 min at 22 ± 2 °C in the dark. Then, the samples were washed two times as described above and observed with a fluorescence microscope (Olympus System BX 41, Tokyo, Japan) with an excitation wavelength of 535 nm and an emission wavelength of 617 nm¹⁹.

The caspase activity was measured after cell incubation for 24 h, in the presence and absence of peptides, according to the methodology described by Qorri and Harless [15], with some modifications. The cells were treated as above and then incubated using a 3 μ L CellEvent[®] reagent (ThermoFisher, São Paulo, SP, Brazil) for 30 min in the dark. After, cells were washed and centrifuged as above-mentioned. Finally, the cells were observed under a fluorescence microscope (Olympus System BX60) with an excitation wavelength of 342 nm and an emission wavelength of 441 nm²⁰.

Scanning Electron Microscopy (SEM)

The cancer cells untreated and treated with peptides were prepared and analyzed by SEM following Staniszewska et al.²¹. After the anticancer assay described previously, cells were fixed with 1% (v/v) glutaraldehyde in 0.15 M sodium phosphate buffer at pH 7.2 for 16 h. Next, the cells were washed three times with sodium phosphate buffer at pH 7.2 and centrifuged (5000 x g for 5 min at 4 °C) each time. Then, samples were dehydrated with increased ethanol concentrations (30%, 50%, 70%, 100% and 100% [v/v]) for 10 min each at 25 °C and centrifuged as above each time. The final dehydration was performed with 50% (v/v) hexamethyldisilane (HDMS, Sigma, St. Louis, MI, USA) diluted in ethanol for 10 min, centrifuged as above, and then dehydrated with 100% HDMS. The dried cells were placed into a covered glass with a gold cloud using a coating machine (Emitech-Q150TES, Quorum

Technologies, Lewes, England) and a positron-emission tomography (PET). SEM analyses were run in a scanning electron microscope (Quanta 450 FEG, FEI, Waltham, MA) with a magnification of 20000x.

In silico analysis

3D structures obtention

The most significant genes found were then used to get the 3D structure of correlated proteins by accessing the Protein Databank (<https://www.rcsb.org/>)^{22,23} or AlphaFold (<https://www.alphafold.com/>)^{24,25}. For the PDB accessions, the best model was used based on the resolution of the X-ray. In the case of AlphaFold, the per-residue confidence score (pLDDT) provided by the AlphaFold Protein Structure Database and the FASTA amino acid sequence coverage analysis was considered to select the 3D structure. The PyMOL Molecular Graphics System (version 2.5.4, Schrödinger, LLC)²⁶ was employed to analyze the 3D structures of proteins and BIOVIA Discovery Studio Visualizer (version 21.1.0.20298)²⁷ tools were used to analyze the docking conformation of the protein-ligand complex and the types of connection involved.

Molecular docking (MD) assays

The blind MD assays were performed in the ClusPro (<https://cluspro.org/help.php>)²⁸⁻³¹ for protein-protein and protein-peptide docking. The target protein was set as “receptor” and the peptides as “ligand”. After docking assays, the poses provided by Cluspro were analyzed and compared to a natural ligand of the target. After that, the best poses were selected and evaluated for the highest docking value to choose the best pose. At the end of the molecular docking assay, the final output compounds were ranked based on their minimum target binding energy. The PyMOL Molecular Graphics System (version 2.5.4, Schrödinger, LLC)²⁶ and

BIOVIA Discovery Studio Visualizer (version 21.1.0.20298)²⁷ tools were used to analyze the docking conformation of the protein-ligand complex and the types of connection involved.

Statistical analysis

The experiments were performed with three biological replicates and three technical replicates for each experiment. All data are shown as a mean deviation. In the in vitro experiments, analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni's post-test or Student's t-test was employed to compare the negative control (0.1% DMSO) with the treated groups. The Mann–Whitney or Kruskal–Walli's test was used to compare normal (healthy) gastric tissue samples in the gene expression with clinical specimens. Significant differences were considered with an interval of 95% ($p < 0.05$). GraphPad Prism 5.01 was used for data analysis and graph design.

RESULTS

Synthetic peptides display cytotoxic activity against Colorectal cancer cell line

The synthetic peptides PepGAT and PepKAA, at a concentration of $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, were tested against four cell lines: AGP-01 (gastric adenocarcinoma), HCT-116 (colon cancer), MCF7 (cancer of breast), and SKMEL19 (malignant skin melanoma) (Fig 1). The positive control for cytotoxicity to cancer cells was 5-Fluorouracil (5-FU, 23 nM) and the non-toxic control was 0.1% of DMSO (Fig. 1). Given the fact that the concentration of 5-FU is expressed in M, for comparison reasons, the concentration of peptides was expressed to the same unit of 5-FU. Therefore, $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ corresponded to $95 \mu\text{M}$ for PepGAT and $81 \mu\text{M}$ for PepKAA. Among the cancer cell lines tested, the most affected was HCT-116, with an inhibition of 58.69% for PepGAT ($95 \mu\text{M}$) and 56.85% for PepKAA ($81 \mu\text{M}$) (Fig. 1).

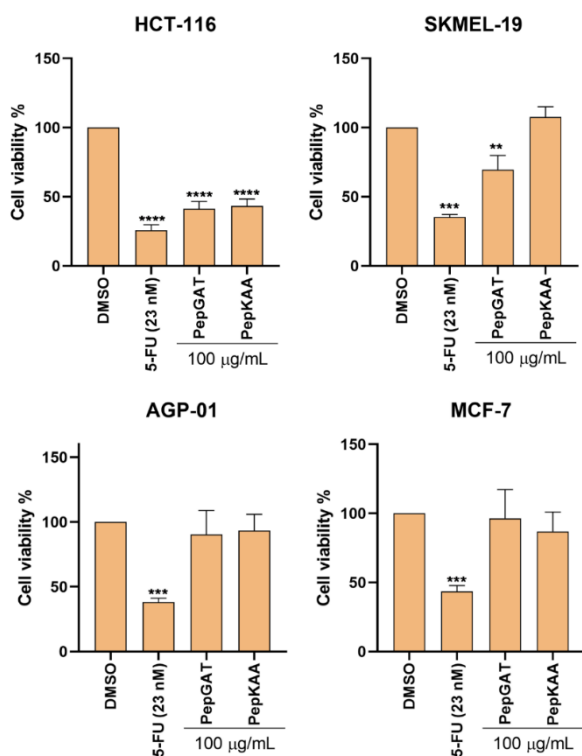


Figure 1 - Cell viability assay was performed to evaluate the viability against four cancer cell lines, AGP01, HCT-116, MCF7, and SKMEL19, treated with 5-FU (23 μM) and PepGAT at 95 μM and PepKAA at 81 μM (both at 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) for 72 h. Data are represented as mean \pm standard deviation of three independent experiments. Groups were compared to negative control (DMSO) using ANOVA and Tukey's posttest. Significant differences: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

Due to the results against HCT-116, it was determined the potency efficacy by employing a serial dilution curve (Table 1). The results revealed an IC₅₀ of 23 nM, 125.42 μM , and 40.51 μM , respectively, for 5-FU, PepGAT and PepKAA against HCT-116 (Table 1).

Table 1 - Cytotoxicity of 5-FU and peptides against colorectal cancer cell line (HCT-116)

Compound	IC ₅₀	CI 95%
PepGAT	125.42 μM	82.9 – 257.1
PepKAA	40.51 μM	43.3 – 59.5
5-FU	23.3 nM	14.5 – 37.1

IC [95%]: 95% confidence interval, IC₅₀: half-maximal inhibitory concentration.

Induction of cell cycle arrest on HCT-116 cells by PepGAT and PepKAA

The mechanisms of action were assessed to shed light on the events behind the anti-HCT-116 effect of peptides. Firstly, it was evaluated whether peptides could interfere with the cell cycle of HCT-116 cells. As expected, DMSO did not affect the cell cycle of HCT-116 cells and 5-FU 23 nM had its expected arrest in the S phase (Fig. 2A). The peptides, however, did affect the cell cycle of HCT-116 cells, leading to a higher number of HCT-116 cells in Sub-G1 indicating fragmentation of the nucleus (Fig. 2B), reduction in the number of cells in S phase (Fig. 2C), and cell cycle arrest in the G2/M phase (Fig. 2E).

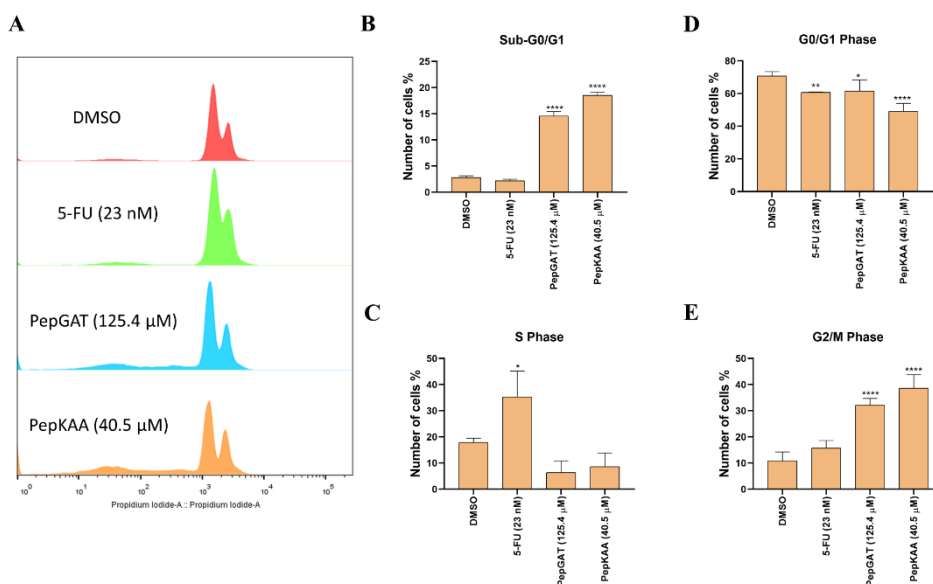


Figure 2– Cell cycle distribution of HCT-116 cells after treatment with PepGAT and PepKAA at IC₅₀ concentration and 5-FU at IC₅₀ concentration. The cell distribution in the Sub-G1, G0/G1, S, and G2/M phases, calculated using FlowJo® software, are represented as mean ± standard deviation of three independent experiments. Groups were compared to negative control (DMSO) using ANOVA and Tukey’s posttest. Significant differences: *P < 0.05; **P<0.01; ***P<0.001; ****P<0.0001.

PepGAT and PepKAA induces caspase 3 and 7 and activates the apoptosis pathway in HCT-116 by promoting ROS overproduction

Flow cytometry was performed using PI and Annexin V assay to verify whether the peptides promote cell death after treatment (Figure 3A). The results showed an increase in apoptotic cells (IP + / Annexin V+) in the HCT-116 cells treated with the peptides compared to the control group (Figure 3B).

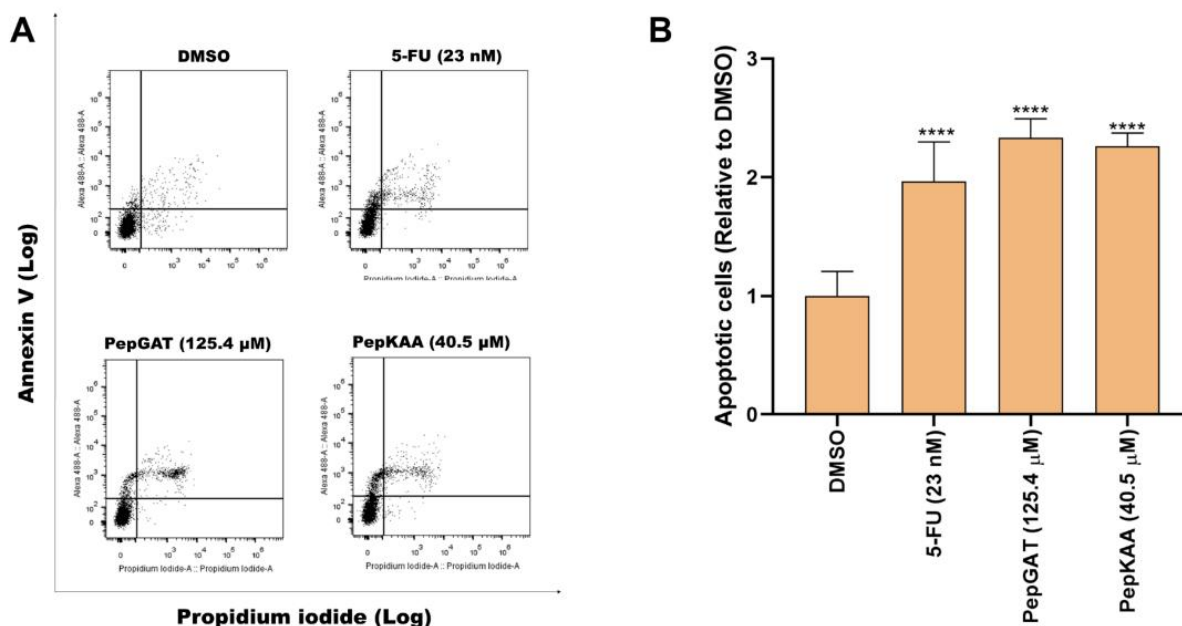


Figure 3 – Cell death determination of HCT-116 cells after treatment with PepGAT at 95 μM , PepKAA at 81 μM (bot at 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$), and 5-FU (10 nM and 23 nM). Data are represented as mean \pm standard deviation of three independent experiments. Groups were compared to negative control (DMSO) using ANOVA and Tukey's posttest. Significant differences: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$.

The triggering of the apoptotic death pathway revealed by flow cytometry was confirmed by the activation of caspases 3 and 7 evaluated under fluorescence microscopy (Figure 4A). As revealed, DMSO or 5-FU 23 nM treated cells did not show any fluorescence, indicating no activation of caspases 7/3 on HCT-116 cells (Fig. 4A). In contrast, PepGAT and PepKAA greatly induced the apoptosis mediated by caspase 3/7 (Fig. 4A). In the same context, it was analyzed whether peptides could induce ROS overaccumulation in HCT-116 cells, which works a trigger for cell death. As expected, DMSO- and 5-FU treated cells did not accumulate higher levels of ROS. However, in contrast, PepGAT and PepKAA induced ROS overaccumulation, as revealed by green fluorescence in treated cells (Fig. 4B).

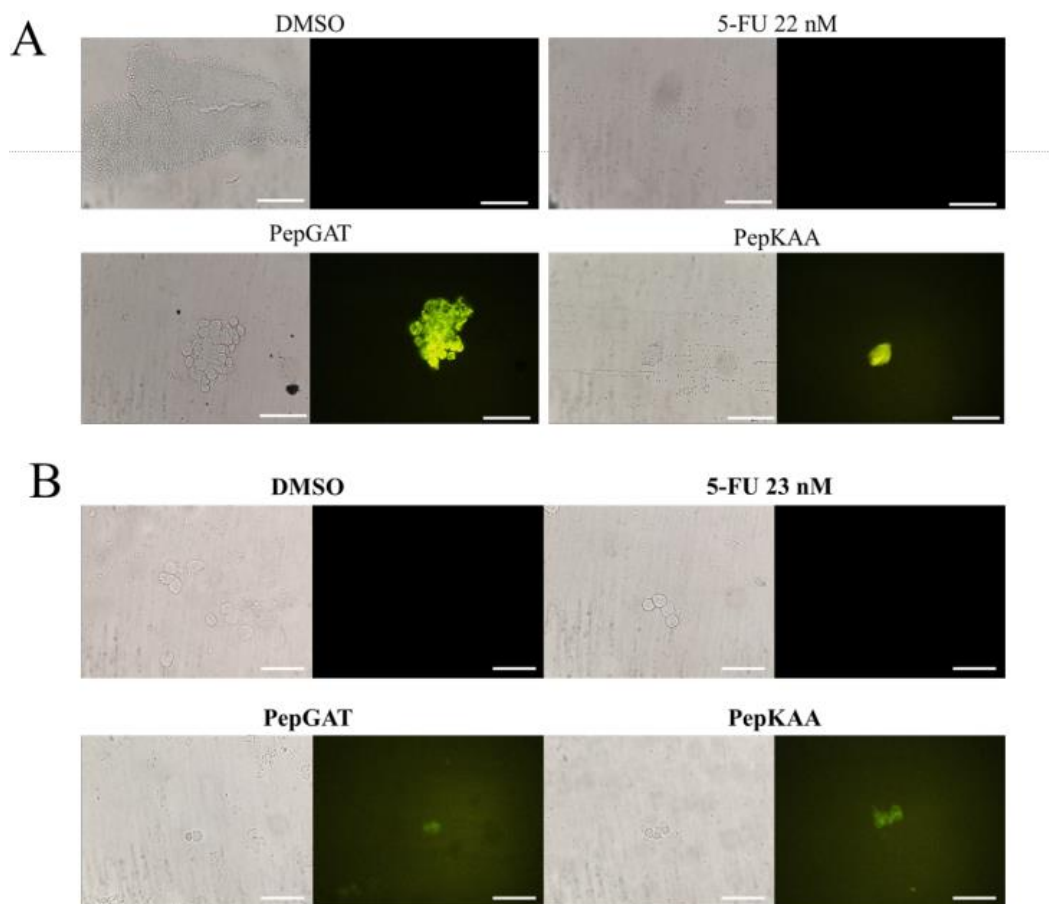


Figure 4 – (A) caspase 3/7-mediated (CellEvent™ Caspase-3/7 Detection Reagent) apoptosis and (B) ROS (DCFH-DA dye) overaccumulation in HCT-116 cells after treatment with PepGAT and PepKAA at IC50 and 5-FU (IC50). White bars indicate 100 μm .

PepGAT and PepKAA induce morphological changes and damage in the membrane of HCT-116 cells

SEM analysis provided new information about how peptides induced morphological changes in HCT-116 cells (Fig. 5). Control cells treated with DMSO (Fig. 5 – Control panel) and 23 nM 5-FU (Fig. 5 – 5-FU 23 nM panel) presented no damage to the cell morphology, spherical shape, normal cellular volume, and smooth surface. Otherwise, HCT-116 cells treated with peptides are completely damaged. PepGAT-treated HCT-116 cells presented severe and lethal damage to their morphology, such as alterations in cell shape, rough surface, cracks, cell

deformation, and loss of internal content, indicating pore formation and membrane damage (Fig. 5 – PepGAT panels). Likewise, PepKAA-treated (Fig. 5 – PepKAA panels) cells presented alteration in cell surface with increased roughness, cell deformation, and loss of internal content.

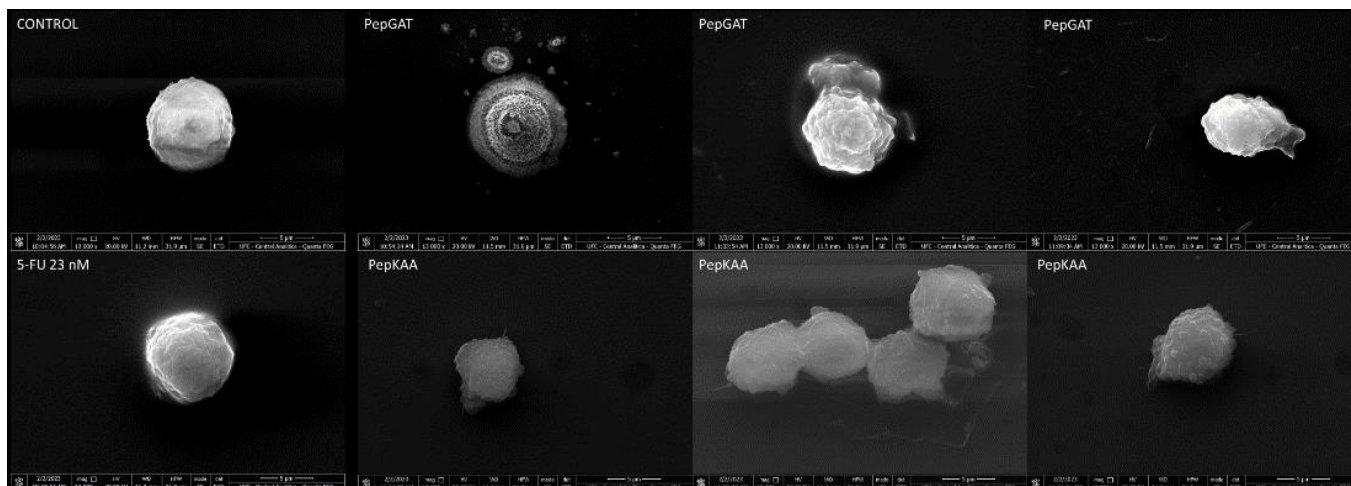


Figure 5 – SEM analysis of HCT-116 cells after treatment with PepGAT and PepKAA at IC50 and 5-FU at IC50.

The idea of pore formation presented by SEM analysis was further corroborated by serial fluorescence experiments in Figure 6. The PI uptake assay revealed that the treatment with peptides increased the membrane permeability of HCT-116 cells due to the red fluorescence in treated cells, which indicates PI's movement through the membrane (Fig. 6A). Moreover, the PI uptake assay by itself is just a suggestion of membrane permeabilization, not necessarily indicative of pore formation. Therefore, a second experiment using a Dextran-FITC with a size of 6-kDa was performed. HCT-116 cells treated with peptides revealed a slight green fluorescence, indicating the movement of Dextran-FITC through the membrane (Fig. 6B). This result suggests that the pore formed has, at least, 6-kDa, allowing the accumulation of dextran-FITC within HCT-116 cells. The combination of peptides was also effective in inducing pore formation in HCT-116 cells (Fig. 6B). However, both controls DMSO and 5-FU alone could increase membrane permeabilization or induce pore formation.

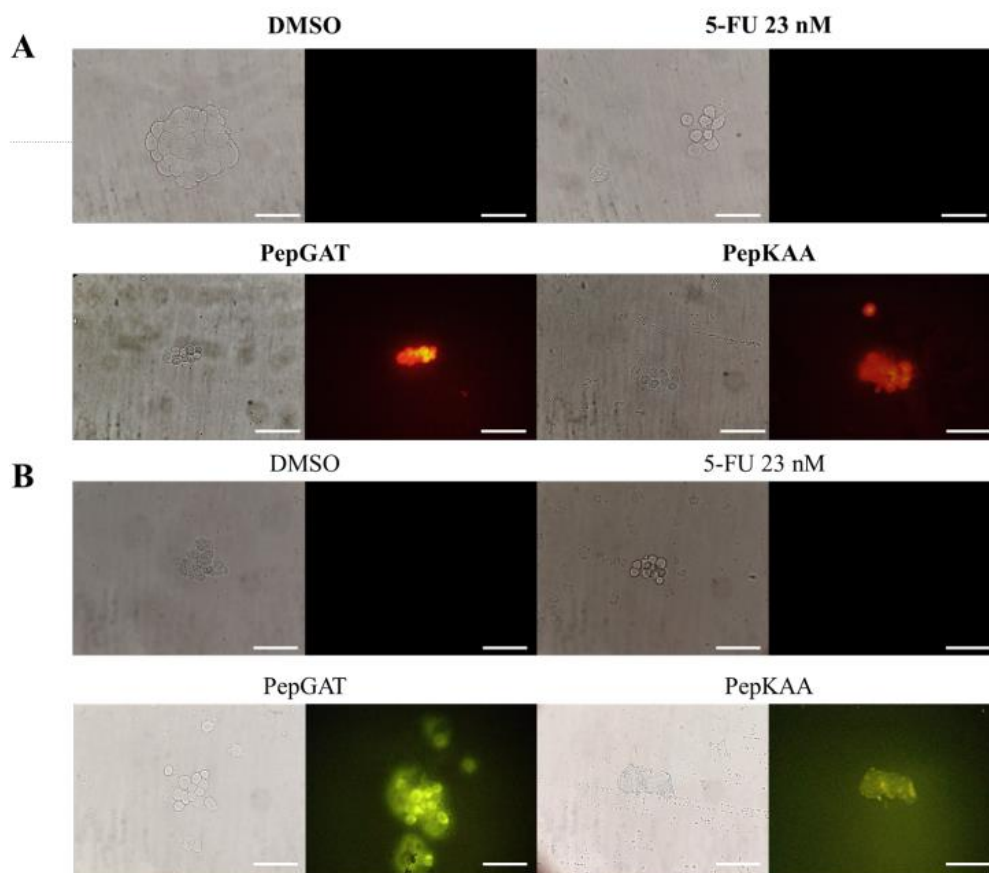


Figure 6 – (A) membrane permeabilization analysis by PI uptake assay and (B) membrane pore formation analysis by uptake of a 6-kDa Dextran-FITC in HCT-116 cells after treatment with PepGAT and PepKAA at IC₅₀ and 5-FU (IC₅₀). White bars indicate 100 μ m.

PepGAT and PepKAA inhibit invasion in HCT-116 cell lines.

The cell invasion assay evaluated the ability of peptides to inhibit invasion in an extracellular matrix (Fig. 7). The invasion assay was carried out in 24 hours to avoid interference with the cytotoxicity effect of peptides. To test it, we performed a Trypan Blue assay in which cells treated with PepGAT (IC₅₀) and PepKAA (IC₅₀) with or without 5-FU did not show cytotoxic effects (Fig. 7A). Regarding the invasion assay, HCT-116 cells treated with PepGAT and PepKAA presented a reduction, respectively, of 70 and 75% in invasion process (Fig. 7B). In case of 5-FU, the inhibition of invasion was dependent of the

concentration being the best effective the concentration of 23 nM, which inhibit in 50% the invasion of HCT-116 cells (Fig. 7B).

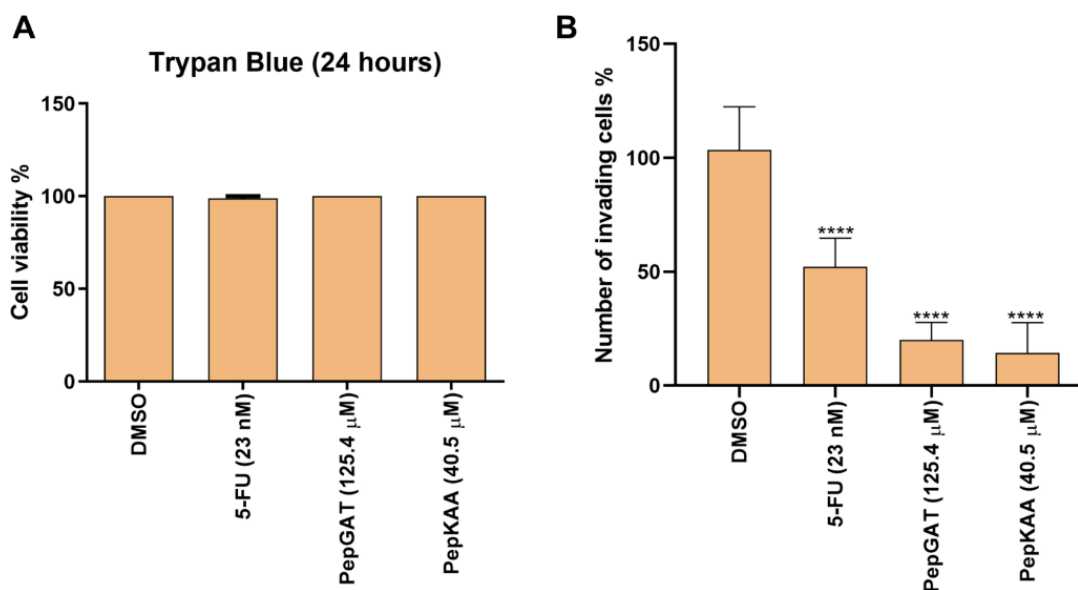


Figure 7 – Cell invasion after treatment with PepGAT and PepKAA at IC50 and 5-FU (23 nM) for 24h. **(A)** PepGAT, PepKAA, and 5-FU treatment did not affect cell viability after 24h of treatment. Cell viability was tested by Trypan Blue assay to demonstrate the non-cytotoxic time and exclude the possibility of interference on invasion assay. **(B)** Number of invading cells performed using 0.8 μ m diameter insert, allowing analysis at a single time point. Data are represented as mean \pm standard deviation of three independent experiments. Groups were compared to negative control (DMSO) using ANOVA and Tukey's posttest. Significant differences: ****P<0.0001.

Molecular docking analysis

After analyzing the pattern of some genes involved in the poor survival of patients with colorectal cancer, the proteins related to those genes were used in molecular docking analysis against both peptides (Fig. 8). For docking analysis, the 3D structure of KRAS was obtained from Protein Data Bank under the access code of PDB ID 7VVB.

The complex PepGAT:KRAS was supported by many polar interactions between Gly¹, Ala², and Arg¹⁰ from PepGAT, respectively, with Glu¹⁰⁷, Glu⁷⁶, and Glu³ from KRAS protein (Fig. 8B). The complex PepKAA:KRAS was supported by interactions between Lys¹, Arg⁵, Lys⁷, Tyr⁸, Gln¹⁰ from PepKAA, respectively, with Pro³⁴, Thr³⁵, Asp³⁸, Ser¹⁷, Tyr⁴⁰,

Gln²⁵, His²⁷ (Fig. 9B). The RMSD analysis revealed a value of 0.741 and 0.690, respectively, for PepGAT and PepKAA suggesting both peptides induced conformational changes in the 3D structure of KRAS.

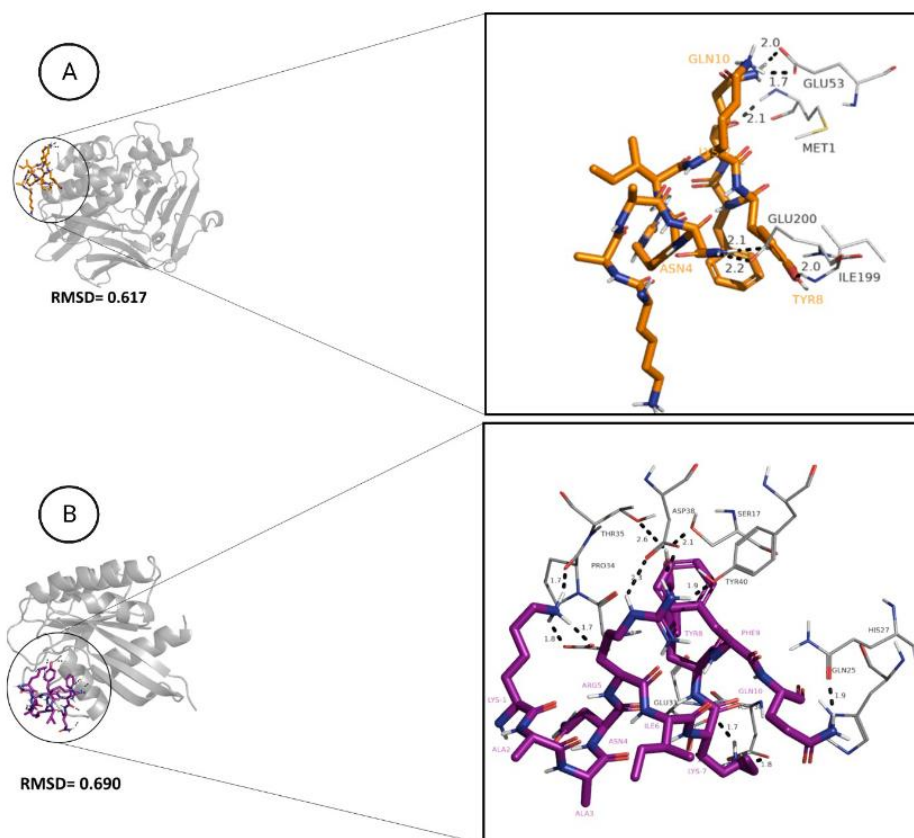


Figure 8 – Molecular docking assay of PepGAT and PepKAA against the KRAS protein from CRC. (A) prediction of molecular interaction between PepGAT and KRAS and the interaction that sustains the complex PepGAT:KRAS. (B) prediction of molecular interaction between PepGAT and KRAS and the interaction that sustain the complex PepKAA:KRAS.

DISCUSSION

Among the cancer types evaluated, colorectal cancer (CRC) was the most affected by the peptides tested. CRC had approximately 1.9 million new cases and ranked as the second most common cause of cancer-related deaths, with 576,858 deaths (SUNG et al., 2021). In

Brazil, it is estimated that there will be 704,000 new cancer cases per year between 2023 and 2025, where CRC (46,000 new cases) is the second most common in males and females, and in the Northeast region, with an incidence rate of 10.99 per 100,000 individuals, representing its importance³². CRC refers to tumors found in the large intestine, specifically the colon and rectum, which are the final parts of the intestine before the anus^{32,33}.

To combat CRC and slow its progression, the drug 5-FU is commonly used, especially as a first-line treatment for CRC^{34,35}. In this context, 5-Fluorouracil (5-FU) is a uracil analog that contains a fluorine atom at its C-5 position instead of hydrogen, widely used in clinics and administered worldwide, primarily for the treatment of CRC and other types of cancer as well³⁶⁻³⁸. However, CRC became resistant to 5-FU treatment, and in some cases, surgery is the only way to reach the cure³⁸.

One of the mechanisms involved in 5-FU of CRC is increasing the mRNA levels of thymidylate synthase (TS), the target of 5-FU³⁸. CRC presented intrinsic higher levels of mRNA and accumulation of TS *in vitro*, *in vivo*, and patients³⁹. This information has been used to direct new ways of treating CRC. The detection of higher levels of TS in colorectal tumors suggests the patient should not be treated with 5-FU⁴⁰. On top of CRC resistance to 5-FU, the toxicity of 5-FU is another problem faced by patients. Although side effects go away at the end of the treatment, patients treating CRC with 5-FU experience side effects such as nausea, diarrhea, mouth sores, vomiting, loss of appetite, irritation and watery eyes, and low blood counts^{34,41}. Therefore, seeking and developing new molecules with potential against CRC and low toxicity to healthy cells and patients is urgently required. In this context, repositioning antimicrobial peptides (AMPs) against CRC has been an alternative approach researchers worldwide employ to combat the resistance of CRC to chemotherapy^{42,43}. However, due to low resistance to proteolysis and host cell toxicity, AMPs faced problems during clinical trials⁴⁴.

Synthetic antimicrobial peptides (SAMPs) rationally designed for high activity and low toxicity have emerged as a promise to be repositioned for cancer treatment. Additionally, advancements in chemical synthesis have made synthetic peptides feasible for application¹¹. The SAMPs tested here, PepGAT and PepKAA, are multifunctional peptides with activity against bacteria, fungi, yeasts, and viruses^{11,14,20,45,46}.

PepGAT and PepKAA possess two important characteristics that could facilitate their application. First, resistance to proteolysis. *In silico* and *in vitro* analysis revealed that PepGAT and PepKAA are resistant to digestion by enzymes present in the intestinal tract¹¹. Second, low toxicity to normal cells. *In vitro* analysis revealed that PepGAT and PepKAA presented no toxicity to human red blood cell types A, B, and O, even in concentrations 10x higher than the antimicrobial concentration¹¹. Yet, both peptides were not toxic to other human cells, such as MRC-5, HaCat, and L929⁴⁶. *In vivo* experiments using zebrafish (*Danio rerio*) embryos and larvae revealed no toxicity of both peptides⁴⁶. Altogether, those results suggested that peptides are not toxic and possess features for oral application, which would be useful for application against cancer.

Regarding the anticancer potential, PepGAT and PepKKA were more selective against HCT-116 cells, presenting IC₅₀ values of 125.42 and 40.51 μM , respectively. In fact, this value is higher than IC₅₀ of 23 nM presented by 5-FU (Fig. 1 and Table 1). However, the comparison between concentration for IC₅₀ between peptides and 5-Fu is not fair enough because they are from different chemical groups. Compared to other peptides, anticancer activity revealed the potential of our peptides. For example, Hsu et al.⁴⁷ evaluated the IC₅₀ against colorectal cancer of Ple and Ple-a peptides. Ple peptide did not reach an IC₅₀ even with values higher than 500 μM ; for Ple-a, the IC₅₀ reached 197.3 μM . Won et al.⁴⁸ reported that two synthetic peptides, GGN5 and V8W-GGN5^{N11} presented IC₅₀ against HCT-116 cells at 193.31 and 144.37 μM . The authors also reported toxic potential against non-cancerous cells^{47,48}.

Compared to those peptides discussed, our peptides are required at a lower concentration to reach IC₅₀. Altogether, based on these results, it is reasonable to suggest that PepGAT and PepKAA hold great potential to be explored as anticancer molecules. Based on that, the mechanisms of anticancer action were explored.

By evaluating the mechanisms of action, Hsu et al.⁴⁷ revealed that Ple-a, at 197.3 μ M, induced cell cycle arrest by increasing the number of cells in the sub-G1 phase. In our case, Fig. 2 revealed that, IC₅₀ concentration, besides induced cell cycle arrest, PepGAT and PepKAA induced nuclear fragmentation on HCT-116 cells. The cell cycle analysis revealed an interesting result: a higher number of peptides-treated HCT-116 cells stopped in G2/M (Fig. 2E). The blockage of the cell cycle in G2/M by interrupting the formation of the mitotic spindle is a common effect of drugs that disrupt the microtubules in cancer cells^{47,49}.

Cell cycle blockage in cancer cells leads to severe damage that cells cannot recover. Cell cycle arrest in the G2/M phase indicates that the cancer cell loses control of its cycle and drives it to death by apoptosis⁵⁰. Followed by inducing a stop in the cell cycle in HCT-116, PepGAT and PepKAA increase 2-fold the number of apoptotic cells as revealed by annexin/IP assay (Fig. 3), apoptosis mediated by caspase 3/7 (Fig. 4A) and the overaccumulation of ROS (Fig. 4B).

The figures 2, 3, and 4 presented a sequence of events by somehow PepGAT and PepKAA led HCT-116 cells to death. Peptides induced an arrest in the cell cycle in G2/M (Fig. 2), which induced cells to go into undesired pathways, leading to apoptotic events (Fig. 3 and 4A) ending with the overaccumulation of ROS and, ultimately, cell death. As far as we know, this is the first study to show these sequential events ending in ROS accumulation in cancer cells. Additionally, it is important to note that the mechanisms presented by PepGAT and PepKAA differ from those presented by 5-FU.

It is important to discuss that the overaccumulation of ROS in HCT-116 cells is not necessarily the end of the road; otherwise, it could be the start. ROS is a natural by-product of metabolism, requiring a tiny regulation to avoid accumulating higher levels in cells^{51,52}. It is known that tumor cells suffer more than normal cells due to high levels of ROS and can easily die from damage caused by them⁵³⁻⁵⁵. The uncontrolled ROS levels imbalance in cells led to damage to molecules such as DNA, proteins, and lipids, driving cells to death. Thus, it is feasible to hypothesize that the overaccumulation of ROS induced by PepGAT and PepKAA (Fig. 4B) could act in two ways, driving DNA damage: 1) damage to important proteins or lipids signaling to apoptotic events and cell cycle arrest and death. 2) the higher levels of ROS could directly damage the DNA, interfering in the cell cycle and leading to apoptotic events and cell death.

High ROS levels could lead to the oxidation of proteins and lipids in cells, which, in turn, triggers lethal damage to cells⁵³⁻⁵⁵. For example, Zhang et al.⁵⁶ revealed by atomic force microscopy that high levels of ROS in prostate cancer cells induced by Paclitaxel lead to disruption of microtubules. Tubulin is important during the cell cycle because it commands the separation of chromosomes for new cells by forming the mitotic spindle^{53,57}. Damage to microtubules may result in problems during cell cycle and cell death. Here, PepGAT and PepKAA induced a high accumulation of ROS in HCT-116 cells, cell cycle arrest in G2/M, and induction of apoptosis (Fig. 2, 3 and 4).

Additionally, higher levels of ROS induce membrane lipid peroxidation, altering membrane permeability, integrity, curvature, and organization and, hence, pore formation⁵³. The induction of pore formation on Paclitaxel-prostate cancer cells is ROS-dependent⁵⁶. That is an interesting point because Aguiar et al.²⁰ revealed that in *Cryptococcus neoformans* cells, PepGAT induced pore formation by a ROS-dependent pathway, and PepKAA induced pore formation by a ROS-independent pathway. Based on that, it is feasible to suggest the

correlation between ROS overaccumulation and pore formation in HCT-116 cells (Figs. 5 and 6).

It is worth mentioning that the peptides used in this study were proven cell-penetrating antimicrobial peptides^{11,20,45} driven to anticancer potential. Based on that, two questions arise: could antimicrobial peptides be driven to attack the membrane of cancer cells? Are they selective for cancer cell membranes?

Regarding the first question, the short answer is yes. The long one takes an additional explanation. AMPs have been repositioned for cancer treatment due to similar characteristics shared by microorganisms and cancer cells, the negatively charged membrane⁵⁸⁻⁶⁰. Nowadays, it's been largely discussed and accepted that cancer cells possess negatively charged membranes⁶¹⁻⁶³.

The negative charge comes from the high phosphatidylserine concentration, heparin sulfate from proteoglycans, and the hypoxia environment⁶⁴⁻⁶⁶. The negative charge of the membrane makes cancer cells susceptible to the cationic peptides (positively charged)⁵⁸⁻⁶⁰. Souza et al.¹¹ reported that PepGAT and PepKAA possess a positive net charge of +2 and +3 due to arginine and lysine residues added during the design and discuss this characteristic is important to peptides attack microbial membranes, which are also negatively charged.

The answer to the second question is related to the first. The characteristics that made cancer a target for antimicrobial peptides are the same that exclude non-cancer cells as a target. The membranes of non-cancerous cells enclose the phosphatidylserine in the cytoplasmatic side of the membrane, leading the outside layer of the non-cancerous membrane with a neutral charge not attracting cationic peptides⁵⁸⁻⁶⁰.

Cell membranes have a complex system composed of lipids, proteins, and sterols that stabilize the membrane⁵⁸⁻⁶⁰. These plasma membranes can undergo remodeling due to external stimuli, forming pores in the membrane. SAMPs can form pores in the membrane, although

not all do it. By attacking the membrane, peptides impose a challenge on cancer cells to develop resistance¹¹. Over cellular evolution time, membranes remain the same conserved structure with slight variation. Therefore, inducing a change in the membrane is metabolically expensive despite being dangerous to the cell. It is an important mechanism against cellular resistance¹¹.

Together, SEM and fluorescence microscopy revealed the ability of PepGAT and PepKAA to induce pore formation and loss of internal content in HCT-116 cells (Fig. 5 and 6). Despite being separated experiments, Figs. 5 and 6 revealed the sequence of events. The PI uptake assay (Fig. 4a) revealed that the membrane of peptides-treated HCT-116 cells had an increased membrane permeability. PI uptake assay is not a definitive assay to indicate pore formation because it has a size of 0.1 nm in diameter, which means that membranes permeable to PI very likely hold pores with this size.

Etzaniz et al.⁶⁷ (2018) revealed that some cells could recover from small pores that allow PI movement. However, dextran-FITC was used, revealing pores of at least 6 kDa (Fig. 4b) in HCT-116 membranes, which can cause significant problems for cell function by allowing the movement of small molecules and other substances. Pores allowing the movement of dextran-FITC at least 1 nm in diameter are classified as large pores leading to extravasation of cytoplasmic content, depolarization of membranes, and apoptosis⁶⁷. On top of that, SEM analysis corroborated the hypothesis of pore formation by revealing that HCT-116 cells treated with PepGAT and PepKAA are completely damaged with signals of loss of internal content.

Altogether, these effects are related to the ability of PepGAT and PepKAA to inhibit the invasion profile of HCT-116 cells. It was clear that in the presence of peptides, the number of invading cells is dramatically reduced even more than in cells treated with 5-FU. The invasion ability of cancer cells is involved in establishing metastasis, a stage of cancer with a poor prognosis for the patient, which is directly linked to cellular invasion^{15-17,68}.

Based on the results about the size of pores formed (Fig. 4B) in the membrane of HCT-116 cells, it was hypothesized that PepGAT and PepKAA could have an intracellular target. Hsu et al.⁴⁷ revealed that Ple-a peptide accumulates inside cancer colon cells and destabilizes microtubules, leading to cell death. Therefore, we sought intracellular targets for PepGAT and PepKAA. In the literature, one protein was used as a druggable target in CRC, KRAS^{47,69–71}. Molecular docking analysis revealed that PepGAT and PepKAA interacted with KRAS (Fig. 8). In both cases, peptides induced alteration in the 3D structure of proteins based on RMSD values, which indicates changes in their activity (Fig. 8). KRAS (Kirsten Rat Sarcoma) is a viral oncogene first identified in rats⁷². The product of the gene is a protein KRAS involved in RAS/MAPK pathways, bringing information from the environment to the nucleus to the cell either to decide to proliferate or differentiate⁷².

In CRC, KRAS is constitutively activated, driving cells to the proliferation pathway and stimulating cell growth^{69–71}. As such, KRAS has gained attention as a target for drug-specific design. In fact, some molecules are being tested as potential inhibitors of KRAS, such as AMG 510, MRTX849, MRTX1133 and KR12⁷⁰. In our opinion, the weakness of those drugs is all of them bind to the catalytic site of KRAS, imposing a selective pressure-inducing mutation and, thus, resistance to KRAS. In our case, PepGAT and PepKAA interacted with KRAS in a region distant from the catalytic site, an allosteric site (Fig. 8). However, it is important to mention that peptides change the RMSD values of KRAS, indicating changes in 3D structure and thus, change in activity. Interacting in a point far from catalytic site peptides imposes a problem to change the region and hence, the acquirement of resistance is difficult, as happened to MRTX849 and AMG 510. For instance, clinically acquired resistance of KRAS to MRTX849 and AMG 510^{73–75} was reported during preclinical tests.

In conclusion, our results revealed that antimicrobial peptides PepGAT and PepKAA possess an anticancer potential against CRC. Peptides exert their anticancer activity by multiple

mechanisms of action, which could make it difficult for CRC to develop and acquire resistance. A previous study from our research group revealed both peptides have no toxicity to human cells and zebrafish embryos. Altogether, the results suggest the potential of peptides as anticancer molecules to develop potential new drugs.

Funding and Acknowledgments

This work was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for a research grant to Felipe P. Mesquita (Process number: 421392/2023-1), for a research productivity grant to Raquel C. Montenegro (Process number: 305459/2019-8), Pedro F. N. Souza (Process number: 305003/2022-4), Raquel C. Montenegro also thanks Red Latinoamericana de Implementación y Validación de guías clínicas Farmacogenómicas (RELIVAF) for supporting this work. We also thank the Office of Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) and the Cearense Foundation to Support Scientific and Technological Development (FUNCAP) for grants given to students. We are also grateful to the staff of the central analytical facilities of UFC, Brazil for the SEM analysis and the staff of the Multi-User Facility of the Drug Research and Development Center of Federal University of Ceará for technical support with flow cytometry analysis.

Credit Author Statement:

Conceptualization: F. P. M., F.L.O., and P.F.N.S.

Data curation: F. P. M., F.L.O., E.L.S., D.M.S.B., M.E.A.M., P.F.N.S., and R.C.M.

Formal analysis: M.E.A.M., P.F.N.S., and R.C.M.

Funding acquisition: F. P. M., M.E.A.M., P.F.N.S., and R.C.M.

Methodology: F.P.M., F.L.O., E.L.S., D.M.S.B., M.E.A.M., P.F.N.S., R.C.M.

Resources: F. P. M., M.E.A.M., P.F.N.S., and R.C.M.

Supervision: F.P.M., P.F.N.S., and R.C.M.

Writing original draft: F.P.M., and P.F.N.S.

Writing, review, and editing: P.F.N.S.

Conflict of interest

All authors declare no conflict of interest.

Data availability

The datasets analyzed during the current study are available under request of the corresponding author.

REFERENCE

1. Cancer. Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.
(Accessed: 19th December 2023)
2. Sung, H. *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA. Cancer J. Clin.* **71**, 209–249 (2021).
3. The global challenge of cancer. *Nat. Cancer 2020 11* **1**, 1–2 (2020).
4. D’Souza, G. *et al.* Case–control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N. Engl. J. Med.* **356**, 1944–1956 (2007).
5. Assaf, E. *et al.* 5-fluorouracil/leucovorin combined with irinotecan and oxaliplatin (FOLFIRINOX) as second-line chemotherapy in patients with metastatic pancreatic adenocarcinoma. *Oncology* **80**, 301–306 (2011).
6. Correia, A. *et al.* Study of new therapeutic strategies to combat breast cancer using drug combinations. *Biomolecules* **8**, 175 (2018).

7. Teng, Y. *et al.* Ultraviolet radiation and basal cell carcinoma: an environmental perspective. *Front. Public Heal.* **9**, 666528 (2021).
8. Borges da Silva, E. *et al.* Micronucleus assay for predicting side effects of radiotherapy for cervical cancer. *Biotech. Histochem.* **96**, 60–66 (2021).
9. Vasan, N., Baselga, J. & Hyman, D. M. A view on drug resistance in cancer. *Nat.* *2019 5757782* **575**, 299–309 (2019).
10. Mellor, H. R. & Callaghan, R. Resistance to Chemotherapy in Cancer: A Complex and Integrated Cellular Response. *Pharmacology* **81**, 275–300 (2008).
11. Souza, P. F. N. *et al.* Synthetic antimicrobial peptides: From choice of the best sequences to action mechanisms. *Biochimie* **175**, 132–145 (2020).
12. Oliveira, J. T. A. *et al.* Mo-CBP3-PepI, Mo-CBP3-PepII, and Mo-CBP3-PepIII are synthetic antimicrobial peptides active against human pathogens by stimulating ROS generation and increasing plasma membrane permeability. *Biochimie* **157**, 10–21 (2019).
13. Dias, L. P. *et al.* 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*. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1862**, 183092 (2020).
14. Souza, P. F. N. *et al.* Antidermatophytic activity of synthetic peptides: Action mechanisms and clinical application as adjuvants to enhance the activity and decrease the toxicity of Griseofulvin. *Mycoses* **63**, 979–992 (2020).
15. Mesquita, F. P. *et al.* Small benzothiazole molecule induces apoptosis and prevents metastasis through DNA interaction and c-MYC gene suppression in diffuse-type gastric adenocarcinoma cell line. *Chem. Biol. Interact.* **294**, 118–127 (2018).

16. Mesquita, F. P. *et al.* Kinase Inhibitor Screening Displayed ALK as a Possible Therapeutic Biomarker for Gastric Cancer. *Pharmaceutics* **14**, 1841 (2022).
17. Mesquita, F. P. *et al.* Kinase inhibitor screening reveals aurora-a kinase is a potential therapeutic and prognostic biomarker of gastric cancer. *J. Cell. Biochem.* **122**, 1376–1388 (2021).
18. Lochter, A. *et al.* Matrix Metalloproteinase Stromelysin-1 Triggers a Cascade of Molecular Alterations That Leads to Stable Epithelial-to-Mesenchymal Conversion and a Premalignant Phenotype in Mammary Epithelial Cells. *J. Cell Biol.* **139**, 1861 (1997).
19. Lima, P. G. *et al.* Anticandidal activity of synthetic peptides: Mechanism of action revealed by scanning electron and fluorescence microscopies and synergism effect with nystatin. *J. Pept. Sci.* **26**, (2020).
20. Aguiar, T. K. B. *et al.* Antifungal Potential of Synthetic Peptides against *Cryptococcus neoformans*: Mechanism of Action Studies Reveal Synthetic Peptides Induce Membrane–Pore Formation, DNA Degradation, and Apoptosis. *Pharmaceutics* **14**, 1678 (2022).
21. Staniszewska, M. *et al.* *Candida albicans* morphologies revealed by scanning electron microscopy analysis. *Brazilian J. Microbiol.* **44**, 813–821 (2013).
22. RCSB PDB: Homepage. Available at: <https://www.rcsb.org/>. (Accessed: 19th December 2023)
23. Berman, H. M. *et al.* The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* **28**, 235–242 (2000).
24. Varadi, M. *et al.* AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Res.* **50**, D439–D444 (2022).

25. Jumper, J. *et al.* Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nat. 2021 5967873* **596**, 583–589 (2021).
26. Support | pymol.org. Available at: <https://pymol.org/2/support.html>? (Accessed: 19th December 2023)
27. Free Download: BIOVIA Discovery Studio Visualizer - Dassault Systèmes. Available at: <https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download>. (Accessed: 19th December 2023)
28. Desta, I. T., Porter, K. A., Xia, B., Kozakov, D. & Vajda, S. Performance and Its Limits in Rigid Body Protein-Protein Docking. *Structure* **28**, 1071-1081.e3 (2020).
29. Vajda, S. *et al.* New Additions to the ClusPro Server Motivated by CAPRI. doi:10.1002/prot.25219
30. Kozakov, D. *et al.* The ClusPro web server for protein-protein docking. doi:10.1038/nprot.2016.169
31. Kozakov, D. *et al.* How Good is Automated Protein Docking? doi:10.1002/prot.24403
32. Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil | INCA - Instituto Nacional de Câncer. Available at: <https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2023-incidencia-de-cancer-no-brasil>. (Accessed: 25th December 2023)
33. Sullivan, B. A., Noujaim, M. & Roper, J. Cause, Epidemiology, and Histology of Polyps and Pathways to Colorectal Cancer. *Gastrointest. Endosc. Clin. N. Am.* **32**, 177 (2022).
34. Vodenkova, S. *et al.* 5-fluorouracil and other fluoropyrimidines in colorectal cancer: Past, present and future. *Pharmacol. Ther.* **206**, (2020).
35. Cho, Y. H. *et al.* 5-FU promotes stemness of colorectal cancer via p53-mediated WNT/ β -catenin pathway activation. *Nat. Commun. 2020 111* **11**, 1–13 (2020).

36. Hempel-Bruder, C. *et al.* Colorectal cancer testing rates after implementation of an organised screening programme in Vaud, Switzerland. *Swiss Med. Wkly.* **153**, (2023).
37. Saddik, M. S. *et al.* Novel Green Biosynthesis of 5-Fluorouracil Chromium Nanoparticles Using *Harpullia pendula* Extract for Treatment of Colorectal Cancer. *Pharm.* 2021, Vol. 13, Page 226 **13**, 226 (2021).
38. Longley, D. B., Harkin, D. P. & Johnston, P. G. 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat. Rev. Cancer* 2003 35 **3**, 330–338 (2003).
39. Zhang, Y., Talmon, G. & Wang, J. MicroRNA-587 antagonizes 5-FU-induced apoptosis and confers drug resistance by regulating PPP2R1B expression in colorectal cancer. *Cell Death Dis.* 2015 68 **6**, e1845–e1845 (2015).
40. Xu, W., Jiang, H., Zhang, F., Gao, J. & Hou, J. MicroRNA-330 inhibited cell proliferation and enhanced chemosensitivity to 5-fluorouracil in colorectal cancer by directly targeting thymidylate synthase. *Oncol. Lett.* **13**, 3387–3394 (2017).
41. Negarandeh, R. *et al.* Evaluation of adverse effects of chemotherapy regimens of 5-fluoropyrimidines derivatives and their association with DPYD polymorphisms in colorectal cancer patients. *BMC Cancer* **20**, 1–7 (2020).
42. Chauhan, S., Dhawan, D. K., Saini, A. & Preet, S. Antimicrobial peptides against colorectal cancer-a focused review. *Pharmacol. Res.* **167**, 105529 (2021).
43. Avilés-Gaxiola, S., Gutiérrez-Grijalva, E. P., León-Felix, J., Angulo-Escalante, M. A. & Heredia, J. B. Peptides in Colorectal Cancer: Current State of Knowledge. *Plant Foods Hum. Nutr.* **75**, 467–476 (2020).
44. Dijksteel, G. S., Ulrich, M. M. W., Middelkoop, E. & Boekema, B. K. H. L. Review: Lessons Learned From Clinical Trials Using Antimicrobial Peptides (AMPs). *Front. Microbiol.* **12**, 616979 (2021).

45. Lima, P. G. *et al.* Synthetic antimicrobial peptides control *Penicillium digitatum* infection in orange fruits. *Food Res. Int.* **147**, 110582 (2021).
46. Souza, P. F. N. *et al.* Neutralizing Effect of Synthetic Peptides toward SARS-CoV-2. *ACS Omega* **7**, 16222–16234 (2022).
47. 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*. *Mar. Drugs* 2022, Vol. 20, Page 519 **20**, 519 (2022).
48. Won, H. S. *et al.* Structural determinants for the membrane interaction of novel bioactive undecapeptides derived from gaegurin 5. *J. Med. Chem.* **49**, 4886–4895 (2006).
49. Khwaja, S., Kumar, K., Das, R. & Negi, A. S. Microtubule associated proteins as targets for anticancer drug development. *Bioorg. Chem.* **116**, 105320 (2021).
50. Lu, W. J. *et al.* #2714, a novel active inhibitor with potent G2/M phase arrest and antitumor efficacy in preclinical models. *Cell Death Discov.* 2018 41 **4**, 1–11 (2018).
51. Kim, J. Y. *et al.* Antifungal Effect of A Chimeric Peptide Hn-Mc against Pathogenic Fungal Strains. *Antibiot.* 2020, Vol. 9, Page 454 **9**, 454 (2020).
52. Zhang, Z., Chen, Y., Li, B., Chen, T. & Tian, S. Reactive oxygen species: A generalist in regulating development and pathogenicity of phytopathogenic fungi. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **18**, 3344–3349 (2020).
53. Redza-Dutordoir, M. & Averill-Bates, D. A. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1863**, 2977–2992 (2016).
54. Dodson, M., Castro-Portuguez, R. & Zhang, D. D. NRF2 plays a critical role in mitigating lipid peroxidation and ferroptosis. *Redox Biol.* **23**, 101107 (2019).

55. Hayes, J. D., Dinkova-Kostova, A. T. & Tew, K. D. Oxidative Stress in Cancer. *Cancer Cell* **38**, 167–197 (2020).
56. Zhang, Y. *et al.* Nanopore-related cellular death through cytoskeleton depolymerization by drug-induced ROS. *Talanta* **268**, 125355 (2024).
57. Ferreira, L. T., Figueiredo, A. C., Orr, B., Lopes, D. & Maiato, H. Dissecting the role of the tubulin code in mitosis. *Methods Cell Biol.* **144**, 33–74 (2018).
58. Lira, R. B. *et al.* To Close or to Collapse: The Role of Charges on Membrane Stability upon Pore Formation. *Adv. Sci.* **8**, 2004068 (2021).
59. Chen, B. *et al.* Targeting Negative Surface Charges of Cancer Cells by Multifunctional Nanoprobe. *Theranostics* **6**, 1887–1898 (2016).
60. Moleón Baca, J. A., Ontiveros Ortega, A., Aránega Jiménez, A. & Granados Principal, S. Cells electric charge analyses define specific properties for cancer cells activity. *Bioelectrochemistry* **144**, 108028 (2022).
61. Tan, J., Tay, J., Hedrick, J. & Yang, Y. Y. Synthetic macromolecules as therapeutics that overcome resistance in cancer and microbial infection. *Biomaterials* **252**, (2020).
62. Vitale, I. *et al.* Targeting Cancer Heterogeneity with Immune Responses Driven by Oncolytic Peptides. *Trends in cancer* **7**, 557–572 (2021).
63. Kaushik, A. C. *et al.* A-CaMP: a tool for anticancer and antimicrobial peptide generation. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **39**, 285–293 (2021).
64. Leuschner, C. & Hansel, W. Membrane disrupting lytic peptides for cancer treatments. *Curr. Pharm. Des.* **10**, 2299–2310 (2004).
65. Baxter, A. A., Lay, F. T., Poon, I. K. H., Kvensakul, M. & Hulett, M. D. Tumor cell membrane-targeting cationic antimicrobial peptides: novel insights into

- mechanisms of action and therapeutic prospects. *Cell. Mol. Life Sci.* **74**, 3809–3825 (2017).
66. Tornesello, A. L., Borrelli, A., Buonaguro, L., Buonaguro, F. M. & Tornesello, M. L. Antimicrobial Peptides as Anticancer Agents: Functional Properties and Biological Activities. *Molecules* **25**, (2020).
67. Etxaniz, A., González-Bullón, D., Martín, C. & Ostolaza, H. Membrane Repair Mechanisms against Permeabilization by Pore-Forming Toxins. *Toxins 2018, Vol. 10, Page 234* **10**, 234 (2018).
68. Muralidharan-Chari, V., Clancy, J. W., Sedgwick, A. & D'Souza-Schorey, C. Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression. *J. Cell Sci.* **123**, 1603–1611 (2010).
69. Meng, M. *et al.* The current understanding on the impact of KRAS on colorectal cancer. *Biomed. Pharmacother.* **140**, 111717 (2021).
70. Rahman, S., Garrel, S., Gerber, M., Maitra, R. & Goel, S. Therapeutic Targets of KRAS in Colorectal Cancer. *Cancers 2021, Vol. 13, Page 6233* **13**, 6233 (2021).
71. Negri, F., Bottarelli, L., De' Angelis, G. L. & Gnetti, L. KRAS: A Druggable Target in Colon Cancer Patients. *Int. J. Mol. Sci. 2022, Vol. 23, Page 4120* **23**, 4120 (2022).
72. Tsuchida, N., Ryder, T. & Ohtsubo, E. Nucleotide Sequence of the Oncogene Encoding the p21 Transforming Protein of Kirsten Murine Sarcoma Virus. *Science (80-.)*. **217**, 937–939 (1982).
73. Liu, J., Kang, R. & Tang, D. The KRAS-G12C inhibitor: activity and resistance. *Cancer Gene Ther. 2021 297* **29**, 875–878 (2021).

74. Dunnett-Kane, V., Nicola, P., Blackhall, F. & Lindsay, C. Mechanisms of Resistance to KRASG12C Inhibitors. *Cancers* 2021, Vol. 13, Page 151 **13**, 151 (2021).
75. Tanaka, N. *et al.* Clinical Acquired Resistance to KRASG12C Inhibition through a Novel KRAS Switch-II Pocket Mutation and Polyclonal Alterations Converging on RAS-MAPK Reactivation. *Cancer Discov.* **11**, 1913–1922 (2021).

CONCLUSÃO

- Os resultados mostram que ambos os peptídeos antimicrobianos sintéticos, PepGAT e PepKAA, apresentaram resultados significativos contra a linhagem colorretal, mostrando possuir potencial citotóxico.
- Ambos os peptídeos apresentaram atividade que levam a permeabilização da membrana das células cancerígenas de colorretal, por múltiplos mecanismos de ação, gerando graves danos a membrana levando a morte celular por apoptose.
- Os peptídeos demonstram levar a diminuição no percentual de invasão celular, mostrando ter potencial antimetastático.
- As moléculas possuem atividade seletiva para com as células cancerígenas, tendo efeito citotóxico em células malignas, mas sem efeito tóxico em células normais.
- As análises *in silico* demonstraram que os peptídeos conseguem interagir com a proteína KRAS, modificando sua estrutura 3D e assim podendo alterar sua função.
- No geral, os peptídeos tendem a levar a formação de poros na membrana celular, culminando em fragmentação celular e aumento nas espécies reativas de oxigênio, por fim desencadeando em diminuição no potencial invasivo e em morte celular por apoptose. Os peptídeos também demonstraram interagir com a proteína KRAS, uma oncoproteína muito importante para o crescimento e proliferação celular no CRC, podendo estar associado ao seu mecanismo citotóxico observado nesse estudo.
- Os resultados mostram uma promissora aplicabilidade no desenvolvimento de novos fármacos potenciais para o tratamento dessa doença.