



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE EDUCAÇÃO E SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS NATURAIS E
BIOTECNOLOGIA

RENALLY BARBOSA DA SILVA

ARQUITETURA E CONSTRUÇÃO DE UM PEPTÍDEO INIBIDOR DE
ANGIOGÊNESE EM CÉLULAS TUMORAIS

CUITÉ

2017

RENALLY BARBOSA DA SILVA

**ARQUITETURA E CONSTRUÇÃO DE UM PEPTÍDEO INIBIDOR DE
ANGIOGÊNESE EM CÉLULAS TUMORAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais e Biotecnologia da Universidade Federal de Campina Grande, em cumprimento às exigências para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Dr. Plinio Delatorre

Coorientadora: Dra Magnólia de Araújo Campos

CUITÉ

2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA NA FONTE
Responsabilidade Jesiel Ferreira Gomes – CRB 15 – 256

S586a Silva, Renally Barbosa da.

Arquitetura e construção de um peptídeo inibidor de angiogênese em células tumorais. / Renally Barbosa da Silva. – Cuité: CES, 2017.

88 fl.

Dissertação (Mestrado em Ciências Naturais e Biotecnologia) – Centro de Educação e Saúde / UFCG, 2017.

Orientador: Plínio Delatorre.

Coorientadora: Magnólia de Araújo Campos.

1. Antitumoral. 2. Antiangiogênese. 3. Midkina. I. Título.

Biblioteca do CES - UFCG

CDU 577.1

RENALLY BARBOSA DA SILVA

**ARQUITETURA E CONSTRUÇÃO DE UM PEPTÍDEO INIBIDOR DE
ANGIOGÊNESE EM CÉLULAS TUMORAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais e Biotecnologia da Universidade Federal de Campina Grande em cumprimento às exigências para a obtenção do título de Mestre.

Aprovada em: 16 de fevereiro de 2017.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Plinio Delatorre
Universidade Federal da Paraíba-UEPB

Coorientadora: Profa. Dra Magnólia de Araújo Campos
Universidade Federal de Campina Grande-UFCG

Examinador Interno: Prof. Dr. Renner de Souza Leite
Universidade Federal de Campina Grande-UFCG

Examinador Externo: Prof. Dr. Eleonidas Moura Lima
Universidade Federal da Paraíba - UFPB

*Aos meus pais, Severino e
Lúcia, pelo incentivo, amor,
compreensão e apoio ao longo da
minha vida.*

Dedico!

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Plínio Delatorre, pela atenção, paciência e todos os ensinamentos. Não poderia ter orientador melhor! Que essa parceria dure muitos e muitos anos.

À Prof. Dra. Magnólia de Araújo Campos, pela sua coorientação e apoio quando estive no CES-UFCG.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da Bolsa de Estudos.

RESUMO

A angiogênese é um evento essencial para o desenvolvimento normal e homeostase nos tecidos, entretanto, se for do tipo patogênica pode causar neovascularização, o que ocorre em doenças como o câncer. Esse processo de neovascularização auxilia na nutrição do tumor e acelera a metástase. O câncer é uma doença multifatorial, caracterizado pela exacerbada multiplicação celular e é considerado um problema de saúde pública mundial. O planejamento racional de drogas, com base na estrutura molecular dos receptores tirosina-quinase, têm sido a estratégia mais eficiente para o desenvolvimento de fármacos no tratamento de diversas doenças, inclusive o câncer. Especificamente, a inibição das ligações desses receptores com fatores de crescimento impede a sinalização celular para eventos essenciais de progressão tumoral tais como multiplicação, manutenção e sobrevivência das células. O presente trabalho objetivou construir *in silico* um peptídeo capaz de se ligar especificamente ao receptor KDR (VEGFR-2) e Midkina (MK), com potencial para inibir a ação destas proteínas, as quais são essenciais no processo de angiogênese tumoral. Para o desenvolvimento do inibidor foram analisados os modelos methyl N-(6-propylsulfanyl-1H-benzimidazol-2-yl) carbamate (albendazol) e methyl N-(6-benzoyl-1H benzimidazol-2-yl) carbamate (mebendazol), compostos com ação antitumoral comprovada e que possuem em sua estrutura um anel benzimidazol. O peptídeo desenvolvido neste trabalho, denominado KDRIP (*Kinase domain insert receptor inhibitor peptide*), foi recortado a partir de estruturas depositadas no PDB para atenderem as características topológicas dos receptores. Os experimentos *in silico* tanto para o VEGFR-2 quanto a MK revelaram que KDRIP é energeticamente mais favorável, do que os modelos usados como base, levando a uma interação com um maior número de resíduos de interesse do que os outros inibidores analisados. Portanto, o peptídeo desenvolvido representa um potencial inibidor do VEGFR-2 e MK, um candidato a fármaco para o desenvolvimento de medicamentos mais eficientes para o tratamento dos cânceres que estas moléculas estejam envolvidas, que está livre de *royalties* e passivo de ser patenteados.

Palavras-chave: Antitumoral. Antiangiogênese. VEGFR-2. Midkina.

ABSTRACT

Angiogenesis is an essential event for normal development and homeostasis in the tissues. However, if it is of the pathogenic type it can cause neovascularization, which occurs in diseases such as cancer. This process of neovascularization aids in tumor nutrition and accelerates metastasis. Cancer is a multifactorial disease characterized by exacerbated cell multiplication and it is considered a global public health problem. Rational drug planning, based on the molecular structure of tyrosine kinase receptors, has been the most efficient strategy for the development of drugs in the treatment of various diseases, including cancer. Specifically, inhibition of binding of these receptors to growth factors prevents cell signaling for essential events of tumor progression, such as multiplication, maintenance and survival of cells. The aim of the present work was to construct a peptide capable of specifically binding to the KDR (VEGFR-2) and Midkine (MK) receptor, *in silico*, with potential to inhibit the action of these proteins, which are essential in the process of tumor angiogenesis. For the development of the peptide were analyzed the models methyl N- (6-propylsulfanyl-1H-benzimidazol-2-yl) carbamate (Albendazole) and methyl N- (6-benzoyl-1H benzimidazol-2-yl) carbamate (Mebendazole), compounds with proven antitumor action and having in their structure a benzimidazole ring. The peptide developed in this work, called KDRIP (Kinase domain receptor receptor inhibitor peptide), was cut from structures deposited in the PDB to meet the topological characteristics of the receptors. *In silico* experiments for both VEGFR-2 and MK revealed that KDRIP is energetically more favorable than the base templates, leading to an interaction with a greater number of residues of interest than the other inhibitors analyzed. Therefore, the developed peptide represents a potential inhibitor of VEGFR-2 and MK proteins, a drug candidate for the development of more efficient drugs for the treatment of the cancers that these molecules are involved in, which is free of royalties and passive to be patented.

Keywords: Antitumoral. Antiangiogenesis. VEGFR-2. Midkine.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	17
2.1 GERAL.....	17
2.2 ESPECÍFICOS	17
3. REFERENCIAL TEÓRICO	17
3.1 CÂNCER.....	18
3.1.1 Epidemiologia e Etiologia	18
3.1.2 Patologia	19
3.1.3 Angiogênese	20
3.1.3.1 Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)	22
3.1.3.2 Midkina (MK)	24
3.2 DESENVOLVIMENTO DE DROGAS.....	21
3.2.1 Inovação de fármacos: Estado da arte	26
3.2.2 Aspectos históricos e contemporâneos da terapia do câncer	27
3.2.2.1 Inibidores da tirosina-quinase e anticorpos monoclonais.....	30
3.2.3 Potencial antitumoral de fármacos com anel benzimidazólico	33
3.2.4 Potencial antitumoral de peptídeos	35
3.2.5 Ferramentas computacionais no desenho racional de drogas	40
4. METODOLOGIA	38
4.1 PLANEJAMENTO DO PEPTÍDEO DE LIGAÇÃO AO VEGFR-2 E A MK.....	42
4.2 ESTUDO DAS INTERAÇÕES PEPTÍDEO-VEGFR-2 E PEPTÍDEO-MK.....	42
4.3 ANÁLISE DAS INTERAÇÕES DE FÁRMACOS COM VEGFR-2 E MK	43
4.4 ANÁLISE DAS INTERAÇÕES INTERMOLECULARES	44

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
5.1 ARQUITETURA E CONSTRUÇÃO DE UM PEPÍDEO DE LIGAÇÃO AS PROTEÍNAS VEGFR-2 E MK.....	45
5.2 LIGAÇÃO DE KDRIP COM OS ALVOS MOLECULARES VEGFR-2 E M	45
5.2.1 Identificação do sítio de ligação do alvo molecular VEGFR-2	46
5.2.2 Determinação do sítio de ligação do alvo molecular MK.....	46
5.2.3 Interação entre o KDRIP e o VEGFR-2	47
5.2.4 Interação entre o KDRIP e a MK	49
5.3 INTERAÇÕES DE OUTROS FÁRMACOS COM VEGFR-2.....	44
5.3.1 Interação entre o albendazol e o VEGFR-2	52
5.3.2 Interação entre o mebendazol e o VEGFR-	55
5.3.3 Interação entre o Fármacos TKIs e o VEGFR-2	56
5.4 INTERAÇÕES DE OUTROS FÁRMACOS COM MK.....	62
5.4.1 Docking molecular entre albendazol e MK.....	62
5.4.2 Docking molecular entre o mebendazol e a MK -	63
5.5 COMPARAÇÃO DA INTERAÇÃO DO KDRIP COM VEGFR-2/ MK <i>VERSUS</i> OUTROS FÁRMACOS	65
6. CONCLUSÕES	67
7. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	68
REFERÊNCIAS	69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Organização do domínio de midkina (MK) e a estrutura tridimensional dos domínios e dois sítios de ligação da heparina no C-domínio.....	26
Figura 2- Linha cronológica das inovações terapêuticas utilizadas no tratamento do câncer. 29	
Figura 3- Valores pagos pelo tratamento oncológico, SUS- Brasil (2000-2007).....	30
Figura 4- Sequência FASTA da Cadeia A da <input data-bbox="805 645 1436 698" type="text"/> <input data-bbox="225 712 327 766" type="text"/> . Em vermelho região usada para desenho do peptídeo.....	42
Figura 5- Sequência FASTA do VEGFR-2.....	43
Figura 6- Sequência FASTA da MK.....	43
Figura 7- Estrutura tridimensional do inibidor desenvolvido (KDRIP).....	45
Figura 8- Visualização do docking molecular realizado pelo programa VMD 1.9.2 entre o inibidor desenvolvido (em azul) e o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGFR-2). Em destaque estão os seis resíduos (em cinza) que compõem os dois sítios de interesse.	48
Figura 9- Visualização do docking molecular realizado pelo programa VMD 1.9.2 entre o KDRIP (em azul) e a midkina. Em destaque estão os seis resíduos (em cinza) que compõem os dois sítios de interesse.	52
Figura 10- Visualização do docking molecular realizado pelo programa Hex 8.0 entre o albendazol (em azul) e o VEGFR-2. Em destaque estão os seis resíduos (em cinza) que compõem os dois sítios de interesse.....	53
Figura 11- Visualização do docking molecular realizado pelo programa Hex 8.0 entre o mebendazol (em azul) e o VEGFR-2. Em destaque estão os seis resíduos (em cinza) que compõem os dois sítios de interesse.	55
Figura 12- KDRIP (vermelho) sobreposto ao fármaco SUNITINIBE (azul).(PDB: 4AGD) ..	57
Figura 13- KDRIP (vermelho) sobreposto ao fármaco AXITINIBE (azul) (4AG8)).....	58
Figura 14- KDRIP (vermelho) sobreposto ao fármaco SORAFENIBE (4ASD).....	59

Figura 15- KDRIP (vermelho) sobreposto ao fármaco TIVOZANIB (azul) (4ASE).	60
Figura 16- Visualização do docking molecular realizado pelo programa Hex 8.0 entre o albendazol (em azul) e a midkina. Em destaque estão os seis resíduos (em cinza) que compõem os dois sítios de interesse.....	62
Figura 17- Visualização do docking molecular realizado pelo programa Hex 8.0 entre o mebendazol (em azul) e a midkina. Em destaque estão os seis resíduos (em cinza) que compõem os dois sítios de interesse.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Nome e IUPAC, estrutura 2D e fórmula química de fármacos inibidores de VEGFR-2.....	31
Tabela 2- Estrutura química, fórmula molecular e peso molecular do benzimidazol.....	33
Tabela 3- Estrutura químicas de derivados bioativos do benzimidazol analisadas para desenvolvimento do peptídeo inibidor.....	34
Tabela 4- Peptídeos e suas respectivas ações e alvo farmacológico	36
Tabela 5- Dados do Docking VEGFR-2/ KDRIP gerados pelo Haddock.....	47
Tabela 6- Interações de hidrogênio identificadas no complexo molecular formado entre o KDRIP e o receptor do fator de Crescimento do endotélio vascular (VEGFR-2)	46
Tabela 7- Interações hidrofóbicas identificadas no complexo molecular formado entre o KDRIP e o Receptor do fator de Crescimento do endotélio vascular (VEGFR-2).	47
Tabela 8- Dados do Docking Midkina-KDRIP gerados pelo Haddock	50
Tabela 9- Interações de hidrogênio identificadas no complexo molecular formado entre o inibidor (KDRIP) e a midkina (MK).	51
Tabela 10- Interações hidrofóbicas identificadas no complexo molecular formado entre o inibidor e a midkina (MK).....	51
Tabela 11- Interações de hidrogênio identificadas no complexo molecular formado entre o VEGFR-2 e o Albendazol	54
Tabela 12- Interações hidrofóbicas identificadas no complexo molecular formado entre o VEGFR-2 e o albendazol.....	54
Tabela 13- Interações de hidrogênio identificadas no complexo molecular formado entre o VEGFR-2 e o mebendazol.....	56
Tabela 14- Interações de hidrogênio identificadas no complexo molecular formado entre o VEGFR-2 e o mebendazol.....	56

Tabela 15- Interações de hidrogênio e hidrofóbicas identificadas nos complexos formados entre os inibidores e o receptor do fator de Crescimento do endotélio vascular (VEGFR-2).. 61

Tabela 16- Interações de hidrogênio identificadas no complexo molecular formado entre a midkina (MK) e o Mebendazol. 64

Tabela 17- Interações hidrofóbicas identificadas no complexo molecular formado entre o mebendazol e a midkina (MK) 65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ang- 1	Angiopietinas 1
Ang-1	Angiopietinas 2
Anti-EGFR	Inibidor do Receptor do Fator de crescimento epidérmico
Anti-HER2	Inibidor do receptor 2 do fator de crescimento da epiderme
ATP	Adenosina trifosfato
bFCF	Fator de crescimento de fibroblastos
BNS	Benzimidazol
C-kit	Receptor do fator de crescimento celular
COX 2	Ciclooxigenase 2
CR-X	Cristalografia de raio X
CSF-1R	Receptor do fator estimulador de colônias
FC	Fator de crescimento
FLT3	Receptor Fms-like da tirosina-quinase 3
HIF-1 α	Fator indutor de hipóxia
IL-1	Interleucinas 1
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
INCA	Instituto Nacional do Câncer
KDR	Domínio de inserção do receptor tirosina-quinase, gene que codifica VEGFR-2
MABS	Anticorpos monoclonais
MK	Midkina
NCI-US	<i>National Cancer Institute- United State</i>

NMR	Ressonância Magnética Nuclear
OMS	Organização Mundial de Saúde
P&D	Pesquisa e desenvolvimento
PDB	Protein Data Bank
PDGF	Fator de crescimento derivados de plaquetas
PDGFR- α	Receptor alfa do fator de crescimento derivado de plaquetas
PDGFR- β	Receptor beta do fator de crescimento derivado de plaquetas
PKDR	Peptídeo inibidor desenvolvido
PTN	Pleiotropina
RET	Receptor do fator neurotrófico derivado de células gliais
SUS	Sistema único de Saúde
TGF α	Fator de transformação de crescimento alfa
TKIs	Inibidores de tirosina-quinase
TNF β	Fator de necrose tumoral beta
TNF α	Fator de necrose tumoral alfa
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
VEGFR-1	Receptor 1 do fator de crescimento do endotélio vascular, ou (FLT-1)
VEGFR-2	Receptor 2 do fator de crescimento do endotélio vascular, ou FLK-1, ou KDR
VEGFR-3	Receptor 3 do fator de crescimento do endotélio vascular, ou (FLT4)
Δ GL	Energia livre padrão de Gibbs

1. INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença multifatorial, caracterizado pela exacerbada multiplicação celular e tem sido considerado um problema de saúde pública mundial. Em células normais o processo de divisão celular ocorre de forma localizada, autolimitada e controlada por sinais fisiológicos, sendo um mecanismo essencial para manter o equilíbrio dinâmico do organismo e formar ou regenerar tecidos. Em células neoplásicas ocorre a multiplicação de forma anormal e as células perdem as características iniciais do tecido, passando assim, a não responder aos estímulos que controlam a homeostase tecidual. Com a multiplicação desordenada das células o oxigênio e os nutrientes não conseguem mais nutrir o tumor. A hipoxia tumoral induz a ativação de genes e fatores de crescimento promovendo assim, a angiogênese. A angiogênese pode ser definida como a formação de vasos a partir de vasos pré-existentes, assim as células passam a ter possibilidade de migração e podem atingir outros tecidos e órgãos. Essa progressão tumoral é chamada de metástase (INCA, 2015).

Receptores de tirosina-quinase (RTK) disparam cascatas que culminam com a angiogênese, com destaque para VEGFR-2 (FLK-1 ou KDR) quando se ligam ao VEGF. A busca por substâncias inibidores do VEGF e de seus receptores tem sido frequente uma vez que, a neutralização da atividade biológica dos mesmos regride a vascularização tumoral, normaliza a vasculatura remanescente do tumor e inibe a formação de novos vasos, inibindo assim o crescimento tumoral (DESHPANDE, PYSZ, WILLMANN, 2010). Desse modo, o VEGF e seus receptores são usados como alvos moleculares para tipos de câncer na qual o fator é superexpresso.

Por outro lado, a elevada expressão de um fator de crescimento chamado midkina (MK) Além dos VEGF, um outro fator de crescimento a midkna (MK) também tem sido descrita como promotor da multiplicação celular e indutor da angiogênese, favorecendo a progressão tumoral. Devido as essas característica a midkina, tem sido alvo bioquímico para desenvolvimento de drogas o tratamento de diversas doenças como esclerose múltipla, doenças renais e principalmente câncer (KODOMATSU; MURAMATSU, 2014).

A terapia para o tratamento do câncer durante décadas ficou limitada a procedimentos cirúrgicos, radioterapia e uso de quimioterapia com toxicidade alta e eficiência variável. Entretanto, a maioria dos quimioterápicos disponíveis no mercado, atualmente disponíveis no mercado, são inespecíficos e agem a nível de DNA, o que leva a interferir em também é em células de tecidos saudáveis. Assim a busca por novos fármacos que atuem em alvos

moleculares seletivos é de extrema importância para o desenvolvimento de novos medicamentos para o câncer que sejam mais eficientes, mais específicos e que levam a menos consequências danosas ao organismo (VERBRIDGE et al., 2010, PRADO, 2014).

Nesse sentido, a utilização de ferramentas computacionais têm sido muito utilizada para o desenvolvimento de novas drogas. Os avanços na área de biotecnologia, o desenvolvimento de sistemas computacionais e a construção de bancos de biomoléculas possibilitam o desenho de novas drogas racionalmente baseada em alvos bioquímicos, bem como o entendimento do mecanismo de moléculas de interesse farmacológico. O planejamento racional de drogas, com base na estrutura molecular e no mecanismo de ação, tem sido a estratégia mais eficiente, uma vez que possibilita a otimização em todas as fases de produção síntese de substâncias farmacologicamente terapêutica (DURRANT; MCCAMMON, 2011).

O docking molecular (ancoragem molecular) é um método *in silico* que permite estimar a energia livre de ligação entre a proteína e o ligante, antes mesmo da sua síntese. Os custos computacionais com esse tipo de estudo são bem menores, se comparados aos gastos laboratoriais despendidos ao sintetizar e testar farmacologicamente vários compostos. Esta importante ferramenta tem sido usada para identificar compostos que não servem para serem designados como alvo, e desenhar os possíveis candidatos que apresentariam uma boa interação com o sítio ativo do receptor de interesse (RODRIGUES et al., 2012).

A partir da ancoragem molecular, são obtidas diferentes conformações espaciais do ligante, possibilitando ao analista identificar qual dentre estas é a mais provável na interação ligante-alvo. A partir de cada conformação espacial, são obtidas energias livres de ligação (entre ligante e alvo). A menor energia é considerada a mais provável para justificar a conformação da interação possibilitando selecionar moléculas com potencial farmacológico (KITCHEN, 2004).

Portanto, o uso dessa ferramenta computacional para construção de um peptídeo capaz de se ligar especificamente ao VEGFR-2 e a midkina representa uma estratégia relevante na busca de novas moléculas candidatas à fármacos antiangiogênico, por inibição da ação dessas proteínas.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

- Construir *in silico* um peptídeo capaz de se ligar especificamente ao receptor KDR (VEGFR-2) e Midkina (MK), com potencial para inibir a ação destas proteínas.

-

2.2 ESPECÍFICOS

- Caracterizar estruturalmente os domínios de ligação KDR (VEGFR-2) e seus potenciais para inibição da atividade de crescimento endotelial vascular (VEGF) e da midkina (MK);
- Estudar a topologia de superfície do receptor KDR (VEGFR-2) e dos ligantes, o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e da midkina (MK);
- Construir e validar um modelo tridimensional do peptídeo por meio de modelagem molecular por similaridade;
- Estudar as interações moleculares e a afinidade de ligação entre o peptídeo e o receptor do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR-2) e entre o peptídeo e a midkina, através do Docking Molecular.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 CÂNCER

3.1.1 Epidemiologia e etiologia

O câncer é uma problemática de saúde pública mundial sendo responsável por 12% das mortes no mundo, o que corresponde a aproximadamente 6 milhões de mortes por ano. Em países desenvolvidos, as taxas de incidência são superiores se comparadas a dos países em desenvolvimento. Estima-se que em países desenvolvidos 10 milhões de novos casos são diagnosticados por ano e em países em desenvolvimento esse número chega a 5,5 milhões de novos casos. Cerca de 60% do total de novos casos anuais do mundo ocorrem na África, Ásia e América Central e do Sul. Estas regiões são responsáveis por 70% das mortes por câncer no mundo (WHO, 2015).

Nos Estados Unidos em 2014, segundo o *Nacional Center for Health Statistica* foram diagnosticados 1.665.540 novos casos de câncer e 585.720 mortes causadas pela doença, fazendo com que a cada 4 mortes no país 1 seja causada pela doença (SIEGEL et al., 2014). No Brasil em 2016, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) apontou a ocorrência e diagnóstico de 595.070 novos casos de câncer no país, sendo 46% homens e 54% em mulheres.

Em países em desenvolvimento os tipos de cânceres mais incidentes são os cânceres de pele não melanoma, próstata, pulmão, colo retal e estômago para os de sexo masculino; e os cânceres mais frequentes em pessoas do sexo feminino são os de pele não melanoma, mama, colo retal, colo de útero e de pulmão. A perspectiva da Organização Mundial de Saúde (OMS) é que a taxa de mortalidade por câncer continue aumentando, podendo alcançar em 2030 números próximos de 11,5 milhões de óbitos, o que corresponde a um crescimento de 51% (INCA, 2014).

As causas que levam ao surgimento do câncer são variadas e podem ser divididas em causas genotípicas ou internas e fenotípicas ou externas. As causas internas ou genotípicas estão na maioria dos casos, associados a mutações genéticas, que está relacionado com a capacidade do indivíduo se defender de agressões externas. Em células normais estão presentes genes com capacidade de suprir alterações malignas, genes denominados supressores de tumor ou antioncogenes. Em indivíduos com neoplasia ocorre mutação desse gene o que possibilita a formação dos mais diversos tipos de câncer. As causas externas ou fenotípicas estão

relacionadas com o meio no qual o indivíduo está exposto, e inclui meio ambiente, hábitos e costumes que podem induzir alterações celulares (MARTENS, 2011; ACS, 2014).

O processo de desenvolvimento da neoplasia é complexo e divide-se em várias etapas, onde, em geral ocorre mais de uma mutação gênica. Processos celulares importantes, como crescimento, diferenciação e apoptose são regulados por sistemas de sinalização célula-célula, por sinais extracelulares (fatores de crescimento) e citocinas (BERNARDI; JACQUES-SILVA; LENZ, 2003). A divisão celular pode ocorrer em resposta a fatores de crescimento, que atuam sobre receptores de membrana tirosino-quinase, e leva a síntese de DNA.

A ativação de oncogenes ou a inativação de genes supressores de tumor pode resultar na proliferação desordenada, já que a progressão, no ciclo celular, depende da homeostase entre fatores regulatórios positivos e negativos. As forças regulatórias envolvem fatores de crescimento, uma série de ciclinas e cinases ciclina dependentes que estimulam a célula a entrar no ciclo celular (LOPES et. al., 2010; CUNHA, BOURROUL; SILVA, 2014). Para que ocorra o processo de ativação de genes e síntese proteica, as cíclicas se ligam as cinases ciclina dependentes ativando-as e liberando substrato de modo que ocorra a transcrição. A ação das ciclinas são moduladas por proteínas que se ligam as cinases ciclina dependentes inibindo-as. A formação dessas proteínas é induzida por genes chamados de supressores, como o gene p53 e o gene do retinoblastoma (FETT-CONTE; SALLES, 2002; CHARI et al., 2009).

Em casos de lesões no DNA, esses genes inibem o ciclo celular em pontos específicos e fazem o reparo. Caso não seja possível reparar o dano do DNA, a sinalização ocorre no sentido de estabelecer a apoptose (morte celular programada). Em células cancerosas, esse controle do ciclo celular é perdido, e faz com que a célula apresente anormalidade na função dos fatores de crescimento, função anormal da ciclina e da cinase ciclo dependente, síntese anormal de DNA e diminuição dos fatores regulatórios em decorrência de mutações nos genes supressores de tumor (TEIXEIRA et al., 2011; COSSI; LIMA; ANDRADE, 2015).

3.1.2 Patologia

O Câncer, também chamado de neoplasia maligna ou tumor maligno, é um termo universal utilizado para grupo de doenças que se caracterizam pela multiplicação desordenada de células que invadem tecidos e órgãos. As células cancerosas possuem propriedades bioquímicas, morfológicas e funcionais variadas. Como possui alto índice mitótico, seu crescimento é extremamente rápido, o que não ocorre com o estroma, que se desenvolve

lentamente levando muitas vezes resultando em necrose, hemorragias e ulcerações (WHO, 2015).

Devido à perda de diferenciação das células, as neoplasias malignas apresentam formas atípicas variadas, além de alterações na membrana plasmática, o que as tornam menos aderentes entre si e facilita o deslocamento da colônia neoplásica. Esse fato permite a movimentação e infiltração das células cancerosas em tecidos adjacentes, migração em vasos sanguíneos e linfáticos, e a partir deles, migram para outras regiões do corpo e induz a formações de outros tumores, evento denominado metástase (PAJUTTI, 2009). O processo de metástase é altamente complexo e depende da interação entre células malignas e diversos produtos gênicos, como moléculas de adesão, enzimas e fatores de crescimento que favorecem a angiogênese. Devido ao crescimento tumoral e a intensa vascularização o limite entre o câncer e regiões adjacentes são pouco definidos e em muitos casos em torno da lesão principal existem cordões de células neoplásicas que podem originar outros tumores (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

HANAHAN e WEINBERG (2000) relatam seis características que as células cancerosas possuem. Essa capacidade biológica diferenciada é adquirida durante o desenvolvimento de vários estágios dos tumores, e constituem o princípio organizador para racionalizar as complexidades do câncer. Entre as características descritas estão: a sustentação da sinalização proliferativa, insensibilidade a fatores anticrescimento (supressores tumorais), resistência a morte celular (evasão a apoptose), imortalidade replicativa, angiogênese sustentada e invasão e metástase. Recentemente acrescentou-se as características biológicas adquiridas por células tumorais, a reprogramação do metabolismo energético, deficiência na atuação do sistema imune, inflamação e alterações genômicas. Todos esses traços compõem o microambiente tumoral (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

3.1.3 Angiogênese

A angiogênese é um evento essencial para o desenvolvimento normal e homeostase nos tecidos, e consiste na formação de uma nova vasculatura a partir de vasos já existentes, como vênulas e capilares (RISAU, 1997). Definição do termo angiogênese foi proposta em 1971, a partir de um estudo, no qual isolaram de linhagens neoplásicas humana, o fator de angiogênese tumoral (*tumor angiogenesis fator*) (FOLKMAN, 1971). O processo de angiogênese ocorre na embriogênese, no desenvolvimento de tecidos, formação de óvulos e no processo de cicatrização (FOLKMAN, 2007). Entretanto, a angiogênese pode ser do tipo patológica e causar neovascularização, como ocorre em algumas doenças como: retinopatia proliferativa, diabetes

mellitus e crescimento tumoral, podendo ainda, acelerar a metástase (SANTOS; FREITAS; MIRANDA, 2007; CAPP et al., 2009).

O processo de angiogênese dá-se a partir da sinalização, por hipoxia e liberação de fatores de crescimento (FOLKMAN, 2003). Em primeiro estágio ocorre a ativação das células endoteliais dos vasos existentes, e a degradação da membrana basal adjacente. Uma vez degradada, por intermédio da atividade de proteases, serinas, células epiteliais, células do sistema imunológico e os fibroblastos, a membrana basal é invadida por células endoteliais livres. Posteriormente, as células endoteliais irão se proliferar e, por intermédio de fatores de crescimento, formar de novos brotos capilares (LAMALICE et al, 2007; ADANS; ALITALO, 2007). Finalizando o processo de angiogênese ocorre a formação de alças capilares e determinação da polaridade das células. Para garantir a estabilidade dos vasos recém-formado células mesenquimais migram e envolvem-os, posteriormente, diferenciando-se em pericitos ou células musculares lisas (ALITALO; TAMMELA; PETROVA, 2005; PRADO, 2014).

A formação de tumor é caracterizada por alterações genéticas das células em transformação. Essas mutações desencadeiam traduções errôneas, que geram perda no controle sobre o ciclo celular (DUNCAN et al., 2008). Desde a década de 60, sabe-se que alterações genéticas são responsáveis pelo crescimento tumoral, entretanto, a sobrevivência do mesmo seria limitada, ao atingirem 2 a 3 mm, se não fosse o efeito da angiogênese (MEURER, 2003). O desenvolvimento da massa tumoral até 3 mm ocorre sem limitações, uma vez que, mesmo sem vasos sanguíneos recebem nutrientes e oxigênio por difusão simples. Entretanto, com a multiplicação desordenada das células, o oxigênio e os nutrientes passam a se tornar limitados, o tumor deixa de crescer e morre devido a hipoxia. A partir de então conseguiram demonstrar que a atividade mitótica das células endoteliais estimulava a formação de novos vasos, concluindo assim que, a angiogênese era um pré-requisito para o desenvolvimento de neoplasias (FOLKMAN, 1990).

O padrão de crescimento tumoral depende da formação de novos vasos e está relacionado a diversos fatores locais que estimulam a angiogênese. Muitos são os fatores associados ao processo de vascularização entre esses se destacam: o fator de crescimento de fibroblástico (bFGF), fator de crescimento derivados de plaquetas (PDGF), fator de necrose tumoral (TNF α e TNF β), fator de transformação de crescimento (TGF α e TGF β), fator de crescimento derivado da heparina, fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), moléculas de adesão como integrinas e caderinas, fator indutor de hipoxia (HIF), interleucinas 1, 6 e 8 (IL-1, IL-6 e IL-8), ciclooxigenase 2 (COX 2) e as angiopoietinas 1 e 2 (ang-1 e ang- 2), além

da citocina midkina (MK), forte indutora angiogênica (POURGHOLAMI; MORRIS, 2008; KARAMYSHEVA, 2008).

A maioria dos fatores de crescimento envolvidos na angiogênese, incluindo o VEGF se ligam em receptores do tipo tirosina-quinase (TKR), que são proteínas transmembrana, caracterizadas por três segmentos: um domínio extracelular no qual recebe um ligante específico, um domínio transmembrana e um domínio tirosina-quinase citoplasmático. Quando ocorre a interação entre o ligante (Fator de crescimento) e seu receptor que estava na sua forma monomérica, une-se formando um dímero. A formação do dímero favorece a fosforilação do domínio intracelular, através da reação entre o ATP e resíduos de tirosina. A reação continua com a fosforilação de proteínas-alvo que possuem um domínio SH2, que possuem um sítio de reconhecimento para as fosfotirosinas. Essa fosforilação intracelular desencadeia uma resposta em cascata e induz eventos diversos (LEMMON; SCHLESSINGER, 2010; HANAHAN, WEINBERG, 2011). Em humanos, foram descritos 58 receptores tirosina-quinase (RTK), divididos em 20 subfamílias (LEITE et al., 2012).

A comunicação intracelular ocorre através de complexos sistemas enzimáticos, que constituem as vias de sinalização. Entre as vias de sinalização dos fatores de crescimento as mais importantes são as vias PI3K/Akt (Fosfatidilinositol 3-quinase/ proteína quinase) e a via Ras/Raf/MEK/MAPK, as quais desempenham papel importantes no crescimento, metabolismo, sobrevivência e divisão celular (MURER, 2008). As vias Ras/Raf/MEK/MAPK e PI3K/Akt desempenham papéis cruciais na transmissão de sinais provenientes dos receptores de FC para regular a expressão gênica e evitar a apoptose. Estas vias interagem entre si para regular o crescimento e, em alguns casos a carcinogênese. Além disso, os fatores dessa via podem estar mutados ou superexpressos em diversos tipos de câncer (MCCUBREY et al., 2007; STOFFEL, 2010).

3.1.3.1 O Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) pertence classe das citocinas, e também desempenha papel fundamental no processo de angiogênese. É formado pela interação de duas proteínas (dímero proteico), que sinaliza e ativa receptores de membrana expressos geralmente em células epiteliais. O VEGF pertence à classe das glicoproteínas diméricas, e em humanos, apresenta-se em cinco isoformas a partir do *splicing* alternativo, são elas: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e VEGF-E, sendo o VEGF-A a mais representativo no processo de angiogênese (YAMAZAKI et al., 2005). Além disso, é caracterizado como membro da

superfamília de fatores de crescimento que possuem uma amarração (nó) de cistina (*cystine knot growth superfamily of signaling proteins*), formada por 8 resíduos de cistina interligados por pontes dissulfeto (POURGHOLAMI; MORRIS, 2008; FREITAS et al., 2009).

A ativação do VEGF resulta na sinalização de uma cascata que exerce funções vitais como proliferação, sobrevivência, migração, diferenciação celular e aumento da permeabilidade vascular (ZHANG et al., 2013). O VEGF liga-se de forma seletiva e direta nos receptores VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3, induz o influxo de cálcio no citoplasma, favorecendo o aumento da concentração, mudança de forma, divisão e migração das células. Com maior permeabilidade das vênulas as proteínas citoplasmáticas atingem o espaço extracelular e leva a coagulação do fibrogênio e depósito de fibrina que será utilizada como matriz para formação de novos vasos. Esses eventos precedem a angiogênese e estão envolvidos em diversos processos fisiológicos e patológicos, e faz com que o VEGF seja um importante mediador da angiogênese (FÁTIMA; PAPA, 2010)

A secreção excretada por diversos fatores de crescimento e citocinas, incluindo, PDGF, EGF, TNF- α , TGF- α e IL-1, induz a transcrição do mRNA do VEGF (HICKLIN; ELLIS, 2005; BRITO; SHIAVON; MARANA, 2011). Na formação de novos vasos, o VEGF atua ligando-se as células endoteliais e ativa receptores de membrana que pertencem a família da tirosina quinase, são esses: VEGFR-1 (flt-1), VEGFR-2 (Flk-1 ou KDR), e VEGFR-3 (Flt4); sendo o VEGFR-2 o mais representativo receptor nas células do epitélio de vasos sanguíneos. Esses receptores possuem atividade da tirosina quinase, que são enzimas que catalisam a conversão do grupo fosfato da adenosina trifosfato (ATP) para resíduos tirosina em outras proteínas (fosforilação) (SHIBUYA; CLAEISSON-WELSH, 2006; POURGHOLAMI; MORRIS, 2008). A transdução de sinais dos receptores tirosina-quinase compreende basicamente cinco etapas bioquímicas. Em primeiro momento, ocorre a interação entre o ligante e o receptor, essa interação promove a dimerização do receptor, ativação da tirosina quinase e fosforização do receptor e por fim ocorre a ligação e ativação de proteínas que adaptam os sítios de fosforilação (CAPP et al., 2009, VELASCO; SÁNCHEZ; GUZMÁN, 2016).

A síntese de VEGF é decorrente de uma série de mecanismos. Condições de hipoxia desencadeada pelo fator de indução de hipoxia (HIF-1 α), promove a expressão do RNAm do VEGF e é responsável por regular a expressão de mais de 70 genes envolvidos no processo de formação de novos vasos, apoptose e glicólise. Concentrações baixas de oxigênio e nutrientes indicam a necessidade de vascularização, o que irá ativar o HIF-1 α e conseqüentemente induzir angiogênese (TAMMELA et al., 2005; VIEIRA et al., 2005). O aumento da atividade do HIF-1 está correlacionado com o grau de angiogênese tumoral, desse modo, a inativação ou inibição

dos fatores de angiogênese pode ter inúmeras aplicações terapêuticas para câncer (HICKLIN; ELLIS, 2005; ZHANG et al., 2013; ESWARAPPA; FOX, 2015).

De fato, o aumento da expressão do VEGF está associada com a progressão do tumor e um pior prognóstico em diversos tumores, como os carcinomas colorretal (KABBINAVAR et al., 2003), gastrintestinal, (BROWN et al., 1993), de mama (SCHNEIDER; MILLER, 1997), de próstata, de cabeça e pescoço (EISMA; SPIRO; KREUTZER, 1997; BERKMAN et al., 1997), renal (RINI; SMALL, 2005), de pulmão (STEFANOU et al., 2004; , ERIKSSON et al., 2006), de ovários (DUNCAN et al., 2006), de colo uterino (GUIDI et al., 1995), melanoma (UGUREL et al., 2001) e tumores da tireoide (VIEIRA et al., 2005), portanto representa um alvo para doença.

3.1.3.2 Midkina (MK)

Midkina (MK ou MDK), também conhecido como Fator de estimulação do crescimento neural 2 (NEGF-2), é uma proteína que, em seres humanos é codificada pelo gene *MDK*. A midkina pertence à família de fatores de crescimento de ligação à heparina, que desempenha diversos papéis fisiológicos tais como o crescimento de fibroblastos, sobrevivência de neurônios e expressão de quimiocinas, entretanto, ela também tem sido descrita como forte papel nos processos de angiogênese tumoral (ZHAO; YANG; LU, 2012).

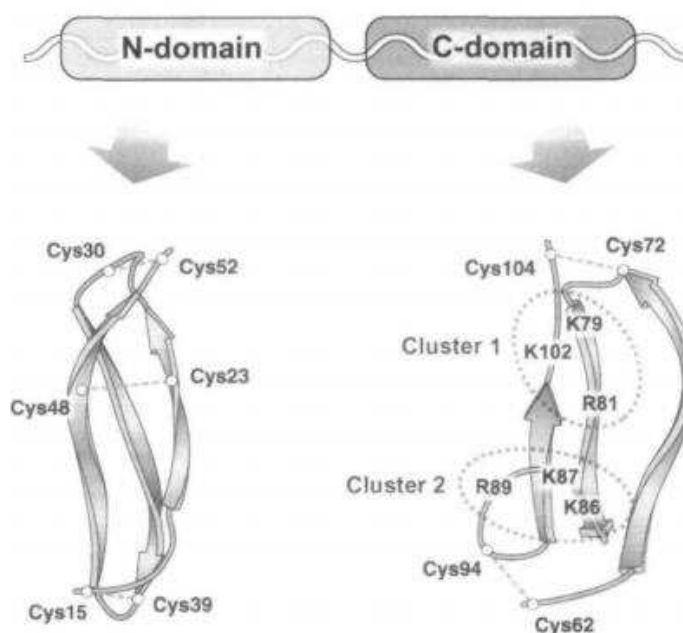
Esta proteína é altamente expressa no período gestacional uma vez que favorece a multiplicação celular, entretanto, é um processo controlado e após o término da gestação a expressão da midkina é cessada. . Em patologias como o câncer, ocorre um aumento na expressão da proteína que promove uma multiplicação celular e indução da angiogênese, o que favorece a progressão tumoral (KISHIDA; KODOMATSU, 2013). Devido as essas característica a midkina, tem sido alvo bioquímico para desenvolvimento de drogas o tratamento de diversas doenças como esclerose múltipla, doenças renais e principalmente câncer (KODOMATSU; MURAMATSU, 2014).

O gene da midkina foi identificado em 1997 (TAKATA; MURAMATSU; MURAMATSU, 1997), em uma biblioteca de DNAC de linhagens de teratocarcinoma testicular (HM-1). Posteriormente, o gene foi identificado em várias espécies de animais e em humanos. A MK é altamente expressa em muitos tumores malignos, incluindo o de pulmão, esôfago, estômago, cólon, hepatocelular, mama, renal e carcinoma pancreático (HAO et al., 2013), e em tecidos normais é expressa em concentrações muito baixas ou não está presente (MAEDA; SHINCHI; KURAHARA; 2007). KOSUGI e colaboradores (2012) relatam que a midkina

apresenta funções biológicas no sistema nervoso, em processos inflamatórios e em doenças como câncer. Sendo assim, o potencial de atuação da MK como biomarcador para diagnóstico, prognóstico e tratamento dessas doenças é inquestionável (YU et al., 2013; MATUSIEWICZ et al., 2014).

A MK é uma proteína de peso molecular de 13 kDa e estruturalmente composta por dois domínios formados por três fitas β antiparalelas (Figura 1). A família Midkina, é composta por dois membros a MK e a pleiotropina (PTN), e é caracterizada pela presença de aminoácidos básicos, pelo par de resíduos de cisteína altamente conservados e presença de dois domínios (N-terminal e C-terminal) sendo ambas as proteínas compostas de três fitas β antiparalelas (LIM et al., 2013). Entretanto, na MK a ligação a heparina se dá principalmente no domínio C-terminal nos dois sítios, sítio I (K79, K102 e R81) e sítio II (K86, K87 e R89), enquanto que na PTN a ligação ocorre em ambos os domínios (N-terminal e C-terminal) (MARAMATSU, 2002; KADOMATSU et al., 2004).

Figura 1- Organização do domínio de midkina (MK) e a estrutura tridimensional dos domínios e dois sítios de ligação da heparina no C-domínio.



Fonte: MURAMATSU, 2002.

Em várias linhagens de neoplasia humana, a hipoxia é induzida pela expressão da MK. Desse modo, o crescimento do tumor e o aumento das citocinas do nível sérico em pacientes com câncer estão ligados a MK (RYDÉN; BOIESEN; JONSSON, 2004). Estudos mostraram uma correlação positiva no aumento do RNAm e a expressão da proteína com o tamanho e

malignidade do tumor. Ao injetar a MK em ratos, observaram o aumento da densidade de vasos e a proliferação de células endoteliais no tumor (MURAMAKI et al., 2003). Em células endoteliais de tecidos de tumores neurais foi encontrada uma elevada expressão da MK, o que sugere, que esse tipo de células representa uma fonte de MK durante o processo de angiogênese tumoral (MASHOUR et al., 2001). Dai e colaboradores (2007) demonstraram que oligonucleotídeos antissense contra a MK inibiu o crescimento de células endoteliais, e conseqüentemente a angiogêneses *in vitro*. A inibição da MK está ainda correlacionada com supressão da angiogênese induzida por VEGF em carcinoma de células escamosas bucais (MASAI et al., 2016). Assim, a inibição da MK, fator chave no desenvolvimento de neoplasia, é um importante alvo bioquímico para desenvolvimento de novas drogas (MUTSUKO et al., 2009; WECKBACH et al., 2012).

3.2 DESENVOLVIMENTO DE DROGAS

3.2.1 Inovação de fármacos: Estado da arte

A inovação tecnológica é um fator diferencial na competitividade entre empresas e países. A inovação de fármacos é um processo altamente complexo, longo e oneroso, podendo ultrapassar 1 bilhão de dólares atualmente. O desenvolvimento de produtos tecnológicos deve ser dividido em etapas e cada etapa deve ser bem planejada de modo a prever que os casos de insucesso sejam interrompidos o quanto antes. Para que uma nova tecnologia chegue ao mercado são requeridos muitos anos desde pesquisa até o desenvolvimento final da droga (GUIDO; OLIVA, 2009). A descoberta de biomoléculas com potencial farmacológico pode ocorrer através de quatro formas distintas, sendo elas: ao acaso, fontes naturais, fontes sintéticas e virtuais (*in silico*) (TAVARES, 2014).

A síntese de fármacos é um importante capítulo no desenvolvimento de drogas, uma vez que, permite a construção de moléculas altamente complexas. Além disso, a síntese orgânica possibilita a otimização do processo permitindo desse modo, melhores rendimentos e alto grau de pureza. O ácido acetilsalicílico é considerado um fármaco sintético pioneiro. Baseado na salicina, produto natural obtido de folhas e casca do salgueiro-branco, o ácido acetilsalicílico (AAS) foi sintetizado em 1897 pelo químico alemão Felix Hoffman e deu origem a primeira patente na área de medicamentos. A droga sintética desenvolvida por Hoffman possui ação anti-inflamatória, antipirética, analgésica e atua como antiagregante plaquetário. (MENEGATTI, MANSUR, BARREIRO, 2001).

O processo de P&D passou por modificações notáveis ao longo do tempo. Na década de 50 os programas de pesquisas utilizavam estratégias de modificação estrutural e otimização de compostos. A partir de 1960, com a criação do computador de acesso múltiplo e a criação do primeiro Banco de dados de proteínas (*Protein Data Bank (PDB)*), foi possível utilizar estratégias de modificação a nível molecular. As estratégias de modificação molecular possibilitaram o desenvolvimento de uma droga bilionária, o captopril (GUETERRES et al., 2014).

Os avanços na década de 80 voltados para biologia molecular possibilitou a compreensão de alvos bioquímicos o que favoreceu o desenvolvimento de drogas de forma racional, baseadas no mecanismo de ação desejado e nos alvos bioquímicos. Esses avanços favoreceram ainda o desenvolvimento de ferramentas computacionais, e a partir de então, análise de receptores e ligantes passaram a ser possível (HACKE et al., 2014).

Nas últimas duas décadas o desenho racional de fármacos vêm sendo o mais eficiente para se chegar em inovações e aos poucos vem se consolidando, uma vez que, torna possível obter fármacos reduzindo tempo e custo de pesquisa e desenvolvimento. A aplicação dessa ferramenta na indústria farmacêutica teve um impacto positivo no processo de pesquisa e desenvolvimento (P&D), e nas exigências requeridas para introdução de uma nova droga no mercado. O desenvolvimento de drogas baseadas no desenho racional proporciona à indústria farmacêutica, meios para substituir métodos de busca empírica e aleatória de substâncias com ação farmacológica. A utilização do desenho de drogas visa realizar uma abordagem planejada e racional de um produto, utilizando moléculas específicas, desenhadas para atuar em locais ou patógenos específicos (VIEIRA; OHAYON, 2006).

3.2.2 Aspectos históricos e contemporâneos da terapia farmacológica do câncer

No início do século XX foram relatados os primeiros estudos para desenvolvimento de agentes quimioterápicos. O químico alemão Paul Ehrlich é tido como um dos pioneiros nesse estudo e buscava através de triagens reduzir o número de substâncias que poderiam suprimir tumores transplantados em ratos, o que possibilitaria conhecer e selecionar substâncias com menor potencial tóxico e maior capacidade de supressão de tumores (PAPAC, 2001).

Em 1937 foi criado nos Estados Unidos o Instituto Nacional de Câncer (*National Cancer Institute- NCI-USA*), e a partir de então começaram a ser desenvolvidos estudos para o desenvolvimento de drogas, sendo inseridas no arsenal quimioterápico mostardas nitrogenadas para o tratamento de linfomas, e hormônios para o tratamento de câncer associados as gônadas.

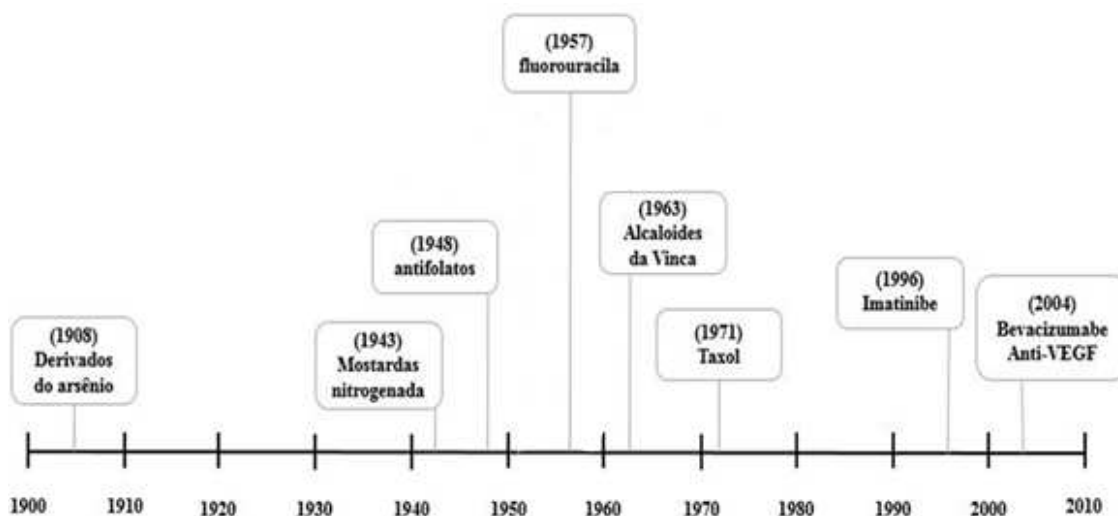
Em 1955, foi criado o Centro Nacional de Serviços em Quimioterapia do Câncer, primeiro núcleo mundial especializado em tratamento de pacientes com câncer, o que favoreceu o desenvolvimento de terapias mais eficientes (TAVARES, 2014).

No final dos anos 50 como a evolução da biologia molecular, surgiu a fluorouracila, um antimetabólito que interfere na duplicação e transcrição do DNA. Embora o mecanismo de ação desse fármaco ainda não ter sido completamente elucidado, a ação mais provável é que seja pela ligação do fluorodeoxiribonucleotídeo monofosfatado, um metabólito da droga à timidato sintetase, inativando-a e impedindo a síntese das timinas e consequentemente a síntese do DNA (PANDOUFO et al., 2005). Em 1960 ocorreu outra grande descoberta: os alcaloides da vinca (*Catharanthus roseus*). Essas substâncias atuam ligando-se às β -tubulinas inibindo a polimerização dos microtúbulos, e as principais drogas representantes dessa classe são a vimblastina e vincristina, aprovados pela FDA em 1963 e 1965 respectivamente (BRANDÃO et al., 2010).

No início da década de 70 o arsenal quimioterápico ganha mais um aliado. Extraído do *Taxus brevifolia*, o taxol atua diretamente sobre o microtúbulo, impedindo a despolimerização das moléculas de tubulina. Este mecanismo de ação, impede a manutenção da homeostase entre as formas da tubulina, que ocorre no citoplasma, e dessa forma deixa de exercer funções fundamentais como: condução de cromossomos durante a fase de mitose, transdução de sinais intracelular, além do não mantimento da estrutura da célula, o que faz com que não haja multiplicação celular (SCHIFF; FANT; HORWITZ, 1979; NICOLAOU et al., 1994).

Nas últimas duas décadas surge os primeiros fármacos baseado na terapia-alvo, dirigida aos ligantes (fatores de crescimento) e aos seus receptores ou ainda às biomoléculas envolvidas nas vias de sinalização tumoral. Devido a especificidade da terapia-alvo a pesquisa e desenvolvimento de novas drogas baseada em ligante/ receptor tem sido promissora (LEITE et al., 2012). Os avanços na compreensão da biologia do câncer permitiram um manejo clínico e desenvolvimento de fármacos menos danosos ao paciente. O crescente conhecimento molecular e das vias de sinalização de receptores tirosina-quinase possibilitaram o desenvolvimento de diversas terapias alvo, incluindo os inibidores de tirosina-quinase (TKIs) e os anticorpos monoclonais (MABS) que também atuam inibindo fatores de crescimento e seus receptores (LEITE et al., 2012). A Figura 2 traz a linha cronológica do avanço de drogas utilizadas para tratamento do câncer do último século.

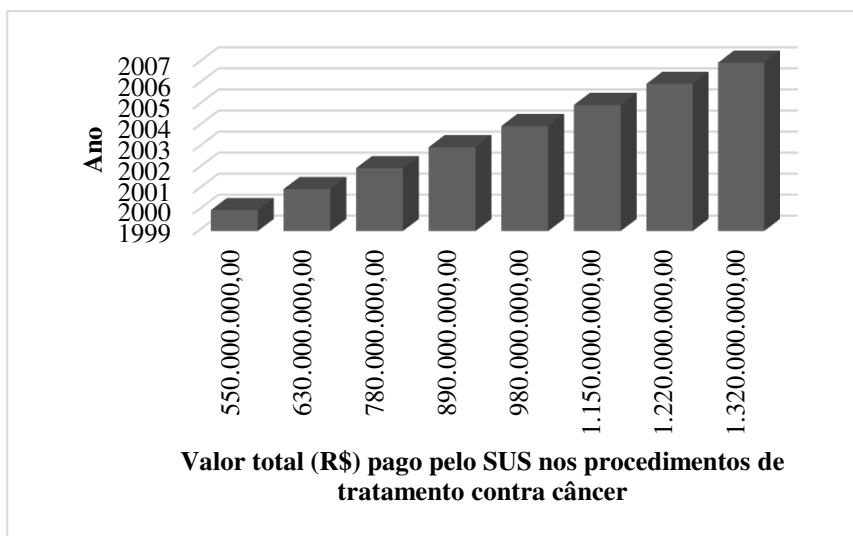
Figura 2- Linha cronológica das inovações terapêuticas utilizadas no tratamento do câncer.



Fonte: Adaptado de ALI, et al., 2012; TAVARES, 2014.

Apesar dos avanços no desenvolvimento de drogas, o tratamento contra o câncer ainda é complexo e oneroso. Muitos tratamentos são eficazes, entretanto, muito tóxicos afetando órgãos saudáveis, limitando o emprego de quimioterápicos e reduzindo as chances de sucesso do tratamento. Além disso, outro impedimento da eficácia da terapia antitumoral é a resistência que as células cancerosas vêm adquirindo aos quimioterápicos. Muitos mecanismos de resistência têm sido descobertos, entretanto, essa continua sendo a principal causa de morte de pacientes com câncer (SÁ, 2014). Outro fator que tem limitado o tratamento de câncer são os altos custos. A Figura 3 mostra os custos totais para o SUS (Sistema único de Saúde) com tratamento oncológico dos anos de 2000 a 2007. Esses valores compreendem custo com cirurgia oncológica, radioterapia e quimioterapia (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

Figura 3- Valores pagos pelo tratamento oncológico, SUS- Brasil (2000-2007).



Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009.

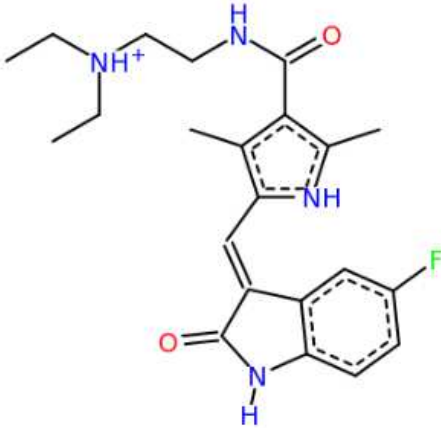
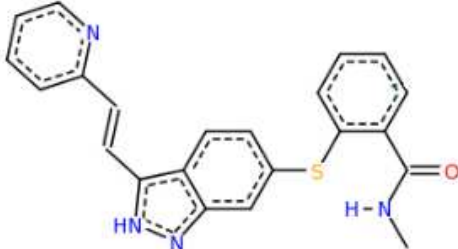
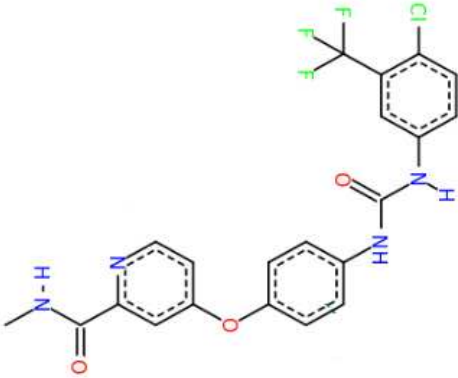
3.2.2.1 Inibidores da tirosina-quinase e anticorpos monoclonais

Atualmente, as principais abordagens terapêuticas que envolvem receptores são baseadas no uso de pequenas moléculas inibidoras da tirosina-quinase (do inglês, *Tyrosine Kinase Inhibitors ou TKIs*) e Anticorpos monoclonais (do inglês, *Monoclonal Antibodies ou MAbs*) (LEMMON; SCHLESSINGER, 2010; LEITE et al., 2012). Bem mais específicos que os fármacos usados até então, os fármacos que atuam via tirosina-quinase ligam-se aos receptores de membrana específicos impedindo assim que a célula sinalize para ações essenciais, como multiplicação, manutenção e sobrevivência da célula (TAVARES, 2014).

Os TKIs são moléculas que impedem a fosforilação do domínio citoplasmático tirosina-quinase e assim competem pelo sítio de ligação do ATP. Sem a ativação do grupo fosfato não há ativação da cascata de sinalização. Essas moléculas podem atuar de forma reversível ou irreversível e ainda podem ligar-se a um receptor ou vários (terapia multialvo) (FAUSEL, 2007). Alguns dos TKIs disponíveis são relativamente específicos para o receptor como por exemplo, os fármacos Erlotinibe e o Gefitinibe, específicos para o fator de crescimento epidérmico (EGFR).

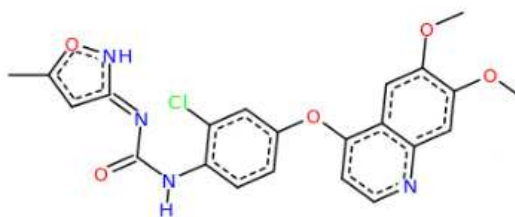
Mais comumente, os fármacos são desenvolvidos para atuar em mais de um alvo, por exemplo: sunitinibe, axinibe, tivozanibe e sorafenibe, todos atuando no VEGFR-2 de forma específica ou não. O nome IUPAC, estrutura 2D e fórmula química desses fármacos estão mostrados na Tabela 1.

Tabela 1- Nome e IUPAC, estrutura 2D e fórmula química de fármacos inibidores de VEGFR-2.

NOME/ SISTEMA IUPAC	ESTRUTURA 2D	FÓRMULA QUÍMICA
<p>SUNITINIBE</p> <p>IUPAC: <i>N</i>- (2-diethylaminoethyl) -5- [(<i>Z</i>)-(5-fluoro-2-oxo-1<i>H</i>-indol-3-ylidene)methyl]-2,4-dimethyl-1<i>H</i>-pyrrole-3-carboxamide</p>		$C_{22}H_{27}FN_4O_2$
<p>AXITINIBE</p> <p>IUPAC: <i>N</i>-Methyl-2- [[3-[(<i>E</i>)-2-pyridin-2-ylethenyl]-1<i>H</i>-indazol-6-yl]sulfonyl]benzamide</p>		$C_{22}H_{18}N_4OS$
<p>SORAFENIBE</p> <p>IUPAC: 4-[4-[[4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl]carbamoylamino] phenoxy]-<i>N</i>-methyl-pyridine-2-carboxamide</p>		$C_{21}H_{16}ClF_3N_4O_3$

TIVOZANIBE**IUPAC:**

1-[2-chloro-4-(6,7-dimethoxyquinolin-4-yl)oxyphenyl]-3-(5-methyl-1,2-oxazol-3-yl)urea


 $C_{22}H_{19}ClN_4O_5$

Fonte: Protein Data Bank (PDB).

O sunitinibe (Sutent®, Pfizer) é um fármaco aprovado pela *Food and Drug Administrations* (FDA) em 2006 para o tratamento de carcinomas renais e gastrointestinais. É uma droga multialvo que atua inibindo múltiplos receptores da tirosina-quinase que estão implicados no crescimento tumoral, na neoangiogênese e na progressão do câncer. O sunitinibe foi identificado como inibidor os receptores do fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGFR α e PDGFR β), receptores do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3), receptor do fator das células estaminais (KIT), receptor Fms-like da tirosina-quinase 3 (FLT3), receptor do fator estimulador de colônias (CSF-1R) e o receptor do fator neurotrófico derivado de células gliais (RET) (SHUKLA et. al., 2009). O Sunitinibe exibe atividade antitumoral e antiangiogênica estudada tanto *in vitro* como *in vivo* (MENDEL; LAIRD; XIN, 2003).

Axitinibe (Inlyta®, Pfizer) é um potente inibidor que atua de forma seletiva no fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR), receptores de 1, 2 e 3. Estudos pré-clínicos sugerem que Axitinibe possui atividade antitumoral, uma vez que atua inibindo a angiogênese. Foi aprovado pela FDA para o tratamento de câncer de rins avançado (RIXE et al., 2007).

O Sorafenibe (Nexavar®, Bayer) é um inibidor de múltiplas tirosina-quinases, que age tanto nas células tumorais como nas células vasculares do tumor. Seu mecanismo de ação consiste na inibição tanto de receptores (VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3, PDGFR- β , c-KIT, FLT-3 e RET) quanto das vias intracelulares RAS/RAF/ MAPK (WILHELM; CATER; TANG, 2004). Estudos mostram a eficiência desse fármaco em carcinomas hepatocelular, carcinoma de células renais e carcinoma de tireoide (STRUMBERG, 2005).

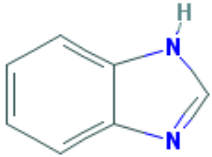
Tivozanibe (AVEO *Pharmaceuticals*) é um potente e seletivo inibidor do fator de crescimento do endotélio vascular, atuando nos receptores 1, 2 e 3. Além disso, inibe outros receptores como o fator de crescimento derivado de plaquetas. O fármaco atua inibindo formação de novos vasos sanguíneos que levam ao crescimento das células cancerígenas e é usando no tratamento de câncer renal e câncer gástrico (MOTZER et al., 2010).

MABs são imunoproteínas capazes de reconhecer e ligar-se a antígenos tumorais específicos (alvos), desencadeando respostas imunológicas. Assim, as células normais são poupadas e provocam efeitos menos tóxicos que a quimioterapia tradicional. Esses agentes atuam através de vários mecanismos, como por exemplo, bloquear receptores ou fatores de crescimento essenciais à célula, induzir apoptose, ligar-se a alvos celulares e recrutar funções, como citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) ou citotoxicidade complemento dependente (CDC) (TRIKHA; YAN; NAKADA; 2002). Os Mabs atuam de modo específico, por exemplo, o Bevacizumabe atua como anti-VEGF e é usado em pacientes com glioblastoma e câncer de mama (VITRY et al., 2015); Trastuzumabe (anti-HER2) usado para tratamento de câncer de mama e adenoma gástrico e Cetuximabe (anti-EGFR) usado para tratamento de câncer de cabeça e pescoço (LEITE, 2012).

3.2.3 Potencial antitumoral de fármacos com anel benzimidazólico

O Benzimidazol (BNS) (Tabela 2) é parte da estrutura de muitos fármacos comumente utilizados tanto para tratamentos veterinários quanto para humanos. Os BNS são um grupo de compostos heterocíclicos que tem mostrando uma ampla atividade anti-helmíntica de largo espectro. Eles são utilizados como antinematódeos e agentes antiprotozoários. Recentemente, devido a sua capacidade de atuar no processo de mitose, o BNS vem sendo citado como agente antitumoral (POURGHOLAMI et al., 2005).

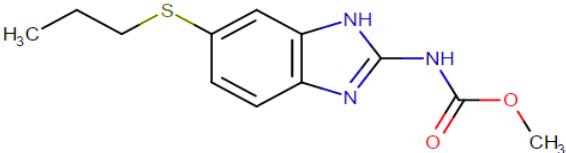
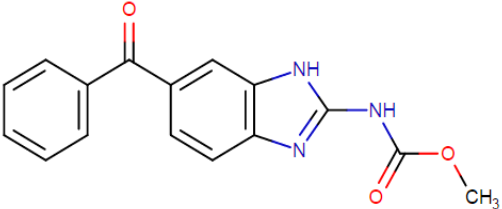
Tabela 2- Estrutura química, fórmula molecular e peso molecular do benzimidazol.

Estrutura	Fórmula molecular	Peso molecular
	C ₇ H ₆ N ₂	118.139 g/mol

Fonte: PubChem Data Base.

O albendazol e o mebendazol são fármacos que possuem na sua estrutura o anel benzimidazólico e suas estruturas podem ser verificadas na Tabela 3.

Tabela 3- Estrutura químicas de derivados bioativos do benzimidazol analisadas para desenvolvimento do peptídeo inibidor.

Nome	Estrutura 2D	Fórmula Molecular
ALBENDAZOL		C ₁₂ H ₁₅ N ₃ O ₂ S
MEBENDAZOL		C ₁₆ H ₁₃ N ₃ O ₃

Fonte: PubChem Data Base.

Albendazol é um carbamato benzoimidazólico de amplo espectro com efeito anti-helmíntico e antiprotozoários, usado mundialmente tanto para nematoides intestinais e teciduais, quanto para formas larvárias de alguns cestódeos. Possui atividade larvicida, ovidica e vermícida, exercendo efeito anti-helmíntico através da inibição da polimerização da tubulina (DEL ROSARIO, 2016). Os inibidores de tubulina, como o albendazol, têm atraído muita atenção, uma vez que podem atuar como agentes antitumorais e antimitóticos e estão sendo utilizados como agentes quimioterapêuticos. Estudos mostram a ação antitumoral do albendazol frente a diversas linhagens de câncer (POURGHOLAMI, 2001; POURGHOLAMI et al., 2006; POURGHOLAMI, WANGOO, MORRIS, 2008; MORRIS; JOURDAN; KRÁLOVÁ et al, 2013; NOORANI et al., 2015; HANUSOVA et al., 2015; CASTRO et al., 2016).

O mebendazol é um benzimidazólico sintético que apresenta um amplo espectro de atividade anti-helmíntica, sendo eficaz contra um grande número de espécies de nematódeos (AGATONOVIC-KUSTRIN et al., 2008). É um agente ativo frente à nematódeos e cestóides, sendo utilizado na terapêutica humana e animal, principalmente para combater as parasitoses

do lúmen intestinal (KUMAR et al., 2008). A ação anti-helmíntica do mebendazol está relacionada com a desregulação dos microtúbulos e consequentemente interrupção do ciclo normal de divisão celular. Esta característica faz com que o mebendazol exiba propriedades antitumoral *in vitro* e *in vivo* (SASAKI et al., 2002), relatadas por uma gama de autores frente a diversos tipos de câncer (MUKHOPADHYAY et al., 2001; DOUDICAN et al., 2008; NYGREN et al., 2013; BAI et al., 2014; NYGREN; LARISSON, 2014; HANUSOVA et al., 2015; PINTO et al., 2015).

3.2.4 Potencial antitumoral de peptídeos

Peptídeos são polímeros de cadeia curta de aminoácidos (não superiores a 100 aminoácidos) que desempenham funções proeminentes no sistema endócrino (hormônios), fatores de liberação de hormônios, neuromoduladores e neurotransmissores. Essas biomoléculas vêm sendo muito estudadas por apresentarem grande diversidade química, que os tornam capazes de ligar-se a alvos fundamentais que influenciam os processos fisiológicos, como a coagulação sanguínea, hemostasia nos sistemas cardiovascular e nervoso, além de, ligar-se aos receptores de membrana responsáveis por transdução de sinais (GEORGIEVA et al., 2008). Além disso, as interações proteína-peptídeo são vitais para a célula, pois, atuam como mediadoras, inibem ou servem como componentes estruturais em quase 40% de todas as interações macromoleculares, e são frequentemente associados a doenças, tornando-os interessantes para o desenho de drogas proteicas (TRELLET; MELQUIOND; BONVIN, 2013).

Os polímeros de cadeia curta possuem três características desejáveis para o desenvolvimento de fármacos, são elas: tamanho molecular reduzido, baixo peso molecular e baixa imogenicidade. Por apresentarem tamanho molecular pequeno (compostos por até 50 aminoácidos) esses peptídeos são carregados no sangue e nos tecidos sadios rapidamente e devido ao seu baixo peso molecular é rápida e homogênea a penetração no tumor, o que permite um esquema terapêutico que envolva a administração de doses múltiplas (PAJUTTI, 2009).

A alta especificidade, o tamanho reduzido, a estabilidade de estrutura e a possibilidade de síntese têm tornado os peptídeos uma alternativa promissora para o desenvolvimento de protótipos de novas drogas e testes diagnóstico/ prognóstico para doenças que não responde aos fármacos disponíveis, como é o caso da neoplasia maligna (CALVETE et al., 2009). A tabela 4 mostra a diversidade de peptídeos estudados e suas respectivas atividades terapêuticas.

Tabela 4- Peptídeos e suas respectivas ações e alvo farmacológico.

PEPTÍDEO	AÇÃO	ALVO	REFERÊNCIA
AGAP	Antitumoral	Linfoma, leucemia, glioma humano, câncer de cólon	CAO et al., 2010
Alfa-defensina	Antitumoral	Adenocarcinoma de pulmão	XU et al., 2008
Aplidine	Indutor de apoptose	Melanoma, células de pulmão, ovário	FAIVRE et al., 2005
Bacteriocina	Antibacteriana	<i>Enterococcus faecalis</i>	AMORTEGUI, 2014
Brevinin-R2	Antitumoral	Leucemia, linfoma, carcinoma de cólon, fibrosarcoma, adenocarcinoma de mama, carcinoma de pulmão	GHAVAMI et al., 2008
Buforin IIb	Indutor de apoptose	Leucemia, câncer de mama, melanoma, rim, ovário, próstata e câncer de cólon	LEE et al., 2008
Cn-AMP1	Antitumoral	Adenocarcinoma coloretal	SILVA et al., 2012
Cn-AMP1	Antibacteriana	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	MANDAL et al. , 2009

Continua

Tabela 4- Peptídeos e suas respectivas ações e alvo farmacológico.

Continuação

CPAP	Antitumoral	Câncer de fígado humano	WANG, ZANG, 2013
CrACPI	Antitumoral	Câncer epidermóide humano, carcinoma de cólon	MANDAL et al., 2012
CS5931	Antitumoral	Carcinoma colorretal humano	CHENG et al., 2012
Ctriporin	Antibacteriano e antifúngico	<i>Staphylococcus aureus, Micrococcus luteus, Staphylococcus epidermidis, Candida albicans</i>	FAN et al., 2011
Gomesina	Antifúngica	<i>Candida albicans</i>	ROSSI et al., 2012
Hemofiminas	Antitumoral	Câncer de pâncreas, adenocarcinoma de cólon, glioblastoma	ZAMPELLA et al., 2009
LL-37	Antitumoral	Câncer de Ovário	CHUANG et al., 2009
Lunasina	Antitumoral	Câncer de Mama	HSIEH et al., 2005
MERE 15	Antitumoral	Adenocarcionoma de pulmão	WANG et al., 2012

Continua

Tabela 4- Peptídeos e suas respectivas ações e alvo farmacológico.

Continuação

Microlonina A	Inibidor de apoptose	Câncer de Mama	ZHANG; 1999	LONGLEY,
Pandinin 2	Antibacteriana e antifúngica	<i>Candida albicans, Pseudomonas aeruginosa, Entereococcus faecalis, Escherichia coli, Staphylococcus aureus</i>	CORZO et al., 2001	
PG1	Antifúngica	<i>Candida albicans</i>	CHO et al., 1998	
Pg-AMP1	Antibacteriana	<i>Klebsiella sp., Proteus sp.</i>	PEREGRINI et al., 2009	
PvD1	Antifúngica	<i>Candida albicans, Candida parapsilosis, Candida tropicalis, Saccharomyces cerevisiae</i>	GAMES et al., 2008	
RA-XVII	Antitumoral	Leucemia	HITOTSUYANAGI et al., 2004	
Simpostantina 1	Inibição da multiplicação de células	Tumor de cólon e mama	MOOBERRY et al., 2003	

Continua

StAPI	Indutor de apoptose	Leucemia	MENDIETA et al., 2010
Tabela 1- Peptídeos e suas respectivas ações e alvo farmacológico.		<i>Staphylococcus aureus, Candida albicans</i>	GUO et al., 2013
Vulgarinin	Inibição da multiplicação celular	Leucemia, câncer de mama	WONG; NG, 2005

3.2.5 Ferramentas computacionais no desenho racional de drogas

O avanço da biotecnologia, biologia molecular e o desenvolvimento de sistemas computacionais possibilitou a construção de moléculas mais específicas desenhadas de forma lógica e baseada em alvos bioquímicos. O desenho racional de fármacos parte da escolha de um alvo específico, em geral, uma proteína. O desenvolvimento racional de uma droga para o câncer é extensivo, complexo e envolve refinamento molecular estrutural, a fim de otimizar propriedades físico-químicas do ligante em função do alvo terapêutico. O objetivo principal do desenho de droga é desenvolver um fármaco que apresente do ponto de vista bioquímico a melhor interação com o receptor (molécula-alvo) (ALONSO; BLIZNYNK; GREARY, 2006).

Os estudos de sequenciamento de nucleotídeos e aminoácidos proporcionaram a compreensão de genomas inteiros e com o auxílio de técnicas moleculares é possível determinar a função de genes específicos, o que acelera a descoberta de alvos farmacológicos, uma vez que interação proteína-proteína, proteína-ácido nucleico e fármaco-ácido nucleico desempenham papel fundamental em diversos processos fisiológicos e patológicos (HERNANDÉZ-SANTOYO, et al., 2006). Apesar desses avanços, a determinação de estrutura tridimensional de moléculas continua sendo um desafio para casos especiais, uma vez que as técnicas mais usadas, cristalografia de raios X (CR-X) e Ressonância Magnética Nuclear (NMR), são muito onerosas e complexas, além disso, muitas vezes é necessário estudos mais avançados para determinação da dinâmica molecular (DURRANT; MCCAMMON, 2011).

A compreensão da estrutura conformacional das moléculas é determinante no desenho de novas drogas, uma vez que possibilita verificar se existe interação com o alvo terapêutico. Alguns bancos de dados como o PDB, disponibilizam a estrutura dimensional de proteínas determinadas por NMR e CR-X, e a partir de então, é possível determinar regiões de ligação e apontar possíveis estruturas que se ligam a região alvo desejada (ROSE et al., 2013; FINN et al., 2014).

O docking molecular é uma ferramenta computacional que permitem verificar as características de ligação entre receptores e ligantes. Além disso, a partir do procedimento de ancoragem molecular é possível prever a conformação e a direção dos ligantes no sítio ativo da molécula, verificar a energia de ligação entre o complexo (proteína-ligante), e quantificar a energia de interação dos complexos. A partir da energia livre padrão de Gibbs (ΔG_L) é possível estimar o grau de afinidade entre o receptor (molécula-alvo) e o ligante (droga) DURRANT; MCCAMMON, 2011).

No processo de P&D, muitos estudos são realizados a fim de mapear moléculas com determinada ação terapêutica e avaliar a interação entre molécula-alvo/ligante (KITCHEN, 2004). O docking molecular tem ganhado relevância como ferramenta auxiliar no processo de desenvolvimento de novas drogas. Além disso, é uma técnica que está em desenvolvimento contínuo, sempre buscando criar e aprimorar algoritmos para que o ambiente computacional simule fielmente as condições biológicas (OLIVEIRA; ALENCAR-FILHO; VASCONCELLOS, 2014)

Apesar das vantagens das ferramentas computacionais, a técnica de docking molecular apresenta alguns limitantes, sendo a principal, a não utilização de todos os fatores de interação biológica. Essas limitações podem ser atribuídas a falta de flexibilidade da proteína, ou ainda, a determinação simplista das características energéticas da molécula (TERAMOTO & FUKUNISHI, 2007). Para sanar essas limitações tem sido utilizado o melhoramento de algoritmos de docking molecular, bem como abordagens mais refinadas que são computacionalmente custosas como a dinâmica molecular (YURIEVA; AGOSTINO; RAMSLAND, 2001).

O HADDOCK é um software de ancoragem que permite a modelagem e predição da estrutura tridimensional de um complexo biomolecular, a partir de estruturas individuais do receptor e do ligante. A principal interface do Haddock é uma plataforma online de acesso gratuito, que permite a inserção dos dados das coordenadas atômicas individuais, do receptor e ligante, e permite entrada dos dados de resíduos ativos de cada uma das moléculas. O software dispõe ainda de um sistema avançado para usuários que desejam explorar toda gama de dados experimentais e personalizar o processo de ancoragem. O servidor possui acesso de um cluster dedicado e infraestrutura GRID e-RMN, o que possibilita uma corrida de ancoragem relativamente rápida, que pode levar de alguns minutos à algumas horas (DE VRIES; VAN DIJK; BONVIN, 2010).

Os resultados são pelo Haddock disponibilizados para download e dispõe de informações como: dados de entrada, número de clusters, valores das energias individuais (Van der Waals, eletrostáticas, de solvatação e restrições de violação energéticas), área de superfície enterrada (BSA) em angstrom e o Z-score. Além disso, são disponibilizados os arquivos PDB dos complexos (receptor-ligante) das quatro melhores estruturas de cada cluster (VAN ZUNDERT; BONVIN, 2014).

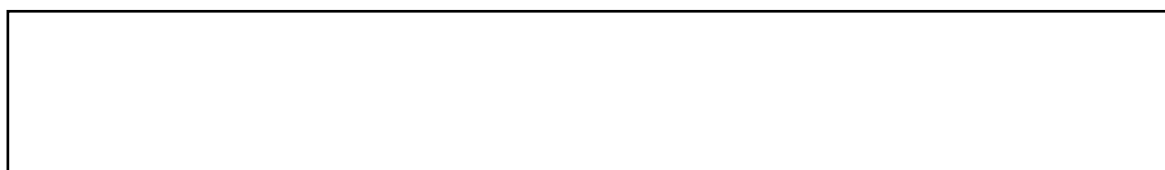
4. MATERIAL E MÉTODOS

No decorrer deste trabalho os resíduos que compõe o peptídeo desenvolvido, sua estrutura ou qualquer informação que possa comprometer o sigilo da molécula serão apresentados com tarjas [] uma vez que outros testes serão realizados para verificar a ação aqui predita, e assim a molécula poderá ser depositada como patente junto ao INPI.

4.1 PLANEJAMENTO DO PEPTÍDEO DE LIGAÇÃO AO VEGFR-2 E A MK

As características estruturais do *methyl N-(6-propylsulfanyl-1H-benzimidazol-2-yl)carbamate* (Albendazol) e *methyl N-(6-benzoyl-1H benzimidazol-2-yl carbamate)* (mebendazol) foram usadas como modelos para a elaboração de um inibidor do VEGFR-2. Para o desenvolvimento do peptídeo, um tripeptídeo foi recortado e desenhado utilizando a estrutura terciária da proteína ativa [] depositada no *Protein data bank* (code: []). Esta estrutura foi escolhida por possuir região com semelhança de sequência com o peptídeo racionalizado, desse modo foi requerida poucas mutações. Utilizou-se a cadeia A da proteína e a região mutada foi a dos resíduos [], [] e [] (Figura 4). Para o desenho e otimização do inibidor foi utilizado o software WinCoot 0.8.4.

Figura 4- Sequência FASTA []
Em vermelho região usada para desenho do peptídeo.



4.2 ESTUDO DAS INTERAÇÕES PEPTÍDEO-VEGFR-2 E PEPTÍDEO-MK

Os testes de ancoragem molecular (*Docking*) realizados utilizando o Haddock Web Server foram peptídeo-VEGFR-2 e peptídeo-MK. Para a interação peptídeo-VEGFR-2 foi utilizado como o receptor 2 do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGFR-2) de PDB 4AGD, estrutura resolvida via difração de raio-X, que possui 353 resíduos de aminoácidos (Figura 5).

Figura 5- Sequência FASTA do Fator de crescimento do endotélio vascular (VEGFR-2), PDB 4AGD

```
>4AGD:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE
MGGHHHHHHGLEVLFQGPRTVVKRANGGELKTGYLSIVMDPDELPLDEHCERLPYDASKWEFPRDRCLKGKPLGRG
AFGQVIEADAFGIDKTATCRTVAVKMLKEGATHSEHRALMSELKILIHIGHHLNVNLLGACTKPGGPLMVIVEF
CKFGNLSYLRSKRNEFVVPYKVPEDLYKDFTLLEHLICYSFQVAKGMEFLASRKC IHRDLAARNILLSEKNVVK
ICDFGLARDIYKDPDYVRKGDARLPLKWMAPETIFDRVYTIQSDVWSFGVLLWEIFSLGASPYPGVKIDEEFCRR
LKEGTRMRAPDYTTPEMYQTMLDCWHGEPQRPTFSELVEHLGNLLQANAQQD
```

Para a interação peptídeo-MK foi utilizado como receptor o domínio C-terminal da MK de PDB 1MKC, estrutura obtida via Ressonância magnética nuclear (RMN), contendo 43 resíduos de aminoácidos (Figura 6).

Figura 6- Sequência FASTA do domínio C-terminal da proteína MK, (PDB: 1MKC)

```
>1MKC:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE
CKYKFENWGACDGGTGTKVRQGTLLKARYNAQCQETIRVTKPC
```

Estes mesmos ensaios foram realizados também utilizando o Software Hex 0.8.0, visando complementar as informações energéticas dos complexos.

4.3 ANÁLISE DAS INTERAÇÕES DE FÁRMACOS COM VEGFR-2 E MK

O Software Hex 0.8.0 foi utilizado para analisar as interações dos complexos receptor VEGFR-2 com peptídeo *versus* com os modelos albendazol, mebendazol, sunitinibe, axitinive, tovozanibe e sorafenibe quanto aos resíduos *hot spots*, posição e energia de ativação. Além dessas, os mesmos critérios foram analisados para os complexos MK com peptídeo *versus* albendazol e mebendazol.

4.4 ANÁLISE DAS INTERAÇÕES INTERMOLECULARES

Uma vez que as proteínas são constituídas de resíduos de aminoácidos ligados de forma covalente e possuem a capacidade de interagir de modo não covalente entre si e formar complexos (ALENCAR, 2010), as interações intermoleculares de todos os complexos citados

no item 4.2 e no subitem 4.2.1 foram identificadas utilizando o WinCoot 0.8.4, quanto o tipo e a distância das ligações.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ARQUITETURA E CONSTRUÇÃO DE UM PEPÍDEO DE LIGAÇÃO AS PROTEÍNAS VEGFR-2 E MK

O tripeptídeo proposto nesse trabalho, denominado de KDRIP (*kinase domain insert receptor inhibitor peptide*), é formado pelos resíduos de aminoácidos [], [] e [] e foi racionalizado com o intuito de se ligar tanto ao receptor 2 do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGFR-2) quanto a midkina (MK), para impedir as atividades destas proteínas em células cancerosas. A estrutura tridimensional do KDRIP pode ser visualizada na Figura 7, a qual apresentou dados energéticos ajustados termodinamicamente estável, de acordo com o software WinCoot.

Figura 7- Estrutura tridimensional do inibidor desenvolvido (KDRIP).



Fonte: Dados da pesquisa. Estrutura visualizada no VMD.

5.2 LIGAÇÃO DE KDRIP COM OS ALVOS MOLECULARES VEGFR-2 E MK

As interações do peptídeo KDRIP com os alvos moleculares VEGFR-2 e MK foram estudadas ao nível de sítios de ligação dos alvos, os quais retêm as atividades biológicas, e dos complexos gerados a partir das interações.

5.2.1 Identificação do sítio de ligação do alvo molecular VEGFR-2

O sítio de ligação do VEGFR-2 foi descrito por Eldehna e colaboradores (2016), que relataram que os resíduos GLU885, CYS 919 E ASP 1046 são essenciais na inibição do VEGFR-2. Para fortalecer os dados de Eldehna et al., a análise dos complexos entre o VEGFR-2 e outros fármacos comerciais de estrutura determinada via difração de raios X e depositados no PDB (MC TIGUE et al., 2012) revelou que os resíduos GLU917, VAL848, VAL899, VAL916, LEU 1035, PHE1047 apresentaram interações importantes para ação de inibição do VEGFR-2. Assim, esses resíduos foram tidos como resíduos ativos no docking KDRIP-VEGFR-2.

O receptor VEGFR-2 tirosina quinase vem sendo muito usado como alvo molecular no desenvolvimento de drogas devido seu importante papel antiangiogênico. A inibição do VEGFR-2 surgiu como uma abordagem para o desenvolvimento de terapias para muitas doenças dependentes de angiogênese (AHMED; THOMAS; STEWARD, 2013). Muitos fármacos comerciais atuam no alvo VEGFR-2 quinase, entre eles o anticorpo monoclonal bevacizumab e os inibidores sorafenibe, regorafenibe, sunitinibe, axitinibe, vendetanibe, prozopanibe e carbonitinibe.

5.2.2 Determinação do sítio de ligação do alvo molecular MK

De acordo com Maramatsu, dois sítios de ligação da proteína MK à heparina foram identificados localizados no domínio C-terminal, são eles: sítio I (K79, K102 e R81) e sítio II (K86, K87 e R89) (MARAMATSU, 2002; KADOMATSU et al., 2004; MURAMATSU, 2010). Esses sítios de ligação a heparina foram usados como resíduos ativos da MK para o docking molecular KDRIP –MK e como alvo do peptídeo desenvolvido.

Estudos publicados mostram uma superexpressão da MK em várias patologias, incluindo isquemia, processos inflamatórios e, notavelmente, em muitos tipos de câncer (JONO; ANDO, 2010; JONES, 2014). Ao se ligar aos receptores de membrana, a MK ativa vias de sinalização PI3 e MAP, induzindo a proliferação e angiogênese em células cancerígenas (HAO, 2013). Desse modo, MK é fator chave no desenvolvimento de neoplasia, é um importante alvo bioquímico no desenvolvimento de novas drogas (MUTSUKO et al., 2009; WECKBACH et al., 2012).

5.2.3 Interação entre o KDRIP e o VEGFR-2

O complexo (VEGFR-2 e KDRIP) apresentou interação no sítio de interesse com energia de ativação mais negativa, equivalente a -312,15 kcal/mol. A energia de ativação do complexo VEGFR-2/ KDRIP é bem mais negativa do que as obtidas nos complexos VEGFR-2/albendazol e VEGFR-2/mebendazol, o que mostra que a ocorrência de ligação entre o VEGFR-2 e o KDRIP mais favorável termodinamicamente. O Haddock, para docking VEGFR-2/ KDRIP agrupou 197 estruturas em 2 *clusters*, o que representa 98,5% dos modelos refinados. Apenas o *cluster* 1 (Tabela 5) possuía Z-score negativo, sendo desse modo o que melhor representava o complexo.

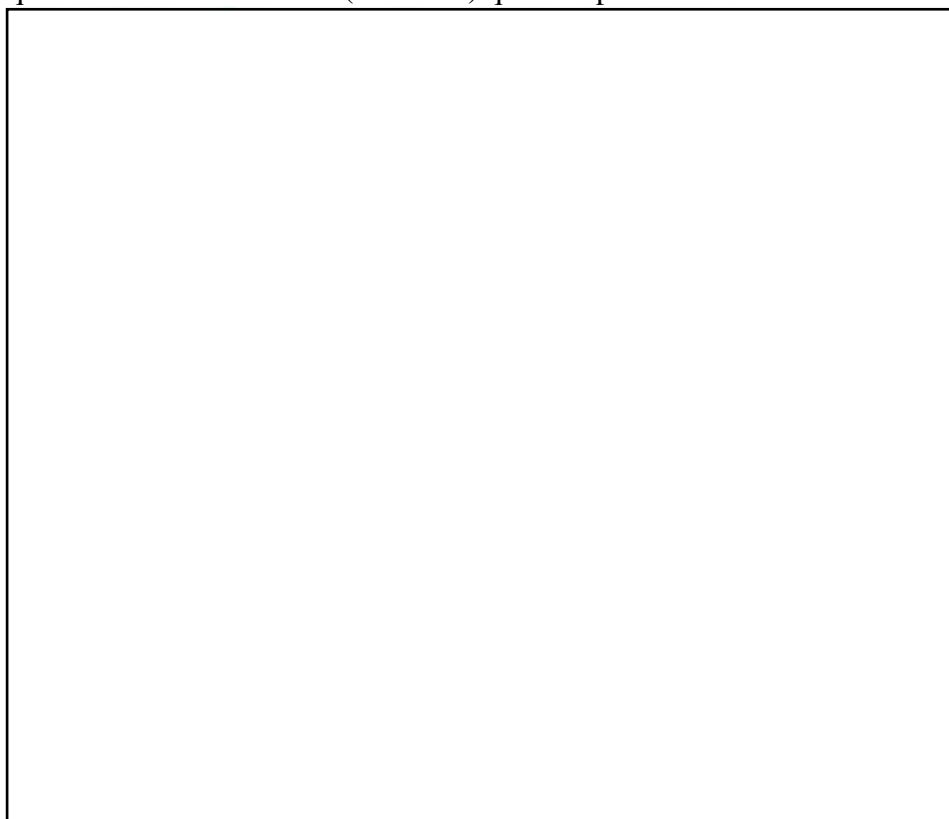
Tabela 5- Dados do Docking VEGFR-2/ KDRIP gerados pelo Haddock.

HADDOCK score	-91.6 +/- 3.9
Tamanho do Cluster	163
Energia mais baixa da estrutura global (RMSD)	0.5 +/- 0.3
Energia de Van der Waals	-40.8 +/- 1.6
Energia eletrostática	-93.0 +/- 17.2
Energia de solvatação	-33.5 +/- 6.0
Energia de restrições de violação	13.0 +/- 11.35
Área da superfície enterrada	917.3 +/- 32.1
Z-Score	-1.0

Fonte: Dados gerados pelo Haddock.

De acordo com as interações intermoleculares identificadas, o tripeptídeo proposto neste trabalho apresentou interações hidrofóbicas com os resíduos VAL 848, VAL 899, VAL 916, CYS 919, LEU 1035 GLU 917 e PHE 1047 e que fazem parte do sítio ativo do VEGFR-2 (Figura 8). Todas as interações estão identificadas na Tabela 6 (interações de hidrogênio) e Tabela 7 (interação hidrofóbica). Os resíduos GLU 885 e ASP 1046 que compõem o sítio ativo de interesse da proteína em questão, não apresentaram interações com o ligante.

Figura 8- Visualização do docking molecular realizado pelo programa VMD 1.9.2 entre o inibidor desenvolvido (em azul) e o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGFR-2). Em destaque estão os seis resíduos (em cinza) que compõem os dois sítios de interesse.



Fonte: Dados da pesquisa. Estrutura visualizada no VMD.

MC TIGUE e colaboradores (2012) afirma que tanto a cadeia lateral GLU 885 como a cadeia ASP 1046 NH apresentam polaridade que reveste o canal de quinase, proporcionando oportunidades significativas de interações direta com TKI para conferir vantagens de seletividade distintas. Apesar disso, ao analisarmos o PDB do sunitinibe, fármaco com ação antitumoral aprovado pela FDA, observa-se que ele também não interage com esses resíduos, sendo assim possível inibir o VEGFR-2 mesmo sem a ocorrência dessa interação.

Tabela 6- Interações de hidrogênio identificadas no complexo molecular formado entre o KDRIP e o receptor do fator de Crescimento do endotélio vascular (VEGFR-2).

Resíduos do tripeptídeo	Resíduos do VEGFR-2	Distância (Å)
	Phe921	2.91
	Arg 1051	3.09
	Asp1052	3.07
	Asp1056	2.61
	Asn 923	2.48

Fonte: Interações verificadas no WinCoot.

Tabela 7- Interações hidrofóbicas identificadas no complexo molecular formado entre o KDRIP e o Receptor do fator de Crescimento do endotélio vascular (VEGFR-2).

Resíduos do tripeptídeo	Resíduos do VEGFR-2	Interação Intermolecular
	Leu 1035*	Interação hidrofóbica
	Phe 1047*	Interação hidrofóbica
	Leu 840	Interação hidrofóbica
	Val 848*	Interação hidrofóbica
	Ala 866	Interação hidrofóbica
	Phe 918	Interação hidrofóbica
	Val 916*	Interação hidrofóbica
	Cys 919*	Interação hidrofóbica
	Glu 917*	Interação hidrofóbica
	Asn 923	Interação hidrofóbica
	Leu 840	Interação hidrofóbica
	Arg 842	Interação hidrofóbica
	Asn 923	Interação hidrofóbica
	Phe 1047*	Interação hidrofóbica
	Asp 1052	Interação hidrofóbica
	Asp 1056	Interação hidrofóbica
	Val 899*	Interação hidrofóbica
	Leu 840	Interação hidrofóbica
	Leu 890	Interação hidrofóbica
	Cys 919*	Interação hidrofóbica
	Phe 921	Interação hidrofóbica

Fonte: Interações verificadas no WinCoot. * **Resíduo que compõe o sítio ativo**

As interações não covalentes são extremamente importantes, sendo responsáveis pela conformação e estabilidade das estruturas proteicas. Existem diversos tipos de forças intermoleculares não-covalentes, sendo as mais comuns em estruturas de proteínas as interações de Van der Waals (interação de hidrogênio, dipolo-dipolo, dipolo-dipolo induzido e forças de dispersão) e interações hidrofóbicas (VERLI; BARREIRO, 2005).

5.2.4 Interação entre o KDRIP e a MK

O complexo midkina/KDRIP apresentou encaixe nos locais de interesse com energia de ativação equivalente a -295,55 kcal/mol. Se comparada com os dockings entre a MK/albendazol e MK/mebendazol, estruturas usadas como base, o KDRIP apresenta-se mais negativo. Quanto

maior a negatividade para a energia de ativação mais favorável é a ocorrência da ligação, assim, esta molécula pode vir a ser uma importante estratégia para a inibição das atividades relacionadas com a midkina no desenvolvimento do câncer.

Para o docking MK/KDRIP o HADDOCK agrupou 196 estruturas em 7 clusters, o que representa 98,0% dos modelos refinados em água, uma vez que esse software considera um número máximo para agrupamento de 200. O primeiro *cluster* é o mais confiável, uma vez que apresenta o Z-score mais negativo (VAN ZUNDERT; BONVIN, 2014), como pode-se observar na Tabela 8, juntamente com os valores individuais de energias, tais como interações de Van der Waals, energia de solvatação e restrições de violação. O haddock gerou um arquivo com as coordenadas atômicas do complexo que possibilitou a análise das interações receptor-ligante.

Tabela 8- Dados do Docking Midkina-KDRIP gerados pelo Haddock.

HADDOCK score	-59.9 +/- 2.2
Tamanho do Cluster	149
Energia mais baixa da estrutura global (RMSD)	3.9 +/- 0.1
Energia de Van der Waals	-19.2 +/- 2.2
Energia eletrostática	-165.8 +/- 19.5
Energia de solvatação	-7.6 +/- 1.9
Energia de restrições de violação	0.3 +/- 0.20
Área da superfície enterrada	668.3 +/- 5.7
Z-Score	-1.4

Fonte: Dados obtidos no Haddock.

De acordo com as interações intermoleculares identificadas, o KDRIP apresentou ligação de hidrogênio com o resíduo Lys 79, Arg 81 e Lys 102 que compõe o sítio I, interação de hidrogênio com Arg 89 e hidrofóbica com a Lys 86, que compõe o sítio II (Figura 9). Apenas o resíduo Lys 87, que compõem o sítio ativo de interesse da proteína em questão, não apresentou interações com o ligante. Todas as interações MK-KDRIP podem ser verificadas na Tabela 9 e 10.

Tabela 9- Interações de hidrogênio identificadas no complexo molecular formado entre o inibidor (KDRIP) e a midkina (MK).

Resíduos do (KDRIP)	Resíduos da MK	Distância (Å)
<input type="text"/>	Asp68	3.25
<input type="text"/>	Arg 81*	2.51
<input type="text"/>	Lys 86*	3.41
<input type="text"/>	Ala 88	3.46
<input type="text"/>	Arg 89*	2.86
<input type="text"/>	Lys102*	2.78
<input type="text"/>	Lys79*	2.79
<input type="text"/>	Lys 79*	3.17
<input type="text"/>	Lys 102*	2.62

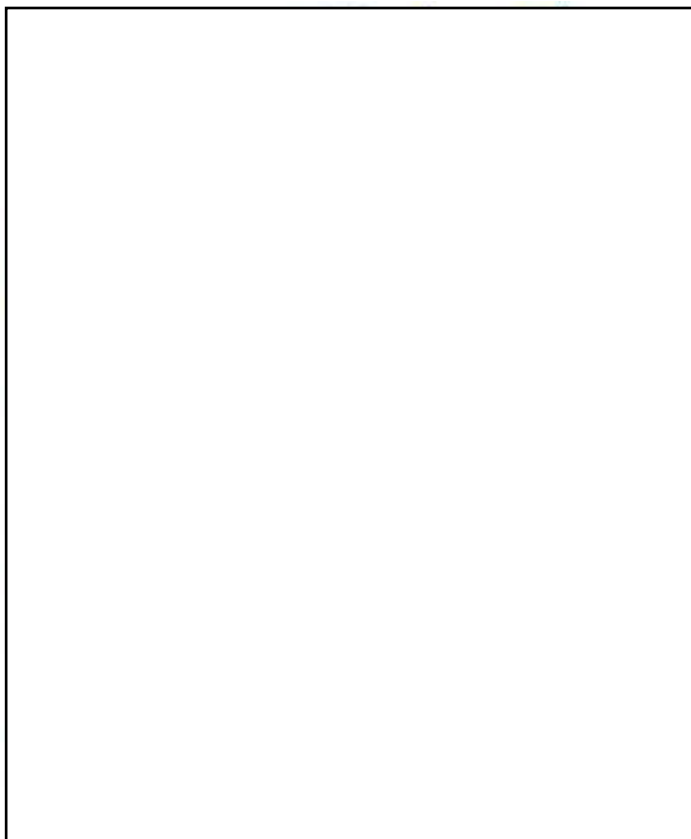
Fonte: Interações e distâncias verificadas no WinCoot. * **Resíduo do sítio ativo.**

Tabela 10- Interações hidrofóbicas identificadas no complexo molecular formado entre o inibidor e a midkina (MK)

Resíduos do tripeptídeo	Resíduos da MK	Interação Intermolecular
<input type="text"/>	Tyr 64	Interação hidrofóbica
<input type="text"/>	Lys 86*	Interação hidrofóbica
<input type="text"/>	Ala 88	Interação hidrofóbica
<input type="text"/>	Trp 69	Interação hidrofóbica
<input type="text"/>	Arg 81*	Interação hidrofóbica
<input type="text"/>	Tyr64	Interação hidrofóbica
<input type="text"/>	Lys86	Interação hidrofóbica
<input type="text"/>	Leu85	Interação hidrofóbica
<input type="text"/>	Arg 89*	Interação hidrofóbica
<input type="text"/>	Tyr 90	Interação hidrofóbica
<input type="text"/>	Trp 69	Interação hidrofóbica
<input type="text"/>	Gly 70	Interação hidrofóbica

Fonte: Interações verificadas no WinCoot. * **Resíduo do sítio ativo.**

Figura 9- Visualização do docking molecular realizado pelo programa VMD 1.9.2 entre o KDRIP (em azul) e a midkina. Em destaque estão os seis resíduos (em cinza) que compõem os dois sítios de interesse.



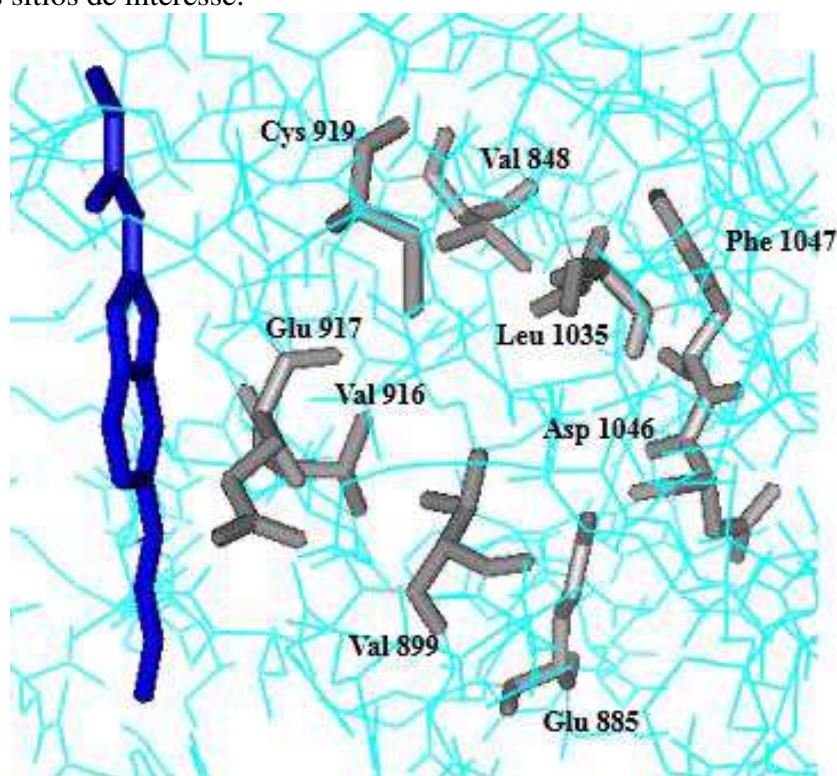
Fonte: Dados da pesquisa. Estrutura visualizada no VMD.

5.3 INTERAÇÕES DE OUTROS FÁRMACOS COM VEGFR-2

5.3.1 Interação entre o albendazol e o VEGFR-2

O docking molecular VEGFR-2- albendazol demonstrou que a solução com energia de ativação de -171,81 (kcal/mol) apresentou melhor encaixe nos sítios ativos do VEGFR-2. Como pode ser observado (Figura 10) o albendazol não encaixa no bolsão ativo, entretanto, interage lateralmente no sítio.

Figura 10- Visualização do docking molecular realizado pelo programa Hex 8.0 entre o albendazol (em azul) e o VEGFR-2. Em destaque estão os seis resíduos (em cinza) que compõem os dois sítios de interesse.



Fonte: Dados da pesquisa. Estrutura visualizada no Pymol.

O albendazol apresentou interação hidrofóbica e ligação de hidrogênio com o resíduo GLU 917, que compõe o sítio do VEGFR-2. Os demais resíduos que compõem o sítio ativo da proteína em questão não apresentaram interações com o ligante. Todas as interações são apresentadas nas Tabela 11 e 12. Assim, o albendazol, apesar de possuir atividade antitumoral comprovada, possui um número reduzido de interações com resíduos considerados importantes para a inibição do VEGFR-2. Entretanto, características de interação do albendazol com o VEGFR-2 são importantes para o desenvolvimento de um inibidor do VEGFR-2, visto que, esse fármaco possui ação antitumoral comprovada em testes *in vitro* e *in vivo* frente a várias linhagens como câncer de ovário (POURGHOLAMI, 2005; POURGHOLAMI, WANGOO, MORRIS, 2008; NOORANI et al., 2015; HANUSOVA et al., 2015), câncer corretal e carcinoma hepatocelular (MORRIS; JOURDAN; KRÁLOVÁ et al, 2013) e carcinoma de Erhlich (CASTRO et al., 2016).

Tabela 11- Interações de hidrogênio identificadas no complexo molecular formado entre o VEGFR-2 e o Albendazol

Resíduos do VEGFR-2	Distância (Å)
Glu 917*	3.43
Phe 918	3.28
Thr 864	2.91

Fonte: Interações verificadas no WinCoot. * **Resíduo do sítio ativo.**

Tabela 12- Interações hidrofóbicas identificadas no complexo molecular formado entre o VEGFR-2 e o albendazol.

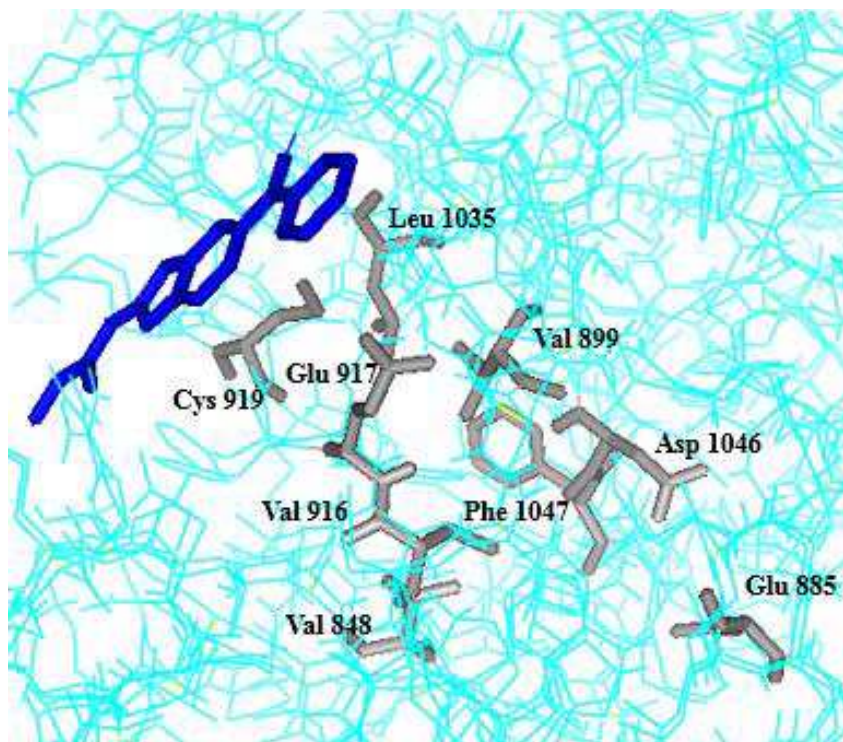
Resíduos da VEGFR-2	Interação Intermolecular
Val 865	Interação hidrofóbica
Thr 864	Interação hidrofóbica
Glu 917*	Interação hidrofóbica
Asn 900	Interação hidrofóbica
Glu 1038	Interação hidrofóbica
Phe 918	Interação hidrofóbica

Fonte: Interações verificadas no WinCoot. * **Resíduo que compõe o sítio ativo.**

5.3.2 Interação entre o mebendazol e o VEGFR-2

O melhor encaixe do mebendazol nos sítios ativos do VEGFR-2 foi o cluster cuja energia de ativação foi de -221,94 (kcal/mol). O mebendazol ligou-se lateralmente não adentrando no bolsão ativo, entretanto, interagiu com um dos resíduos ativos do VEGFR-2 (Figura 11). O mebendazol apresentou interação hidrofóbica e ligação de hidrogênio com o resíduo GLU 917, que compõe o sítio do VEGFR-2. Os demais resíduos que compõem o sítio ativo da proteína não apresentaram interações com o ligante. Todas as interações de hidrogênio são apresentadas na Tabela 13 e as interações hidrofóbicas são apresentadas na Tabela 14.

Figura 11- Visualização do docking molecular realizado pelo programa Hex 8.0 entre o mebendazol (em azul) e o VEGFR-2. Em destaque estão os seis resíduos (em cinza) que compõem os dois sítios de interesse.



Fonte: Dados da pesquisa. Estrutura visualizada no Pymol.

Apesar de possuir atividade antitumoral comprovada, o mebendazol, possui um número reduzido de interações com resíduos considerados importantes para a inibição do VEGFR-2. Entretanto, as características estruturais e de ligação do mebendazol com o VEGFR-2 são importantes para o desenvolvimento de um inibidor do VEGFR-2, com ação antiangiogênica, tendo em vista que o mebendazol possui ação antitumoral descrito para tipos celulares distintos como câncer de pulmão (MUKHOPADHYAY et al., 2001), melanoma metastático (DOUDICAN et al., 2008); câncer do colorretal NYGREN et al., 2013), meduloblastoma (BAI et al., 2014), câncer de cólon metastático (NYGREN; LARISSON, 2014; HANUSOVA et al., 2015), e câncer gástrico primário (PINTO et al., 2015).

Tabela 13- Interações de hidrogênio identificadas no complexo molecular formado entre o VEGFR-2 e o mebendazol.

Resíduos do VEGFR-2	Distância (Å)
Glu 917*	3.19
Leu 896	2.80
Glu 1038	2.84
Lys 920	2.63
Val 1041	2.44

Fonte: Interações verificadas no WinCoot. * **Resíduo que compõe o sítio ativo.**

Tabela 14- Interações de hidrogênio identificadas no complexo molecular formado entre o VEGFR-2 e o mebendazol

Resíduos da VEGFR-2	Interação Intermolecular
Lys 920	Interação hidrofóbica
Glu 917*	Interação hidrofóbica
Thr 864	Interação hidrofóbica
Phe 918	Interação hidrofóbica
Val 1041	Interação hidrofóbica

Fonte: Interações verificadas no WinCoot. * **Resíduo que compõe o sítio ativo.**

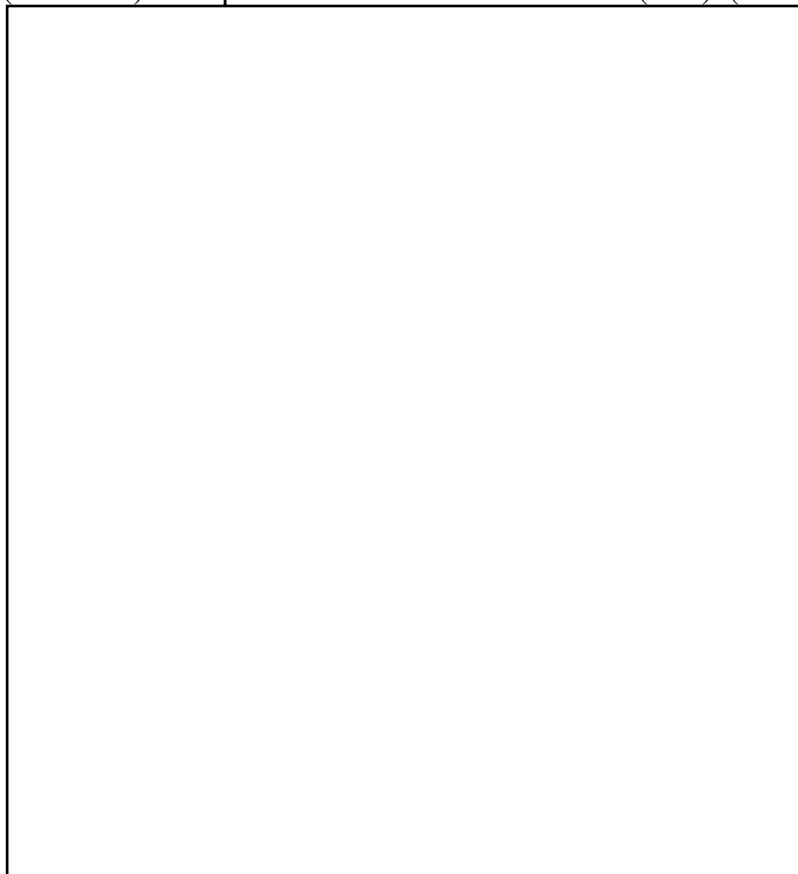
5.3.3 Interação entre o Fármacos TKIs e o VEGFR-2

Para análise do modelo desenvolvido foi realizada a sobreposição do complexo, VEGFR-2 com peptídeo desenvolvido, com complexos VEGFR-2/ inibidores comerciais com estrutura depositada no PDB. Verificou-se a similaridade nos locais de encaixe do tripeptídeo com os fármacos SUNITINIBE (PDB: 4AGD), AXITINIBE (PDB: 4AG8), SORAFENIBE (PDB: 4ASD) e TIVOZANIBE (PDB: 4ASE), todos desenvolvidos para tratamento de câncer e atuam no VEGFR-2, de forma específica ou não.

Se compararmos a sobreposição do KDRIP desenvolvido com o Sunitinibe (Figura 12) podemos observar uma similaridade estrutural entre as duas moléculas e verificar que o peptídeo ligou-se no mesmo local que o fármaco comercial. Mc tigue e colaboradores (2012), descreve que o sunitinibe realiza uma ligação de hidrogênio com os resíduos CYS 919 e GLU 917 e interação hidrofóbica com Leu 1035. Ao analisarmos o PDB (4AGD) podemos afirmar que além dessas interações hidrofóbicas descritas, a interação hidrofóbica com a VAL 848, VAL 916, VAL899 e PHE 1047 são de importância inquestionável para ligação do fármaco. O

docking mostrou que o complexo VEGFR-2 com o fármaco sunitinibe apresentou encaixe nos locais de interesse com energia de ativação mais negativa de -269.07 kcal/mol.

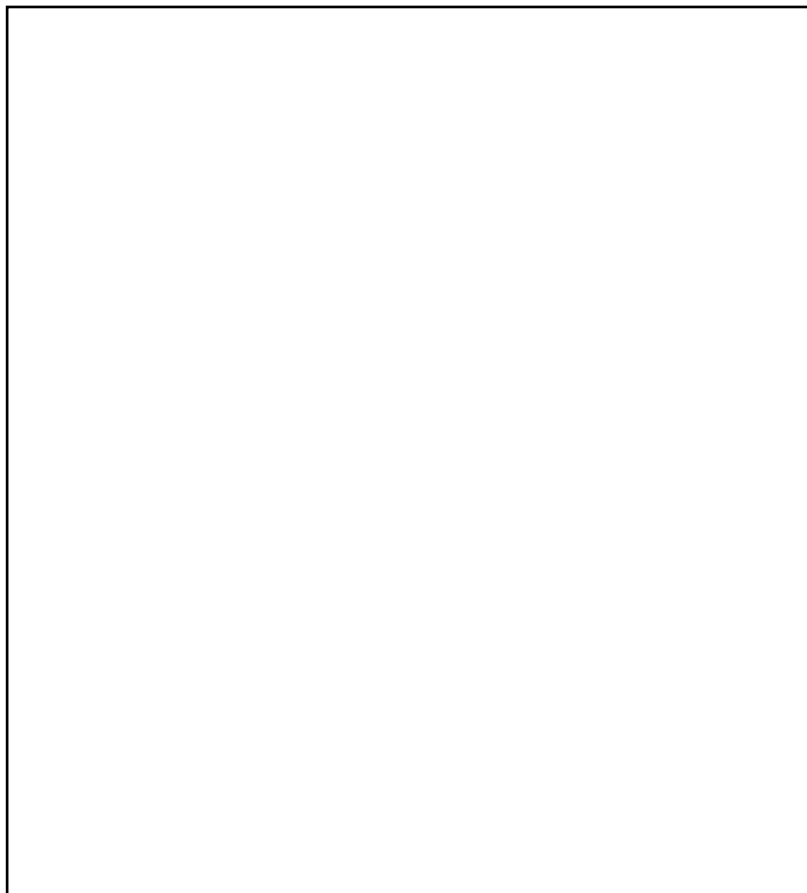
Figura 12- KDRIP (vermelho) sobreposto ao fármaco SUNITINIBE (azul). (PDB: 4AGD).



Fonte: Dados da pesquisa. Estrutura visualizada no Pymol

A sobreposição do peptídeo desenvolvido com o Axitinibe (Figura 13) mostra uma similaridade estrutural entre as duas moléculas. Além disso, o peptídeo liga-se mesmo local que o fármaco comercial. Na estrutura depositada no PDB (4AG8) os autores descrevem que o fármaco interage por meio de interações de hidrogênio com a LYS 868, GLU 885 e ASP 1046 e interage de forma hidrofóbica com VAL848, VAL 916, LYS 868, LEU 1035, ALA 866, GLY 922 e LEU 820 (MICTIGUE et al., 2012). O complexo VEGFR-2 com o fármaco axinibe apresentou encaixe nos locais de interesse com energia de ativação mais negativa de -248,95 kcal/mol.

Figura 13- KDRIP (vermelho) sobreposto ao fármaco AXITINIBE (azul) (4AG8)



Fonte: Dados da pesquisa. Estrutura visualizada no Pymol

A sobreposição do KDRIP com o SORAFENIBE (PDB: 4ASD) (Figura 14) mostra que o peptídeo se liga na mesma região que o fármaco comercial, entretanto, o fármaco consegue adentrar de forma mais intensa na fenda ativa do receptor se comparado com o tripeptídeo. Os resíduos do fármaco que interage com o VEGFR-2 por meio de interação de hidrogênio são PHE 1047, GLU885 e CYS 919. Já as interações hidrofóbicas são entre os resíduos CYS 1045, PHE 1047, LEU 1035, ALA866, VAL 916, VAL 848, ASP 1046 E LEU 889 (MICTIGUE et al., 2012). O sorafenibe não possui na sua estrutura o anel benzimidazol, mais liga-se no local do bolsão ativo do VEGFR-2. Se analisarmos o complexo VEGFR-2 com o fármaco sorafenibe podemos observar que o encaixe nos locais de interesse ocorreu com energia de ativação mais negativa de -241,56 kcal/mol.

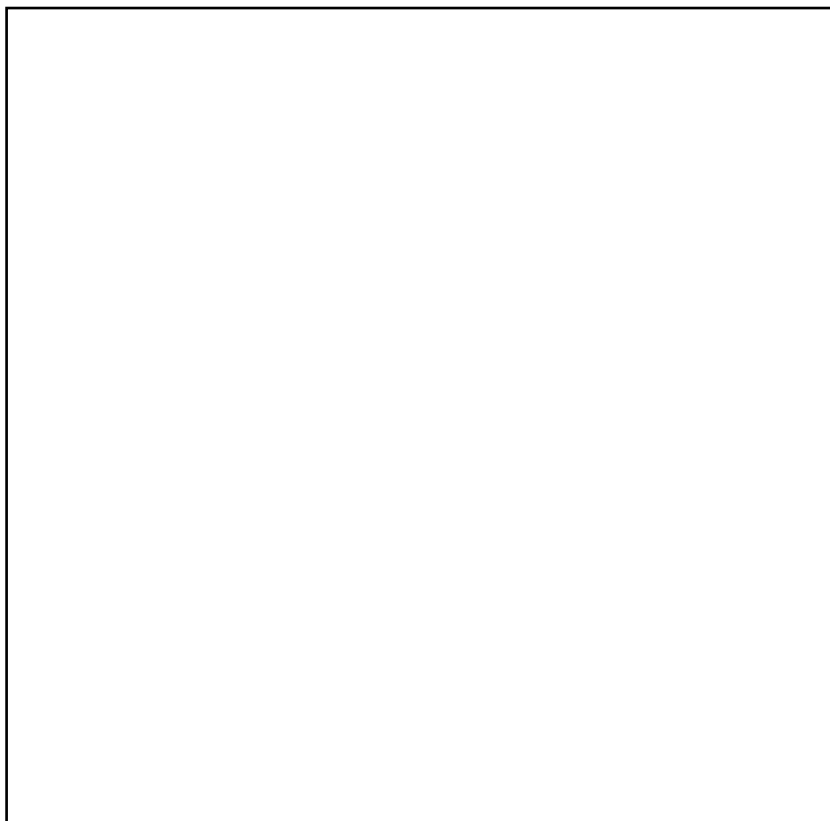
Figura 14- KDRIP (vermelho) sobreposto ao fármaco SORAFENIBE (4ASD)



Fonte: Dados da pesquisa. Estrutura visualizada no Pymol

A Figura 15 mostra a sobreposição do peptídeo desenvolvido com o TIVOZANIBE. Apesar de não possuir em sua estrutura o anel benzimidazol, o Tivozanibe liga-se no bolsão ativo do VEGFR-2. A análise do PDB 4ASD mostra a interação de hidrogênio do fármaco com o VEGFR-2 nos resíduos CYS 919, ASP 1046 e GLU 885, e interações hidrofóbicas com os resíduos LEU 1035, ALA 866, VAL916, PHE 1047, CYS 1045, PHE 918, LEU 840 e VAL 848. O docking entre o VEGFR-2 com o fármaco tivozanibe demonstrou que o encaixe nos locais de interesse ocorreu com energia de ativação mais negativa de -264,78 kcal/mol.

Figura 15- KDRIP (vermelho) sobreposto ao fármaco TIVOZANIB (azul) (4ASE)



Fonte: Dados da pesquisa. Estrutura visualizada no Pymol

A Tabela 15 destaca os resíduos que compõe o sítio ativo do VEGFR-2 e interagem com os inibidores KDRIP, Sunitinibe, Axinibe, Sorafenibe e Tivozonibe. O KDRIP e o Sunitinibe interagem com todos os resíduos ativos do receptor, exceto, com GLU 885 e ASP 1046. O Axinibe não interage com resíduos do sítio ativo do VEGFR-2 CYS 919, GLU 917, VAL 889 e PHE 1047. O Sunitinibe e Axinibe possuem anel benzimidazol, assim como o albendazol e mebendazol, usados para desenvolver o KDRIP. Os fármacos Sorafenibe e Tivozanibe não interage com resíduos ativos GLU 917 e VAL 899 e apesar que não possuem o anel benzimidazol, ligam-se no bolsão ativo e interagem com resíduos importantes na inibição do VEGFR-2.

Tabela 15- Interações de hidrogênio e hidrofóbicas identificadas nos complexos formados entre os inibidores e o receptor do fator de Crescimento do endotélio vascular (VEGFR-2).

Molécula	Resíduos VEGFR-2 (Interação de Hidrogênio)	Resíduos VEGFR-2 (Interação de hidrofóbica)
KDRIP	(-)	Val 848*
		Val 899*
		Val 916*
		Cys 919*
		Leu 1035*
		Glu 917*
		Phe 1047*
SUNITINIBE	Cys 919* Glu 917*	Leu 1035*
		Val 848*
		Val 916*
		Val899*
		Phe 1047*
AXITINIBE	Glu 885* Asp 1046*	Val848*
		Val 916*
		Leu 1035*
SORAFENIBE	Phe 1047* Glu 885* Cys 919*	Phe 1047*
		Leu 1035*
		Val 916*
		Val 848*
		Asp 1046*
TIVOZANIBE	Cys 919* Asp 1046* Glu 885*	Leu 1035*
		Val 916*
		Phe 1047*

Continua

Val 848*

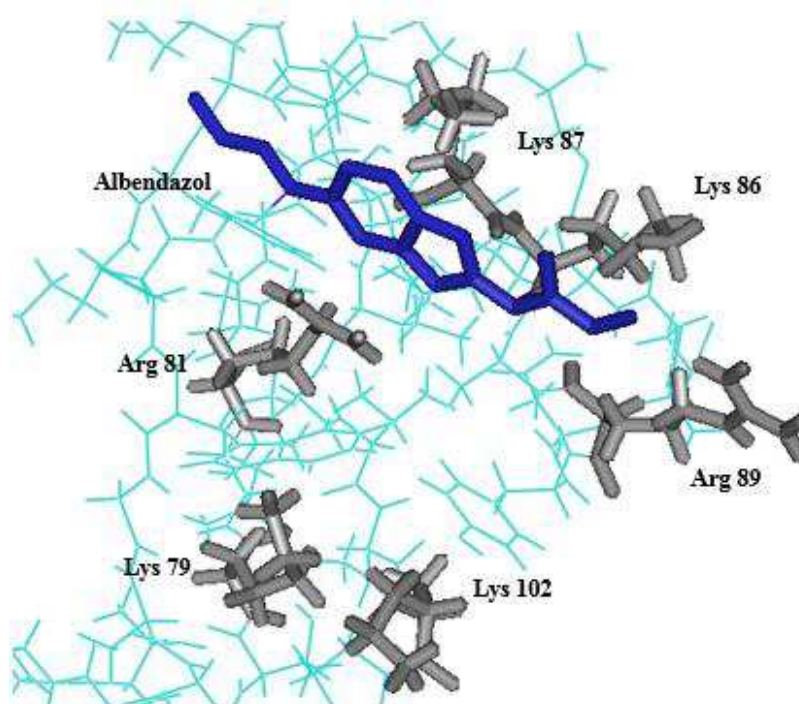
Fonte: Interações verificadas no WinCoot e Ligand explorer com base nos PDBs. * **Resíduo que compõe o sítio ativo.** (-): Não interagiu com nenhum dos resíduos ativos por meio de interação de hidrogênio.

5.4 INTERAÇÕES DE OUTROS FÁRMACOS COM MK

5.4.1 Docking molecular entre albendazol e MK

Para análise da interação MK-albendazol, o docking foi realizado buscando melhor energia de interação com os resíduos, sítio I (K79, K102 e R81) e sítio II (K86, K87 e R89), bem como a energia de ativação necessária para a sua ocorrência. O docking molecular MK-albendazol demonstrou que a solução com energia de ativação de -208,96 kcal/mol apresentou melhor encaixe nos sítios ativos da MK. O albendazol interagiu lateralmente nos sítios de interesse como pode ser observado na figura 16.

Figura 16- Visualização do docking molecular realizado pelo programa Hex 8.0 entre o albendazol (em azul) e a midkina. Em destaque estão os seis resíduos (em cinza) que compõem os dois sítios de interesse.



Fonte: Dados da pesquisa. Estrutura visualizada no Pymol.

O albendazol apresentou interação hidrofóbica e ligação de hidrogênio com o resíduo Arg 81, que compõe o sítio I, e hidrofóbica com a Lys 86, que compõe o sítio II. Os demais resíduos que compõem o sítio ativo de interesse da proteína em questão não apresentaram interações com o ligante. Todas as interações são apresentadas nas tabelas 13 e 14.

Tabela 13- Interações de hidrogênio identificadas no complexo molecular formado entre a midkina (MK) e o Albendazol

Resíduos da MK	Distância (Å)
Tyr 64	3.39
Arg 81*	2.44
Ala 88	3.21

Fonte: Interações verificadas no WinCoot. * **Resíduo do sítio ativo.**

Tabela 14- Interações hidrofóbicas identificadas no complexo molecular formado entre o albendazol e a midkina (MK)

Resíduos da MK	Interação Intermolecular
Lys 63	Interação hidrofóbica
Lys 65	Interação hidrofóbica
Phe 66	Interação hidrofóbica
Asn 68	Interação hidrofóbica
Arg 81*	Interação hidrofóbica
Lys 86*	Interação hidrofóbica
Ala 88	Interação hidrofóbica
Tyr 90	Interação hidrofóbica

Fonte: Interações verificadas no WinCoot. * **Resíduo do sítio ativo.**

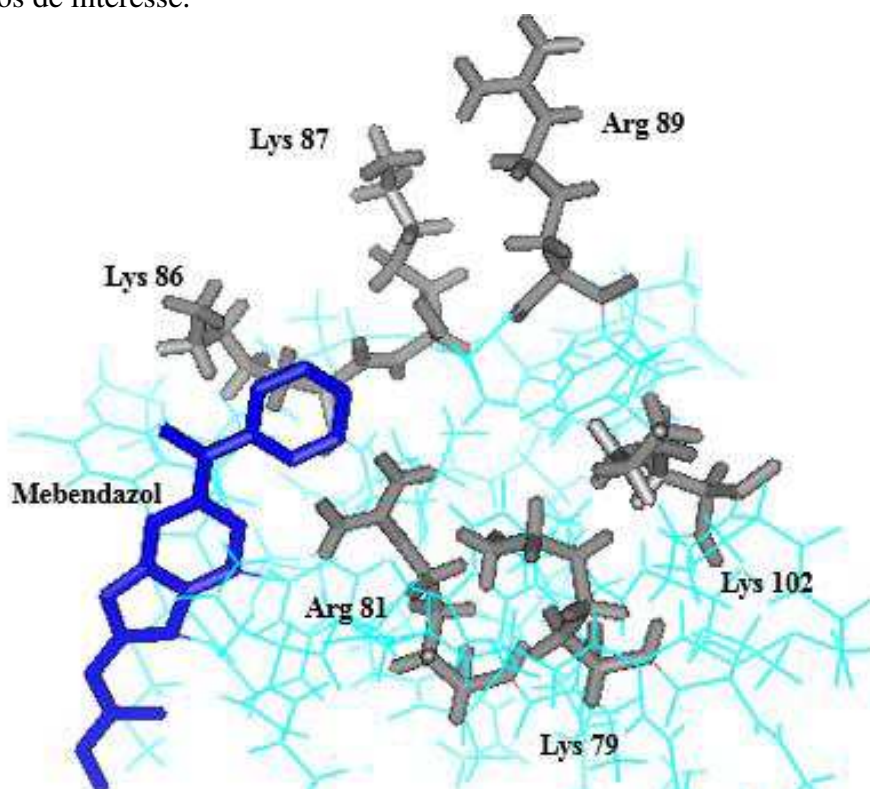
Os resultados obtidos mostram que, apesar do albendazol possuir ação antitumoral, possui interação fraca com a MK, uma vez que, possui um número reduzido de interações com resíduos importantes para a inibição da MK. As características de interação do albendazol com a MK são dados importantes para o desenvolvimento de um inibidor potencial da midkina.

5.4.2 Docking molecular entre o mebendazol e a MK

Inúmeros autores demonstram que o mebendazol possui atividade antitumoral *in vivo* e *in vitro* (SASAKI et al., 2002) e possui atividade frente a diversos tipos de câncer

MUKHOPADHYAY et al., 2001; DOUDICAN et al., 2008; NYGREN et al., 2013; BAI et al., 2014; NYGREN; LARISSON, 2014; HANUSOVA et al., 2015; PINTO et al., 2015). Entretanto, o docking molecular entre o fármaco e a MK mostra apenas uma interação hidrofóbica (Lys 86) com resíduos do sítio ativo (Figura 17). O docking molecular MK-mebendazol apresentou energia de ativação de -215,86 kcal/mol. Todas as interações intermoleculares podem ser observadas nas tabelas 16 e 17.

Figura 17- Visualização do docking molecular realizado pelo programa Hex 8.0 entre o mebendazol (em azul) e a midkina. Em destaque estão os seis resíduos (em cinza) que compõem os dois sítios de interesse.



Fonte: Dados da pesquisa. Estrutura visualizada no Pymol.

Tabela 16- Interações de hidrogênio identificadas no complexo molecular formado entre a midkina (MK) e o Mebendazol.

Resíduos da MK	Distância (Å)
Phe 66	2.60
Lys 65	2.65
Tyr 64	3.35

Fonte: Interações verificadas no WinCoot.

Tabela 17- Interações hidrofóbicas identificadas no complexo molecular formado entre o mebendazol e a midkina (MK)

Resíduos da MK	Interação Intermolecular
Tyr 64	Interação hidrofóbica
Lys 65	Interação hidrofóbica
Phe 66	Interação hidrofóbica
Glu 67	Interação hidrofóbica
Asn 68	Interação hidrofóbica
Lys 86*	Interação hidrofóbica

Fonte: Interações verificadas no WinCoot. * **Resíduo do sítio ativo.**

5.5 COMPARAÇÃO DA INTERAÇÃO DO KDRIP COM VEGFR-2/ MK *VERSUS* OUTROS FÁRMACOS

A energia de ativação do complexo entre o KDRIP com o VEGFR-2 foi mais negativa, equivalente a -312,15 kcal/mol, do que aquelas observadas para todos os fármacos comerciais analisados nesse trabalho (albendazol, mebendazol, sunitinibe, axinibe, sorafenibe e tovozonibe), o que mostra que a ligação entre o peptídeo desenvolvido com o VEGFR-2 é mais provável de ocorrer. Além disso, o KDRIP interage com maior número de resíduos ativos do VEGFR-2 se comparados com todos os fármacos comerciais analisados.

Outro fator relevante, superior e inovador do peptídeo construído neste trabalho é a ligação específica com a proteína MK, que apresentou energia de ativação menor (-295,55) do que aquelas dos modelos albendazol e mebendazol (-208,96 e -215,86) e ainda interagiu com maior número de resíduos do sítio ativo da MK se comparados com os modelos usados neste trabalho, o que sugere uma dupla função dessa molécula potencialmente inibitória, que supera a limitação encontrada em outros fármacos que se ligam a VEGFR-2, os quais atuam em alguns pacientes e outros não. Esta limitação está embasada no polimorfismo dos genótipos humanos, que quando a proteína RAS está mutada, não inibe a cascata para a angiogênese, diminuindo a eficiência desses fármacos. Uma vez que a MK entra na célula via VEGFR-2 e sinaliza da mesma forma que a RAS para angiogênese, um peptídeo que possa inibir ambas as proteínas, VEGFR-2 e MK, tem grande importância para o controle do câncer de mama, onde se observa a elevada expressão das referidas proteínas alvo do KDRIP.

Entre todos os fármacos e sobrepostos a complexo VEGFR-2/KDRIP, apresentados neste trabalho o que mais se assemelha com peptídeo desenvolvido (KDRIP) é o sunitinibe,

uma vez que os locais de ligação e as interações com os resíduos do VEGFR-2 são muito próximos. O sunitinibe atua no tratamento de carcinoma de células renais avançado, no tratamento de tumores estromais gastrointestinais avançado e tumor neuroendócrino pancreático avançado, não passível de tratamento cirúrgico. Além disso, mostra atividade promissora em outros tumores tais como o câncer de mama (MILLER; BURSTEIN; ELIAS, 2005), o câncer colorretal (LENZ; ROSEN, 2006) e cancro do pulmão avançado de células não pequenas (SOCINSKI; NOVELLO; SANCHEZ, 2006). Essas informações são cruciais para determinação e escolha das linhagens a ser tratadas, *in vivo* e *in vitro*, com inibidor desenvolvido, e assim certificar a atuação do KDRIP como agente antitumoral antiangiogênico. Entretanto, nenhuma correlação da ação do sunitinibe com a proteína MK foi descrita até o momento.

Outros receptores como fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGFR α e PDGFR β), receptores do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR-1 e VEGFR-3), receptor do fator das células estaminais (KIT), receptor Fms-like da tirosina-quinase 3 (FLT3), receptor do fator estimulador de colônias (CSF-1R) e o receptor do fator neurotrófico derivado de células gliais (RET), nos quais o Sunitinibe inibe (LE TOURNEAU; RAYMOND; FAIVRE, 2007), poderão ser testados *in silico* com o ligante KDRIP, a fim de verificar se o mesmo além de inibir o VEGFR-2 e MK como mostra esse trabalho, atua inibindo outros alvos importantes para que a angiogênese tumoral ocorra.

O sunitinibe é um medicamento que ainda não está disponível na lista de medicamentos do SUS. Apesar das mais de 400 patentes depositadas no mundo relativas ao sunitinibe, a sua produção em larga escala ainda é extremamente onerosa, chegando a aproximadamente 18 mil reais a caixa para tratamento de um único paciente por 4 semanas (NATS, 2012). O KDRIP mostrou-se promissor nesse aspecto. Por se tratar de um peptídeo, a produção em larga será relativamente simples, se comparada a síntese clássica do sunitinibe, podendo ser obtida via expressão heteróloga por exemplo. Uma vez realizado os testes *in vitro* e *in vivo* e sua atividade angiogênica certificada, o KDRIP poderá ser produzido em sistemas de expressão heterólogos que oferecem uma produção com alto grau de controle dos processos finais (*Downstream*), alto rendimento e alto grau de pureza (DINIZ, FERREIRA, 2010).

Uma terceira vantagem da molécula construída neste trabalho sobre as demais comerciais comparadas é se tratar de um peptídeo. A aplicação de proteínas e peptídeos como moléculas terapêuticas é muito importante para o tratamento de várias doenças, uma vez que, estes reconhecem de forma específica o alvo molecular, como os receptores, e desse modo tem a capacidade de ativar uma via bioquímica que culmina para efeitos biológicos específicos

devido a fatores como a alta especificidade. Além disso, apresenta atividade em pequenas concentrações, quando comparadas com os medicamentos convencionais. A utilização desses tipos de moléculas para uso nos pacientes com câncer pode possibilitar um tratamento com menos efeitos colaterais, melhorando a qualidade de vida dessas pessoas (MELO; SILVA-CUNHA; FIALHO, 2012).

Os peptídeos podem ser quimicamente sintetizados e modificados de modo a melhorar a estabilidade *in vivo*. A síntese de peptídeos em larga escala e em grau clínico de qualidade é economicamente viável, o que favorece uma aplicação terapêutica. Existe ainda a possibilidade de expressão usando sistemas heterólogos, que atualmente são desenvolvidos de forma relativamente simples e em um rendimento relativamente alto, o que pode reduzir os custos de produção (ROSANO; CECCARELLI, 2014). Por essas razões, os peptídeos compõe uma importante classe de drogas competitiva que vêm atraindo os olhares da indústria farmacêutica.

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos nesta pesquisa é possível concluir que:

- I- O inibidor KDRIP desenvolvido foi elaborado a partir do albendazol e mebendazol, e é um tripeptídeo composto por , e .
- II- O KDRIP é um ligante energeticamente mais favorável do que o albendazol e o mebendazol para interações com VEGFR-2 e MK;
- III- As ligações de KDRIP, com receptor com VEGFR-2 e MK, envolvem um maior número de resíduos que compõem os sítios ativos de ambas as proteínas, quando comparada com os dois ligantes modelo (mebendazol e albendazol);
- IV- O KDRIP se liga ao VEGFR-2 no mesmo sítio que os fármacos Sunitinibe, Axinibe, Sorafenibe, Tivozanibe, com base na sobreposição dos complexos;
- V- O KDRIP representa um potencial inibidor do receptor VEGFR-2 e da MK, sendo assim, candidato a fármaco para o desenvolvimento de medicamentos mais eficientes para tratamento do câncer.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

O desenvolvimento de um tripeptídeo para o tratamento do câncer é uma estratégia bastante promissora para a indústria farmacêutica, uma vez que possibilita a produção em larga escala e custo relativamente baixo, por engenharia genética. Testes *in vitro* e *in vivo* são necessários para certificar o real potencial inibitório da molécula projetada, visando o depósito de patente.

REFERÊNCIAS

- ACS. AMERICAN CANCER SOCIETY. **What is cancer?** Disponível em: <<http://www.cancer.org/Cancer/CancerBasics/what-is-cancer>>. Acesso em: 28 de março de 2016.
- ADAMS, R. H.; ALITALO, K. Molecular Regulation Of Angiogenesis And Lymphangiogenesis. **Nature Reviews**, v. 8, p. 464-478, 2007.
- AGATONOVIC-KUSTRIN, S.; GLASS, B. D.; MANGAN, M.; SMITHSON, J. Analysing The Crystal Purity Of Mebendazole Raw Material And Its Stability In A Suspension Formulation. **International journal of pharmaceutics**, v.361, n. 1, p. 245-250, 2008.
- AHMED, S. I.; THOMAS, A. L.; STEWARD, W. P. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Inhibition By Small Molecules. **Journal of chemotherapy**, v. 4, p. 59-63, 2013.
- ALI, R.; MIRZA, Z.; ASHRAF, G. M. D.; KAMAL, M. A.; DAMANHOURI, G.A.; ABUZENADAH, A. M.; CHAUDHARY, A. G.; SHEIKH, I.A. New Anticancer Agents: Recente Developments In Tumor Terapy. **Anticancer Research**, v. 32, p. 2999-3006, 2012.
- ALITALO, K.; TAMMELA, T.; PETROVA, T. V. Lymphangiogenesis In Development And Human Disease. **Nature**, v. 438, p. 946–953, 2005.
- ALONSO, H.; BLIZNYUK, A. A.; GREASY, J. E. Combining Docking And Molecular Dynamic Simulatioes In Drug Design. **Medicinal research reviews**, v. 26, p. 531-568, 2006.
- AMORTEGUI, J.; LÓPEZ, A. R.; RODRÍGUES, D.; CARRASCAL, A. K.; DÍAZ, C. J. A.; MELENDEZ, D. P.; SÁNCHEZ, O. F. Characterization Of A New Bacteriocin From Lactobacillus Plantarum LE5 and LE27 Isolated From Ensiled Corn. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 172, p. 3374-3389, 2014.
- BAI, R. Y.; STAEDTKE, V.; RUDIN, C. M.; BUNZ, F.; RIGGINS, G. J. Effective Treatment Of Diverse Medulloblastoma Models With Mebendazole And Its Impact On Tumor Angiogenesis. **Neuro-oncology**, nou234, 2014.
- BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: Fonte Potencial Para A Descoberta De Fármacos. **Química Nova**, v. 32, P. 679-688, 2009.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. A Questão Da Invasão Em Fármacos No Brasil: Proposta De Criação Do Programa Nacional De Fármacos (Pronfar). **Química Nova**, v. 28, p. 56-63, 2005.

BERKMAN, R. A.; MERRILL, M. J.; REINHOLD, W. C.; MONACCI, W. T.; SAXENA, A.; CLARK, W.C. Expression Of The Vascular Permeability Factor/Vascular Endothelial Growth Factor Gene In Central Nervous System Neoplasms. **J Clin Invest.**, v. 91, p. 153-9, 1993.

BERNARDI, A.; JACQUES-SILVA, M. C.; LENZ, G. Abordagem Molecular No Desenvolvimento Tumoral De Fármacos Anti-Tumoral. **Infarma**, v. 15, p. 61-63, 2003.

BONHIN, R. G.; FRENANES, F. L.; CARVALHO, G. M.; GUIMARÃES, A. C.; ALTEMANI, A. M.; CHONE, C. T.; CRESPO, A.N.; AMSTALDEN, E. M. I. Correlação Entre A Expressão De Ciclooxygenase-2, VEGF e KI-67 Em Carcinomas De Células Escamosas Da Laringe E Hipofaringe Com Estadiamento TNM. **Rev. Bras. Cir. Cabeça e Pescoço**, v. 43, p.42-49, 2014.

BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. P.; COUTO, R. D.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. Química E Farmacologia De Quimioterápicos Antineoplásicos Derivado De Plantas. **Química Nova**, v. 33, n.6, pg. 1359-1369, 2010.

BRITO, L. G. O.; SCHIAVON, V. F.; MARANA, H. R. C. Hipoxia And Breast Cancer: A Future Possibility As Targeted Therapy. **Rev Bras Mastologia**, v. 21, p. 38-41, 2011.

BROWN, L. F.; BERSE, B.; JACKMAN, R. W.; TOGNAZZI, K.; MANSEAU, E. J.; SENGER, D.R. Expression Of Vascular Permeability Factor (Vascular Endothelial Growth Factor) And Its Receptors In Adenocarcinomas Of The Gastrointestinal Tract. **Cancer Res.**; v. 53, p. 4727-35, 1993

CALVETE, J. J. Venomics: Digging Into The Evolution Of Venomous Systems And Learning To Twist Nature To Fight Pathology, J. **Proteomics**, v. 72, p. 121–126. 2009

CAMPBELL, S. F. Science, Art And Drug Discovery: A Personal Perspective. **Clin. Sci. (Lond)**, v. 99, p. 255-260, 2000.

CAO, P.; YU, J.; LU, W.; CAI, X.; WANG, Z.; GU, Z.; WANG, M. Expression And Purification Of An Antitumor-Analgesic Peptide From The Venom Of *Mesobuthus Martensii*

Karsch By Small Ubiquitin–Related Modifier Fusion In Escherichia Coli. **Biotechnology progress**, v. 26, p. 1240-1244, 2010.

CASTRO, L. S. E. W.; KVICINSKI, M. R.; OURIQUE, F.; PARISOTTO, E. B.; GRIENEVICIUS, V. M. A. S.; CORREIA, J. F. G.; PEDROSA, R. C. Albendazole As A Promising Molecule For Tumor Control. **Redox Biology**, v. 10, p. 90-99, 2016.

CHARI, N. S.; PINAIRE, N. L.; THORPE, L.; MEDEIROS, L. J.; ROUTBORT, M. J.; MCDONNELL, T. J. The P53 Tumor Suppressor Network In Cancer And The Therapeutic Modulation Of Cell Death. **Apoptosis**, v. 14, p. 336-347, 2009.

CHENG, L.; WANG, C.; LIU, H.; WANG, F.; ZHENG, L.; ZHAO, J.; LIN, X. A Novel Polypeptide Extracted From *Ciona Savignyi* Induces Apoptosis Through A Mitochondrial-Mediated Pathway In Human Colorectal Carcinoma Cells. **Clinical colorectal cancer**, v. 11, p. 207-214, 2012.

CHO, Y.; TURNER, J. S.; DINH, N. N.; LEHRER, R. I. Activity Of Protegrins Against Yeast-Phase candida Albicans. **Infection and immunity**, v. 66, p. 2486-2493, . 1998.

CHUANG, C. M.; MONIE, A.; WU, A.; MAO, C. P.; HUNG, C. F. Treatment With LI-37 Peptide Enhances Antitumor Effects Induced By Cpg Oligodeoxynucleotides Against Ovarian Cancer. **Human gene therapy**, v. 20, p. 303-313, 2009.

CORZO, G.; ESCOUBAS, P.; VILLEGAS, E.; BARNHAM, K. J.; HE, W.; NORTON, R. S.; NAKAJIMA, T. Charetization Of Unique Amphipathic Antimicrobial Peptides From Venon Of De Scorpion *Pandinus Imperator*. **Biochem. J**, v. 359, p. 35-45, 2001.

COSSI, L. B.; LIMA, S. S. S.; ANDRADE, A. L. Expressão Da Proteína P53 No Carcinoma De Células Escamosas Corneal Em Cães. **Semina: Ciências agrárias**, v. 36, p. 1385-1396, 2015.

CUNHA, E. A.; BOURROUL, S.; COTRIN, S. S. Atividade Da P53 No Desenvolvimento Do Câncer. **Bioclínica-Revista Eletrônica**, v. 6, p. 10-17, 2014.

DAI, L. C.; WANG, X.; YAO, X.; LU, Y.L.; PING, J. L.; He, J. F. Antisense Oligonucleotide Targeting Midkine Suppresses In Vivo Angiogenesis. **World Journal Gastroenterol**, v. 8, p. 1208-1213, 2007.

DE ALENCAR, S. A. **Utilização De Ferramentas Computacionais Para O Estudo Do Impacto Funcional E Estrutural De Nssnps Em Genes Codificadores De Proteínas**. 2010. 130 f. Tese. Doutorado em Bioinformática. Universidade Federal de Minas Gerais, 2010.

DE VRIES, S. J.; VAN DIJK, M.; BONVIN, A. M. The HADDOCK Web Server For Data-Driven Biomolecular Docking. **Nature protocols**, v. 5, n. 5, p. 883-897, 2010.

DEL ROSARIO, S. M. Oxidación Catalítica De Albendazol Empleando Como Catalizador Molibdeno Soportado En Nanotubos De Carbono. **Revista de la Sociedad Química del Perú**, v. 79, n. 4, 2016.

DESHPANDE, N.; PYSZ, M. A; WILLMANN, J. K. Molecular Ultrasound Assessment Of Tumor Angiogenesis. **Angiogenesis**, v. 13, p.175-188, 2010.

DOUDICAN, N.; RODRIGUEZ, A.; OSMAN, I.; ORLOW, S. J. Mebendazole Induces Apoptosis Via Bcl-2 Inactivation In Chemoresistant Melanoma Cells. **Molecular Cancer Research**, v. 6, n. 8, p. 1308-1315, 2008.

DUARTE, D. F. Uma Breve História Do Ópio E Dos Opióides. *Rev. Brasileira de Anestesiologia*, v. 55, p. 135-146, 2005.

DUFFAUD, F.; LE CESNE, A. Imatinib In The Treatment Of Solid Tumours. **Target Oncol.**, v. 4, p.45-53, 2009.

DUNCAN, T.J.; AL-ATTAR, A.; ROLLAND, P.; SCOTT, I. V.; DEEN, S.; LIU, D. T. Vascular Endothelial Growth Factor Expression In Ovarian Cancer: A Model For Targeted Use Of Novel Therapies? **Clin Cancer Res.**, v. 14, p. 3030-3035, 2008.

DURRANT, J. D.; MCCAMMON, J. A. Molecular Dynamics Simulations And Drugs Discovery. **BMC biology**, v. 9, p. 9-71, 2011.

EISMA, R.J.; SPIRO, J. D.; KREUTZER, D. L. Vascular Endothelial Growth Factor Expression In Head And Neck Squamous Cell Carcinoma. **Am J Surg.**, v. 174, p. 513-7, 1997.

ELDEHNA, W. M.; ABOU-SERI, S. M.; EL KERDAWY, A. M.; AYYAD, R. R.; HAMDY, A. M.; GHABBOUR, H. A.; EL ELLA, D. A. A. Increasing The Binding Affinity Of VEGFR-2 Inhibitors By Extending Their Hydrophobic Interaction With The Active Site: Design,

Synthesis And Biological Evaluation Of 1-Substituted-4-(4-Methoxybenzyl) Phthalazine Derivatives. **European journal of medicinal chemistry**, v. 113, p. 50-62, 2016.

ERIKSSON, P.; BRATTSTRÖM, D.; HESSELIUS, P.; LARSSON, A.; BERGSTRÖM, S.; EKMAN, S. Role Of Circulating Cytokeratin Fragments And Angiogenic Factors In NSCLC Patients Stage Iiia-Iiib Receiving Curatively Intended Treatment. **Neoplasma.**, v. 53, p. 285-90, 2006.

ESWARAPPA, S. M.; FOX, P. L. Antiangiogenic VEGF-Ax: A New Participant in Tumor Angiogenesis. **Cancer Res**, v. 75, p. 2765–27699, 2015.

FAIVRE, S.; CHIEZE, S.; DELBALDO, C.; ADY-VAGO, N.; GUZMAN, C.; LOPEZ-LAZARO, L. Phase I And Pharmacokinetic Study Of Aplidine, A New Marine Cyclodepsipeptide In Patients With Advanced Malignancies. **Journal of clinical oncology**, v. 23, p. 7871-7880, 2005.

FAN, Z.; CAO, L.; HE, Y.; HU, J.; DI, Z.; WU, Y.; LI, W.; CAO, Z. Ctriporin, A New Anti-Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus Peptide From The Venom Of The Scorpion *Cherilus tricostatus*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 55, 5220-5229, 2011.

FÁTIMA, L. A.; DE CARVALHO PAPA, Paula. Fator De Crescimento Do Endotélio Vascular (VEGF): Regulação Transcricional E Pós-Transcricional. **Revista da Biologia**, v. 4, p. 22-27, 2010.

FAUSEL, C. Targeted Chronic Myeloid Leukemia Therapy: Seeking A Cure. **J Manag Care Pharm.**, v. 13, p. 8-12, 2007.

FERRARA, N. Vascular Endothelial Growth Factor: Basic Science And Clinical Progress. **Endocr Rev.**, v. 25, p.581-611, 2004.

FETT-CONTE, A. C.; SALLES, A. B. C. F.A Importância Do Gene P53 Na Carcionagênese Humana. **Rev. Bras. Hematologia e hemoterapia**, v. 24, p. 85-89, 2002.

FINN, R. D.; MILLER, B. L.; CLEMENTS, J.; BATEMAN, A. Ipfam: A Database Of Protein Family And Domain Interactions Found In The Protein Data Bank. **Nucleic acids research**, n. 42, p. 364-373, 2014.

FOLKMAN, J. Angiogenesis: An Organizing Principle For Drug Discovery?. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 6, p. 273-286, 2007.

FOLKMAN, J. Fundamental Concepts Of The Angiogenic Process. **Curr. Mol. Med.**, v. 3, p. 643-651, 2003.

FOLKMAN, J. Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications. **N Engl J Med.**, v. 285, p. 1182, 1971.

FOLKMAN, J. What Is The Evidence That Tumors Are Angiogenesis Dependent?. **J Natl Cancer Inst.**, v. 82, p. 4-6, 1990.

GAMES, P. D.; SANTOS, I. S.; MELLO, É. O.; DIZ, M. S.; CARVALHO, A. O.; SOUZA-FILHO, G. A.; CUNHA, M.; VASCONCELOS, I. M.; FERREIRA, B. S.; GOMES, V. M. Isolation, Characterization And Cloning Of A Cdna Encoding A New Antifungal Defensin From *Phaseolus vulgaris* L. seeds. **Peptides**, v. 29, P. 2090-2100, 2008.

GEORGIEVA, D.; ARNI, R. K.; BETZEL, C. H. Proteome Analysis Of Snake Venom Toxins: Pharmacological Insights. **Expert Rev. Proteomics**, v. 5, p. 787-797, 2008.

GHAVAMI, S.; ASOODEH, A.; KLONISCH, T.; HALAYKO, A. J.; KADKHODA, K.; KROCZAK, T. J. Brevinin-2R1 Semi-Selectively Kills Cancer Cells By A Distinct Mechanism, Which Involves The Lysosomal-Mitochondrial Death Pathway. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 12, p. 1005-1022, 2008.

GUIDI, A. J.; ABU-JAWDEH, G.; BERSE, B.; JACKMAN, R.W.; TOGNAZZI, K.; DVORAK, H. F. Vascular Permeability Factor (Vascular Endothelial Growth Factor) Expression And Angiogenesis In Cervical Neoplasia. **J Natl Cancer Inst.**, v. 87, p. 1237- 45, 1995.

GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Planejamento De Fármacos, Biotecnologia E Química Medicinal: Aplicações Em Doenças Infecciosas. **Revista Estudos Avançados**, v. 24, p. 81-98, 2010.

GUIDO, R. V. C.; OLIVA, G. Structure-Based Drug Design For Tropical Diseases. **Curr. Top. Med. Chem.**, v.9, n.9, p.824-43, 2009.

GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R.; FRANK, L. A.; MICHALOWSKI, C. B. Desenvolvimento E Caracterização De Nanocápsulas Multiparede Contendo Captopril E Furosemida Para Administração Oral. **Clinical and biomedical research**, v. 34, p. 86, 2014.

HACKE, A. C. M.; MOREIRA, F.; SCHNITZLER, E.; ROSSO, N. D. Estudos Termoanalíticos Da Cimetidina E Dos Complexos Com Os Íons Mn (II) Co (II) E Ni (II). **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 34, p. 229-236, 2014.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks Of Cancer. **Cell**, v. 100, p. 57-70, 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks Of Câncer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, p. 646-674, 2011.

HANUSOVA, V.; SKALOVA, L.; KRALOVA, V.; MATOUSKOVA, P. Potential Anti-Cancer Drugs Commonly Used For Other Indications. **Current cancer drug targets**, v. 15, n. 1 , p. 35-52, 2015.

HAO, H.; MAEDA, Y.; FUKAZAWA, T.; YAMATSUJI, T.; TAKAOKA, M.; BAO, X. H.; TOMONO, Y. Inhibition Of The Growth Factor MDK/Midkine By A Novelsmall Molecule Cmpound To Treat Non-Small Cell Lung Cancer. **National Cancer Center**, v. 8, p. 1-8, 2013.

HEGEDÜS, N.; MARX, F. Antifungal Proteins: More Than Antimicrobials?.**Fungal biology reviews**, v. 26, p. 132-145, 2013.

HICKLIN, D. J.; ELLIS, L. M. Role Of The Vascular Endothelial Growth Factor Pathway In Tumor Growth And Angiogenesis. **J Clin Oncol.**, v. 23, p. 1011-1027, 2005.

HITOTSUYANAGI, Y.; ISHIKAWA, H.; HASUDA, T.; TAKEYA, K. Isolation, Structural Elucidation, And Synthesis Of RA-XVII, A Novel Bicyclic Hexapeptide From *Rubia Cordifolia*, And The Effect Of Side Chain At Residue 1 Upon The Conformation And Cytotoxic Activity. **Tetrahedron letters**, v. 45, p. 935-938, 2004.

IARC. INTERNACIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (2015). **Monographs of Carcinogenic Risks to Humans and Handbooks of Cancer Prevention**. Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Publications/OrganSitePoster.pdf>>. Acesso em: 13 de março de 2016.

IBUSUKI, M.; FUJIMORI, H.; YAMAMOTO, Y.; OTA, K.; UEDA, M.; SHINRIKI, S.; TAKETOMI, M.; SAKUMA, S.; SHINOHARA, M.; IWASE, H.; ANDO, Y. Midkine In Plasma As A Novel Breast Cancer Marker. **Cancer Science**, v. 100, p. 1735-1739, 2009.

INCA. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). **Estimativa 2016-2017. Incidência do Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 2015.

JOHN, J. E. Natural Products As Lead Structures: A Role For Biotechnology. **Drug Discovery Today**, v. 15, p. 409-410, 2010.

JONES, D. R. Measuring Midkine: The Utility Of Midkine As A Biomarker In Cancer And Other Diseases. **British journal of pharmacology**, v. 171, n. 12, p. 2925-2939, 2014.

JONO, H. I; ANDO, Y. Midkine: A Novel Prognostic Biomarker For Cancer. **Cancers**, v. 2, n. 2, p. 624-641, 2010.

KABBINAVAR, F; HURWITZ, H. I.; FEHRENBACHER, L.; MEROPOL, N. J.; NOVOTNY, W. F.; LIEBERMAN, G. Phase II, Randomized Trial Comparing Bevacizumab Plus Fluorouracil (FU)/Leucovorin (LV) With FU/LV Alone In Patients With Metastatic Colorectal Cancer. **J Clin Oncol.**, v. 21, p. 60-5, 2003.

KADOMATSU, K.; MURAMATSU, T. Midkine And Pleiotrophin In Neural Development And Cancer. **Cancer Letters**, V. 204, n. 2, p. 127-143, 2004.

KARAMYSHEVA, A. F. Mechanisms of Angiogenesis. **Biochem.**, v. 73, p.751-762, 2008.

KISHIDA, S.; KODOMATSU, K. Involvement Of Midkine In Neuroblastoma Tumourigenesis. **British Journal of Pharmacology**, v. 171, p.896-904, 2013

KODOMATSU, K.; MURAMATSU, T. Midkine: An Emerging Target Of Drug Development For Tratament Of Multiple Diseases. **British Journal of Pharmacology**, v. 171, p.811-813, 2014.

KOSUGI, T; SATO, W. Midkine and the kidney: health and diseases. **Nephrol Dial Transplant**, v. 27, p. 16- 21, 2012.

KRÁLOVÁ, V.; HANUŠOVÁ, V.; STANKOVÁ, P.; KNOPPOVÁ, K.; CÁNOVÁ, K.; SKÁLOVÁ, L. Antiproliferative effect of benzimidazole anthelmintics albendazole,

ricobendazole, and flubendazole in intestinal cancer cell lines. **Anti-cancer drugs**, v. 24, n. 9, p. 911-919, 2013.

KUMAR, S.; CHAWLA, G.; SOBHIA, M. E.; BANSAL, A. K. Characterization Of Solid-State Forms Of Mebendazole. **Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 63, n. 2, p. 136-143, 2008.

LAMALICE, L.; LE BOEUF, F.; HUOT, J. Endothelial Cell Migration During Angiogenesis. **Circ. Res.** v. 100, p. 782-794, 2007.

LE TOURNEAU, C.; RAYMOND, E.; FAIVRE, S. Sunitinib: A Novel Tyrosine Kinase Inhibitor. A Brief Review Of Its Therapeutic Potential In The Treatment Of Renal Carcinoma And Gastrointestinal Stromal Tumors (GIST). **Ther Clin Risco Manag.** v. 3, p. 341-348, 2007.

LEE, H. S.; PARK, C. B.; KIM, J. M.; JANG, S. A.; PARK, I. Y.; KIM, M. S. Mechanism Of Anticancer Activity Of Buforin Iib, A Histone H2A-Derived Peptide. **Cancer letters**, v. 271, p. 47-55, 2008.

LEITE, C. A. V. G.; COSTA, J. V. G.; CALLADO, R. B.; TORRES, J. N. L.; JUNIOR LIMA, R. C. P.; RIBEIRO, R. A. Receptores Tirosina-Quinase: Implicações Terapêuticas No Câncer Receptor Tyrosine Kinases: Therapeutic Implications In Câncer. **Revista Brasileira de Oncologia Clínica**, v. 8, 2012.

LEMMON, M. A.; SCHLESSINGER, J. Cell Signaling By Receptor Tyrosine Kinases. **Cell**, v. 141, p. 1117-34, 2010.

LENZ, H.; MARSHALL, J.; ROSEN, L. Phase II Trial Of SU11248 In Patients With Metastatic Colorectal Cancer (MCRC) After Failure Of Standard Chemotherapy. **In.:** American Society of Clinical Oncology Gastrointestinal 4th Annual Meeting; 27–29 January; San Fransisco, USA, 2006.

LIM, J; et al. Structure–Function Analysis Of Full-Length Midkine Reveals Novel Residues Important For Heparin Binding And Zebrafish Embryogenesis. **Singapura: Biochem. J.**, v. 451, p. 407–415, 2013.

LIMA, L. M. Química Medicinal Moderna: Desafios E Contribuição Brasileira. **Revista Química Nova**, v. 30, p.1456-1468, 2007.

LOPES, R. A.; CARDOSO, T. C.; LUVIZOTTO, M. C. R.; ANDRADE, A. L. Occurrence And Expression Of P53 Suppressor Gene And C-Myc Oncogene In Dog Eyelid Tumors. **Veterinary Ophthalmology**, v. 13, p. 69-75, 2010.

MAEDA, S.; SHINCHI, H.; KURAHARA, H. Clinical Significance Of Midkine Expression In Pancreatic Head Carcinoma. **Br J Cancer**., v. 97, p. 405–411, 2007.

MANDAL, S. M.; DEY, S.; MANDAL, M.; SARKAR, S.; MARIA-NETO, S.; FRANCO, O. L. Identification And Structural Insights Of Three Novel Antimicrobial Peptides Isolated From Green Coconut Water. **Peptides**, v. 30, p. 633-637, 2009

MANDAL, S. M.; MIGLIOLO, L.; DAS, S.; MANDAL, M.; FRANCO, O. L.; HAZRA, T. K. Identification And Characterization Of A Bactericidal And Proapoptotic Peptide From *Cycas Revoluta* Seeds With DNA Binding Properties. **Journal of cellular biochemistry**, v.113, 184-193,2012.

MARTENS, E. A. Spatial Struture Increases The Waiting Time For Cancer. **New Journal od physics**, v. 13, p. 1-22, 2011.

MASHOUR, G. A.; RATNER, N.; KHAN, G. A.; WANG, H. L.; MARTUZA, R. L.; KURTZ, A. The Angiogenic Factor Midkine Is Aberrantly Expressed In Nf1-Deficient Schwann Cells And Is A Mitogen For Neurofibroma-Derived Cells. **Oncogene**, v. 1, p. 97– 105, 2001.

MASUI, M.; OKUI, T.; SHIMO, T.; TAKABATAKE, K.; FUKAZAWA, T.; MATSUMOTO, K.; SASAKI, A. Novel Midkine Inhibitor Imdk Inhibits Tumor Growth And Angiogenesis In Oral Squamous Cell Carcinoma. **Anticancer research**, v. 36, p. 2775-2781, 2016.

MATUSIEWICZ, M.; NEUBAUER, K.; MIERZCHALA-PASIERB, M.; GAMIAN, A.; KRZYTEK-KORPACKA, M. Matrix Metalloproteinase-9: Its Interplay With Angiogenic Factors In Inflammatory Bowel Diseases. **Disease markers**, v. 2014, p. 1-8, 2014.

MCCUBREY, J. A.; STEELMAN, L. S.; CHAPPELL, W. H. Roles of the Raf/MEK/ERK Pathway In Cell Growth, Malignant Transformation And Drug Resistance. **Biochim Biophys Acta**, v. 8, p. 1263-84, 2007.

MCTIGUE, M.; MURRAY, B. W.; CHEN, J. H.; DENG, Y. L.; SOLOWIEJ, J.; KANIA, R. S. Molecular Conformations, Interactions, And Properties Associated With Drug Efficiency

And Clinical Performance Among VEGFR TK Inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 45, p. 18281-18289, 2012.

MELO, C. S.; SILVA-CUNHA, A.; FIALHO, S. L. Formas Farmacêuticas Poliméricas Para A Administração De Peptídeos E Proteínas Terapêuticos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n. 4, p. 469-477; 2012.

MENDEL, D. B.; LAIRD, A. D.; XIN, X. In Vivo Antitumor Activity Of SU11248, A Novel Tyrosine Kinase Inhibitor Targeting Vascular Endothelial Growth Factor And Platelet-Derived Growth Factor Receptors: Determination Of A Pharmacokinetic/Pharmacodynamic relationship. **Clin Cancer Res.**, v. 9, p. 327-3, 2003.

MENDEL, D. B.; LAIRD, A. D.; XIN, X. In vivo antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors: determination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship. **Clin Cancer Res**, v. 9, n. 1, p. 327-337, 2003.

MENDIETA, J. R.; FIMOGNARI, C.; DALEO, G. R.; HRELIA, P.; GUEVARA, M. G. Cytotoxic Effect Of Potato Aspartic Proteases (Staps) On Jurkat T Cells. **Fitoterapia**, v. 81, p. 329-335, 2010.

MENEGATTI, R.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. Importância Da Síntese De Fármacos. **Cad. de quím. Nova na escola**, v. 3, p. 16-23, 2001.

MEURER, L. **Densidade microvascular e expressão imunoistoquímica de p21: associação com sobrevida em pacientes submetidos à cirurgia por carcinoma epidermóide de esôfago**. 109 f. Tese (Doutorado em Ciências Gastroenterológicas), Universidade Federal do Rio grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

MILLER, K. D.; BURSTEIN, H. J.; ELIAS, A. D. Phase Ii Study Of Su11248, A Multitargeted Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor (Tki), In Patients (Pts) With Previously Treated Metastatic Breast Cancer (MBC). **In.:** Breast Cancer Symposium 28th Annual Meeting; 8–11 December; San Antonio, Texas, USA, 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. O Câncer De Mama No Brasil: Situação Epidemiológica E Rastreamento. **In.:** (Encontro anual sobre rastreamento do Câncer de mama), 2009.

MOOBERRY, S. L.; LEAL, R. M.; TINLEY, T. L.; LUESCH, H.; MOORE, R. E.; CORBETT, T. H. The Molecular Pharmacology Of Symplostatin 1: A New Antimitotic Dolastatin 10 Analog. **International journal of cancer**, v. 104, p. 512-521, 2003.

MORRIS, D. L.; JOURDAN, J. L.; POURGHOLAMI, M. H. Pilot Study Of Albendazole In Patients With Advanced Malignancy. **Oncology**, v. 61, n. 1, p. 42-46, 2001.

MOTZER, R. J.; NOSOV, D.; EISEN, T.; BONDARENKO, I.; LESOVOY, V.; LIPATOV, O; KOGAN, M. Tivozanib Versus Sorafenib As Initial Targeted Therapy For Patients With Metastatic Renal Cell Carcinoma: Results From A Phase III Trial. **Journal of clinical oncology**, JCO-2012, 2013.

MUKHOPADHYAY, T.; SASAKI, J. I.; RAMESH, R.; ROTH, J. A. Mebendazole Elicits A Potent Antitumor Effect On Human Cancer Cell Lines Both In Vitro And In Vivo. **Clinical cancer research**, v. 8, n. 9, p. 2963-2969, 2002.

MULDER, K. C.; LIMA, L. A.; MIRANDA, V. J.; DIAS, S. C.; FRANCO, O. L. Current Scenario Of Peptide-Based Drugs: The Key Roles Of Cationic Antitumor And Antiviral Peptides. **Oncogene**, v. 4, p.40-58, 2013.

MURAMAKI, M.; MIYAKE, H.; HARA, I.; KAMIDONO, S. Introduction Of Midkine Gene Into Human Bladder Cancer Cells Enhances Their Malignant Phenotype But Increases Their Sensitivity To Antiangiogenic Therapy. **Clin Cancer Res.**, v. 14, p. 5152– 5160, 2003.

MURAMATSU, H.; INUI, T; KIMURA, T; SAKAKIBARA, S.; SONG, X.; MURAMATSU, T. Localization Of Heparin Binding, Neurite Outgrowth And Antigenic Regions In Midkine Molecule. **Biochem, Biophys. Res Commun.**, v. 203, p. 1113-1131, 1994.

MURAMATSU, T. Midkine And Pleiotrophin: Two Related Proteins Involved In Development, Survival, Inflammation And Tumorigenesis. **J. Bwchem.**, v. 132, p. 359-371, 2002.

MURAMATSU, T. Midkine, A Heparin-Binding Cytokine With Multiple Roles In Development, Repair And Diseases. **Proceedings of the Japan Academy**, v. 86, n. 4, p. 410-425, 2010.

MURER, B. Targeted Therapy In Non-Small Cell Lung Cancer: A Commentary. **Arch Path Lab Med**, v. 132, p. 1573-1575, 2008.

NATS. Núcleo De Assistência A Tecnologia Da Saúde. Tratamento Com Sunitinibe (Sutent®) Do Carcinoma De Células Renais Metastático (Do Tipo Carcinoma De Células Claras). **Nota Técnica 37/2012**, Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, 4 de dezembro de 2012.

NICOLAOU, K. C.; YANG, Z.; LIU, J. J.; UENO, H.; NANTERMET, P. G.; GUY, R. K.; CLAIBORNE, C. F.; RENAUD, J.; COULADOUROS, E. A.; PAULVANNAN, K.; SORENSEN, E. J. Total Synthesis Of Taxol. **Nature**, v. 367, p. 630 – 634, 1994.

NOORANI, L.; STENZEL, M.; LIANG, R.; POURGHOLAMI, M. H.; MORRIS, D. L. Albumin Nanoparticles Increase The Anticancer Efficacy Of Albendazole In Ovarian Cancer Xenograft Model. **Journal of nanobiotechnology**, v. 13, n.1, p. 1, 2015.

NYGREN, P.; FRYKNÄS, M.; AGERUP, B.; LARSSON, R. Repositioning Of The Anthelmintic Drug Mebendazole For The Treatment For Colon Cancer. **Journal of cancer research and clinical oncology**, v. 139, n. 12, p. 2133-2140, 2013.

NYGREN, P.; LARSSON, R. Drug Repositioning From Bench To Bedside: Tumour Remission By The Antihelmintic Drug Mebendazole In Refractory Metastatic Colon Cancer. **Acta Oncol**, v.53, p.427-428, 2014.

OLIVEIRA, D.M.; LACERDA, A. F. Peptídeos Antimicrobianos: Biotecnologia Aplicada A Saúde. **Revista de saúde Faciplac**, v.1, p.31- 45, 2014.

OLIVEIRA, R. G.; ALENCAR-FILHO, E. B.A.; VASCONCELLOS, M. I. A. A. Influência Da Piperina Na Biodisponibilidade De Fármacos: Uma Abordagem Molecular. **Quim. Nova**, v. 37, p. 69-73, 2014.

PANDOLFO, M.; ARAÚJO, R. A.; NASCIMENTO, L.; GOULART, L. R. Farmacogenoma do fluorouracil. Análise De Polimorfismo No Gene Da Diidropirimidina Desidrogenase. **Infarma**, v.17, p. 62-65, 2005.

PAPAC, R. J. Origins Of Câncer Therapy. **Yale Journal of biology and medicine**, v. 74, p. 391-398, 2001.

PELEGRINI, P. B.; MURAD, A. M.; SILVA, L. P.; SANTOS, R. C.; COSTA, F. T.; TAGLIARI, P. D.; FRANCO, O. L. Identification Of A Novel Storage Glycine-Rich Peptide From Guava (*Psidium Guajava*) Seeds With Activity Against Gram-Negative Bacteria. **Peptides**, v.29, 1271-1279, 2008.

PINTO, L. C.; SOARES, B. M.; PINHEIRO, J. D. J. V.; RIGGINS, G. J.; ASSUMPÇÃO, P. P.; BURBANO, R. M. R.; MONTENEGRO, R. C. The Anthelmintic Drug Mebendazole Inhibits Growth, Migration And Invasion In Gastric Cancer Cell Model. **Toxicology in Vitro**, v. 29, n. 8, p. 2038-2044, 2015.

POURGHOLAMI, J. AKHTER, L. WANG, Y. LU, D. L. Morris Cancer Chemother. **Pharmacol.** , v. 55, p. 425, 2005,

POURGHOLAMI, M. H.; CAI, Z. Y.; LU, Y.; WANG, L.; MORRIS, D. L. Albendazole: A Potent Inhibitor Of Vascular Endothelial Growth Factor And Malignant Ascites Formation In OVCAR-3 Tumor-Bearing Nude Mice. **Clinical Cancer Research**, v. 12, n. 6, p. 1928-1935, 2006.

POURGHOLAMI, M. H.; MORRIS, D. L. Inhibitors Of Vascular Endothelial Growth Factor In Cancer. **Cardiovasc. Hematol. Agents Med Chem.**, v. 6, p. 343-347, 2008.

POURGHOLAMI, M. H.; WANGOO, K. T.; MORRIS, D. L. Albendazole-Cyclodextrin Complex: Enhanced Cytotoxicity In Ovarian Cancer Cells. **Anticancer research**, v. 28, n. 5A, p. 2775-2779, 2008.

POURGHOLAMI, M. H.; WOON, L.; ALMAJD, R.; AKHTER, J.; BOWERY, P., MORRIS, D. L. In Vitro And In Vivo Suppression Of Growth Of Hepatocellular Carcinoma Cells By Albendazole. **Cancer letters**, v. 165, n.1, p. 43-49, 2001.

PRADO, M. R. M. **Produção de compostos bioativos a base de polissacarídeos e proteína com atividades antiangiogênica e anti-inflamatória utilizando cultura mista de bactérias e leveduras do kefir tibetano em soro do leite.** 123 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Bioprocesso e Biotecnologia), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

PUJATTI, P. B. **Desenvolvimento de derivados da bombesina radiomarcados com lutécio-177: relação estrutura e potencial diagnóstico terapêutico para tumor de próstata.** 2009.

137 F. Dissertação (Mestre em Ciências e Tecnologia Nuclear), Instituto De Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

RINI, B. I.; SMALL, E. J. Biology And Clinical Development Of Vascular Endothelial Growth Factor-Targeted Therapy In Renal Cell Carcinoma. **J Clin Oncol.**, v. 23, p. 1028-43, 2005.

RISAU, W. Mechanisms Of Angiogenesis. **Nature**, v. 386, p. 671-674, 1997.

RIXE, O.; BUKOWSKI, R. M.; MICHAELSON, M. D.; WILDING, G.; HUDES, G. R.; BOLTE, O; TRASK, P. C. Axitinib Treatment In Patients With Cytokine-Refractory Metastatic Renal-Cell Cancer: A Phase II Study. **The lancet oncology**, v. 8, n. 11, p. 975-984, 2007.

RODRIGUES, R. P.; MANTOANI, S. P.; DE ALMEIDA, J. R.; PINSETTA, F. R.; SEMIGHINI, E. P.; DA SILVA, V. B.; DA SILVA, C. H. P., Estratégias De Triagem Virtual No Planejamento De Fármacos, **Revista Virtual de Química**, v. 4, p.739- 736, 2012.

ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant Protein Expression In Escherichia Coli: Advances And Challenges. **Recombinant protein expression in microbial systems**, n. 5, p. 7, 2014.

ROSE, P. W.; BI, C.; BLUHM, W. F.; CHRISTIE, C. H.; DIMITROPOULOS, D.; DUTTA, S.; QUINN, G. B. The RCSB Protein Data Bank: New Resources For Research And Education. **Nucleic acids research**, v. 41, p. 475-482, 2013.

ROSSI, D. C.; MUÑOZ, J. E.; CARVALHO, D. D.; BELMONTE, R.; FAINTUCH, B.; BORELLI, P.; MIRANDA, A.; TABORDA, C. P.; DAFFRE, S. Therapeutic Use Of A Cationic Antimicrobial Peptide From The Spider *Acanthoscurria gomesiana* In The Control Of Experimental Candidiasis. **BMC microbiology**, v. 12, p.1, 2012.

RYDÉN, L.; BOIESEN, P.; JÖNSSON, P. E. Assessment Of Microvessel Density In Core Needle Biopsy Specimen In Breast Cancer. **Anticancer Res.**, v. 24, p. 371-375, 2004.

SÁ, M. M. **Modelagem molecular aplicada à elucidação dos mecanismos envolvidos na ação antiproliferativa e homofílica das alquifosfocolinas**. 150 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

SASAKI, J. I.; RAMESH, R.; CHADA, S.; GOMYO, Y.; ROTH, J. A.; MUKHOPADHYAY, T. The Anthelmintic Drug Mebendazole Induces Mitotic Arrest And Apoptosis By

Depolymerizing Tubulin In Non-Small Cell Lung Cancer Cells. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 1, n. 13, p. 1201-1209, 2002.

SCHIFF, P. B.; FANT, J.; HORWITZ, S.B. Promotion Of Microtubule Assembly In Vitro By Taxol. **Nature**, v. 277, p. 665 – 667, 1979

SCHNEIDER, B. P.; MILLER, K. D. Angiogenesis Of Breast Cancer. *J Clin Oncol.*, v. 23, p. 1782-90, 2005.

SHIBUYA, M.; CLAESSION-WELSH, L. Signal Transduction By VEGF Receptors In Regulation Of Angiogenesis And Lymphangiogenesis. **Exp Cell Res.**, v. 312, p. 549-560, 2006.

SHUKLA, S.; ROBEY, R. W.; BATES, S. E.; AMBUDKAR, S. V. Sunitinib (Sutent, SU11248), A Small-Molecule Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor, Blocks Function Of The ATP-Binding Cassette (ABC) Transporters P-Glycoprotein (ABCB1) And ABCG2. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 37, n. 2, p. 359-365, 2009.

SIEGEL, R.; MA, J.; ZOU, Z.; JEMAL, A. Cancer Statistics, 2014. **CA Cancer Jclin**, v. 64, p. 9-29, 2014.

SILVA, O. N.; PORTO W. F.; MIGLIOLO, L.; MANDAL, S. M.; GOMES D. G.; HOLANDA, H. H. Cn-AMP1: A New Promiscuous Peptide With Potential For Microbial Infections Treatment. **Peptide Science**, v. 98, p. 322-331, 2012.

SOCINSKI, M. A.; NOVELLO, S.; SANCHEZ, J. M. Efficacy And Safety Of Sunitinib In Previously Treated, Advanced Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC): Preliminary Results Of A Multicenter Phase II Trial. **In.:** American Society of Clinical Oncology 42th Annual Meeting; 2–6 June; Atlanta, USA, 2006.

SOUZA, G. F. M.; FREITAS, R. A.; MIRANDA, J. L. Angiogênese Em Carcinoma De Células Escamosas De Língua E Lábio Inferior. **Cienc. Odontol. Bras.**, v. 10, p.12-18, 2007.

STEFANOU, D.; BATISTATOU, A.; ARKOUMANI, E.; NTZANI, E.; AGNANTIS, N. J. Expression Of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) And Association With Microvessel Density In Small-Cell And Non-Smallcell Lung Carcinomas. **Histol Histopathol.**, v. 19, p. 37-42, 2004.

STERNBERG, C. N.; DAVIS, I. D.; MARDIAK, J. Pazopanib In Lo- Ally Advanced Or Metastatic Renal Cell Carcinoma: Results Of A Randomized Phase III Trial. **J Clin Oncol.**, v. 28, p. 1061-8, 2010.

STOFFEL, A. Targeted Therapies For Solid Tumors: Current Status And Future Perspectives. **BioDrugs**, v. 24, p. 303-16, 2010.

STRUMBERG, D. Preclinical And Clinical Development Of The Oral Multikinase Inhibitor Sorafenib In Cancer Treatment. **Drugs Today (Barc)**, v. 21, n. 12, p. 773-84, 2005.

TAKADA, T.; TORIYAMA, K.; MURAMATSU, H.; SONG, X. J.; TORII, S.; MURAMATSU, T. Midkine, A Retinoic Acid-Inducible Heparin-Binding Cytokine In Inflammatory Responses: Chemotactic Activity To Neutrophils And Association With Inflammatory Synovitis. **J Biochem.**, v. 122, p. 453-458, 1997.

TAMMELA, T.; ENHOLM, B.; ALITALO, K.; PAAVONEN, K. The Biology Of Vascular Endothelial Growth Factors. **Cardiovasc Res.**, v. 65, p. 550-563, 2005.

TAVARES, M. T. **Candidatos a novos agentes antineoplásicos: síntese e avaliação da atividade antitumoral de análogos sulfonatos e sulfonamídicos da capsaicina.** 197 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

TEIXEIRA, M. J. D.; SOBRAL, A. P. V.; ABREUELIMA, M. C.; MAIA, F. C. L.; CHRISTILIS, M.; SOUZA, D. M. B.; ADRIÃO, M.; WISCHRAL, A. Avaliação Da Superexpressão Da Proteína P53 E Das Mutações No Éxon 8 Do Gene TP53 Em Carcinomas Mamários Caninos E Glândulas Normais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, p. 521-526, 2011.

TERAMOTO, R.; FURUKUNISHI, H. Supervised Consensus Scoring For Docking And Virtual Screening. **J. Chem. Inf. Model.**, v. 47, p. 526-534, 2007.

TRELLET, M.; MELQUIOND, A. S.; BONVIN, A. M. A. Unified Conformational Selection And Induced Fit Approach To Protein-Peptide Docking. **PLOS one**, v. 8, p. 58-69, 2013.

TRIKHA, M.; YAN, L.; NAKADA, M. T. Monoclonal Antibodies As Therapeutics In Oncology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 609-14, 2002.

UGUREL, S.; RAPPL, G.; TILGEN, W.; REINHOLD, U. Increased Serum Concentration Of Angiogenic Factors In Malignant Melanoma Patients Correlates With Tumor Progression And Survival. **J Clin Oncol.**, v. 19, p. 577-83, 2001.

VAN ZUNDERT, G. C.; BONVIN, A. M. Modeling Protein–Protein Complexes Using The HADDOCK Webserver “Modeling Protein Complexes With HADDOCK”. **Protein Structure Prediction**, p. 163-179, 2014.

VELASCO, G.; SÁNCHEZ, C. Anticancer Mecanismos Of Cannabinoids. **Curr. Oncol.**, v. 23, p. 23-32, 2016.

VERBRIDGE, S. S.; CHOI, N. W.; ZHENG, Y.; BROOKS, D. J.; STROOCK, A. D.; FISCHBACH, C. Oxygen-Controlled Three- Dimensional Cultures To Analyze Tumor Angiogenesis. **Tissue Engineering**, v. 16, p. 2133-2141, 2010.

VERLI, H.; BARREIRO, E. J. Um Paradigma Da Química Medicinal: A Flexibilidade Dos Ligantes E Receptores. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 95-102, 2005.

VIEIRA, J. M.; SANTOS, S. R.; ESPADINHA, C.; CORREIA, I.; VAG, T.; CASALOU, C. Expression Of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) And Its Receptors In Thyroid Carcinomas Of Follicular Origin: A Potential Autocrine Loop. **Eur J Endocrinol.**, v. 153, p. 701-709, 2005.

VIEIRA, J. M.; SANTOS, S. R.; ESPADINHA, C.; CORREIA, I.; VAG, T.; CASALOU, C. Expression Of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) And Its Receptors In Thyroid Carcinomas Of Follicular Origin: A Potential Autocrine Loop. **Eur J Endocrinol.**, v. 153, p. 701-9, 2005.

VIEIRA, V. M. M.; OHAYON, P. Inovação Em Fármacos E Medicamentos: Estado-Da-Arte No Brasil E Políticas De P&D. **Revista Economia & Gestão**, v. 6, p. 1-23, 2006.

VITRY, A.; NGUYEN, T.; ENTWISTLE, V.; ROUGHEAD, E. Regulatory Withdrawal Of Medicines Marketed With Uncertain Benefits: The Bevacizumab Case Study. **Journal of Pharmaceutical Policy and Practice**, v.8, p. 1-11, 2015.

WANG, X.; ZHANG, X. Separation, Antitumor Activities, And Encapsulation Of Polypeptide From *Chlorella Pyrenoidosa*. **Biotechnology progress**, v. 29, n. 3, p. 681-687, 2013.

WECKBACH, L.T.; GROESSER, L.; BORGOLTE, J.; PEGEL, J.; POGODA, F.; SCHYMEINSKY, J.; MÜLLER-HÖCKER, J.; SHAKIBAEI, M.; MURAMATSU, T.; DEINDI, E.; WALZOG, B. Midkine Acts As Proangiogenic Cytokine In Hypoxia-Induced Angiogenesis. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 303, p. 429-438, 2012.

WHO. World Health Organization Cancer (2015). **Epidemiology - Cancer**. Disponível em: <<http://www.who.int/cancer/en/index.html>>. Acesso em: 17 de março de 2016.

WILHELM, S. M.; CARTER, C.; TANG, L. Y. BAY 43-9006 Exhibits Broad Spectrum Oral Antitumor Activity And Targets The RAF /MEK /ERK Pathway And Receptor Tyrosine Kinases Involved In Tumor Progression And Angiogenesis. **Cancer Res**, v. 64, n. 19, P.7099-7109, 2004.

WONG, JACK HO; NG, TZI BUN. Vulgarinin, A Broad-Spectrum Antifungal Peptide From Haricot Beans (*Phaseolus Vulgaris*). **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 37, p. 1626-1632, 2005.

XU, N., WANG, Y. S., PAN, W. B., XIAO, B., WEN, Y. J., CHEN, X. C., FU, A. F. Human A-Defensin-1 Inhibits Growth Of Human Lung Adenocarcinoma Xenograft In Nude Mice. **Molecular cancer therapeutics**, v. 7p. 1588-1597, 2008.

YAMAZAKI, Y.; TOKUNAGA, Y.; TAKANI, K.; MORITA, T. Identification Of The Heparin-Binding Region Of Snake Venom Vascular Endothelial Growth Factor (Vegf-F) And Its Blocking Of Vegf-A 165. **Biochem.**, v. 44, p. 8858-8864, 2005.

YU, L.; FAN, Y.; CHEN, B.; HU, Y.; GAO, Y.; WEI, D. Suppression Of Metastasis Of Human Pancreatic Cancer Cells To The Liver By Small Interfering Rnamediated Targeting Of The Midkine Gene. **Oncology letters**, v. 6, p. 1338-1342, 2013.

YURIEVA, E.; AGOSTINO, M.; RAMSLAND, P.A. Challenges And Advances In Computational Docking: In Review. **J Mol Recognit**, v. 24, p. 149-164, 2001.

ZAMPELLA, A.; SEPE, V.; BELLOTTA, F.; LUCIANO, P.; D'AURIA, M. V.; CRESTEIL, T.; DEBITUS, C.; PETEK, S.; POUPAT, C.; AHOND, A. Homophymines B-E And A1-E1, A Family Of Bioactive Cyclodepsipeptides From The Sponge Homophymia Sp. **Organic & biomolecular chemistry**, v. 7, p. 4037-4044, 2009.

ZHANG, W.; ABRAHAMS, C.; HUANG, Y.; LI, B.; PARVEEN, A.; NI, M.; WEI, Y.; DING, Y.; ZHANG, E.; LIN, H. C.; THURSTON, G.; ZHANG, Q. Evaluation Of Vegf_{xxx}b Isoforms As A Predictive Biomarker For Anti-VEGF Cancer Therapy. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 12, p. 36-41, 2013.

ZHAO, Z.; YANG, S.; LU, H. Expression Of Midkine And Vascular Endothelial Growth Factor In Gastric Cancer And The Association Of High Levels With Poor Prognosis And Survival. **Molecular medicine reports**, v. 5, n. 2, p. 415-419, 2012.