

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
NÍVEL: MESTRADO**

LARIANI TAMIRES WITT TIETBOHL

**DESENVOLVIMENTO DE UM PEPTÍDEO ANTIANGIOGÊNICO PARA
O TRATAMENTO DE CÂNCER COLORRETAL**

CRICIÚMA, DEZEMBRO DE 2024

LARIANI TAMIRES WITT TIETBOHL

**DESENVOLVIMENTO DE UM PEPTÍDEO ANTIANGIOGÊNICO PARA
O TRATAMENTO DE CÂNCER COLORRETAL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências da
Saúde para obtenção do título de Mestre em
Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Andrez Machado
de Ávila

CRICIÚMA, DEZEMBRO DE 2024.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

T564d Tietbohl, Lariani Tamires Witt.

Desenvolvimento de um peptídeo antiangiogênico para o tratamento de câncer colorretal / Lariani Tamires Witt Tietbohl. - 2024.

43 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2024.

Orientação: Ricardo Andrez Machado de Ávila.

1. Reto - Câncer- Tratamento. 2. Fator A de crescimento do endotélio vascular. 3. Angiogênese. 4. Biologia computacional. 5. Peptídeos. I. Título.

CDD. 22. ed. 616.99435

Bibliotecária Eliziane de Lucca Alosilla - CRB 14/1101
Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO, INOVAÇÃO E EXTENSÃO
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 609 de 14.03.2019

ATA DE MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – Nº 457

Com início às 10 (dez) horas do dia 18 (dezoito) de dezembro de 2024 (dois mil e vinte e quatro), realizou-se, na Sala 225/Bloco S, o seminário formal de apresentação dos resultados da Dissertação de Mestrado de **LARIANI TAMIRES WITT TIETBOHL**, sob a orientação do **Prof. Dr. Ricardo Andrez Machado de Ávila**, intitulada **“DESENVOLVIMENTO DE UM PEPTÍDEO ANTIANGIOGÊNICO PARA O TRATAMENTO DE CÂNCER COLORRETAL”**. A dissertação foi examinada por uma banca constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. Paulo Cesar Lock Silveira (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada, Profa. Dra. Gislaine Zilli Réus (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada, e Prof. Dr. Francisco Santos Schneider (Université de Montpellier) – Conceito final: Aprovada. Com o resultado final: APROVADA, o aluno finalizou seus estudos em nível de Mestrado, fazendo jus ao grau de MESTRA EM CIÊNCIAS DA SAÚDE. Os trabalhos foram concluídos às 12h (meio-dia) horas, dos quais eu, Henrique Manenti Felisberto, Secretário do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, lavrei a presente ata, que assino juntamente com a Profa. Dra. Josiane Budni, Coordenadora do Programa. Criciúma, 18 (dezoito) de dezembro de 2024 (dois mil e vinte e quatro).


Profa. Dra. Josiane Budni
Coordenadora do PPGCS


Henrique Manenti Felisberto
Secretário do PPGCS

FOLHA INFORMATIVA

A dissertação foi elaborada seguindo o estilo ABNT e será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Fisiopatologia Experimental do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da UNESC.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, quero agradecer a Deus por me dar forças para conseguir trilhar esse caminho. Não é um caminho fácil, existem dificuldades e muitas vezes a vontade de desistir. Mas, com a fé em Deus, segui até este momento final de escrever minha dissertação. Agradeço meus pais por me apoiarem em minhas decisões, desde o dia que resolvi me mudar para outro estado. Agradeço ao meu namorado Ramires por sempre me ouvir em momentos de desabafo (e olha que foram vários) e por sempre tentar me fazer rir em momentos que eu não estava bem.

Agradeço especialmente às minhas amigas Maria Eduarda, Mariana e Ellen. Ellen que mesmo distante (em outro país) sempre se dispôs a me ajudar e quando estava no Brasil, sempre me ajudou quando precisei. Maria Eduarda sempre me acalmando depois de conversas com o prof, principalmente aquela onde eu soube que teria que escrever minha dissertação de forma rápida e, agradeço por me ajudar nesta dissertação. Mariana sempre se dispôs para me ajudar e com certeza me ajudou muito na construção da dissertação. Meninas, vocês três tornaram meu caminho mais leve. Obrigada!

Agradeço ao meu orientador Ricardo, sempre tentando acalmar minha ansiedade, as vezes gerando mais ansiedade ainda (kkkk), mas sei de suas intenções em me transformar em uma aluna melhor. Professor, obrigada por todas as vezes se disponibilizar para me ajudar na construção do meu trabalho e, foram várias vezes em que fui à tua sala. Obrigada por todas as conversas que teve comigo, pode ter certeza de que de alguma forma me tornaram uma aluna melhor.

Agradeço a todo o meu grupo de pesquisa, que estive todos os dias junto de vocês, aprendendo dia após dia com cada um de vocês, obrigada por sempre me disponibilizarem ajuda. Agradeço em especial as ICs Flávia e Nicolý, vocês foram essenciais para a realização do trabalho.

Além de pessoas especiais que estavam comigo nesta jornada, agradeço aos órgãos de fomento CAPES e CNPq.

Por fim, o mestrado é um período rápido e desafiador, mas que traz muitos ensinamentos e, é apenas uma prévia para quem decide seguir o caminho na pesquisa.

“A vida sem ciência é uma espécie de morte.”

Sócrates.

RESUMO

Os cânceres são um conjunto de doenças caracterizado por crescimento celular desordenado e incontrolável, muitas vezes acompanhado por uma agressividade significativa. Sua fisiopatologia envolve mutações em genes supressores tumorais e proto-oncogenes, levando a um crescimento celular descontrolado e desordenado, podendo levar a formação de metástase. Para satisfazer as necessidades metabólicas aumentadas do microambiente tumoral, ocorrem expressão de fatores de crescimento angiogênicos. O Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) é um fator angiogênico que desempenha um papel crucial no câncer, facilitando a invasão e intravasamento do tumor, na circulação das células tumorais e colonização dessas células em órgãos distantes. No câncer colorretal, altos níveis de VEGF estão associados a um pior prognóstico. Terapias anti-angiogênicas, como o bevacizumabe (Avastin®), visam inibir o VEGF. Porém, limitações financeiras, efeitos colaterais e falta de estabilidade do fármaco destacam a necessidade de novas alternativas de tratamentos. Devido as limitações do tratamento com o anticorpo monoclonal bevacizumabe, é de interesse a busca por novas moléculas que possam mimetizar o efeito farmacológico deste fármaco e diminuir suas limitações. Devido a isso, peptídeos sintéticos se apresentam como uma alternativa por provocarem menos efeitos colaterais, serem estáveis e terem um baixo custo financeiro. Dessa forma, o objetivo do trabalho foi predizer *in silico* e avaliar por metodologias *in vitro* um peptídeo antiangiogênico. Através de programas de bioinformática foi realizada a predição de um peptídeo antiangiogênico, denominado BVZ, que se liga ao VEGF. Após sua predição, foi realizada a síntese química de peptídeos para posteriores testes *in vitro*. Para a análise *in vitro*, foram utilizadas células de fibroblastos murinos saudáveis (NIH3T3) e de adenocarcinoma colorretal (Caco-2). Ambas as células foram submetidas ao tratamento com o peptídeo nas seguintes concentrações: 160, 320, 500 e 820 µg/mL por um período de 24, 48 e 72 horas. Após, foi realizado o teste de MTT para analisar a viabilidade celular de ambas as linhagens celulares. Em células Caco-2, as concentrações de 500 e 820 µg/mL mostraram-se citotóxicas no período de 24 e 48 horas. No período de 72 horas as concentrações de 320, 500 e 820 µg/mL mostraram-se citotóxicas. Em células NIH3T3, a concentração de 820 µg/mL mostrou-se citotóxica em todos os períodos testados. Os resultados da bioinformática e da citotoxicidade, demonstram que o peptídeo BVZ apresenta potencial para ser utilizado como um agente antiangiogênico no tratamento do câncer. No entanto, demais testes *in vitro* e *in vivo* são necessários a fim de validar a função do peptídeo.

Palavras-chave: Câncer; VEGF; Angiogênese; Bioinformática; Peptídeos sintéticos; Análise *in vitro*.

ABSTRACT

Cancers are a group of diseases characterized by disordered and uncontrolled cell growth, often accompanied by significant aggressiveness. Their pathophysiology involves mutations in tumor suppressor genes and proto-oncogenes, leading to uncontrolled and disordered cell growth, which may lead to metastasis. To meet the increased metabolic needs of the tumor microenvironment, angiogenic growth factors are expressed. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) is an angiogenic factor that plays a crucial role in cancer, facilitating tumor invasion and intravasation, tumor cell circulation, and colonization of these cells in distant organs. In colorectal cancer, high levels of VEGF are associated with a worse prognosis. Anti-angiogenic therapies, such as bevacizumab (Avastin®), aim to inhibit VEGF. However, financial limitations, side effects, and lack of drug stability highlight the need for new treatment alternatives. Due to the limitations of treatment with the monoclonal antibody bevacizumab, it is of interest to search for new molecules that can mimic the pharmacological effect of this drug and reduce its limitations. Therefore, synthetic peptides are an alternative because they cause fewer side effects, are stable and have a low financial cost. Thus, the objective of the study was to predict *in silico* and evaluate by *in vitro* methodologies an antiangiogenic peptide. Through bioinformatics programs, the prediction of an antiangiogenic peptide, called BVZ, which binds to VEGF, was performed. After its prediction, the chemical synthesis of peptides was performed for subsequent *in vitro* tests. For the *in vitro* analysis, healthy murine fibroblast cells (NIH3T3) and colorectal adenocarcinoma cells (Caco-2) were used. Both cells were subjected to treatment with the peptide at the following concentrations: 160, 320, 500 and 820 µg/mL for a period of 24, 48 and 72 hours. Afterwards, the MTT test was performed to analyze the cell viability of both cell lines. In Caco-2 cells, the concentrations of 500 and 820 µg/mL were cytotoxic in the period of 24 and 48 hours. In the period of 72 hours, the concentrations of 320, 500 and 820 µg/mL were cytotoxic. In NIH3T3 cells, the concentration of 820 µg/mL was cytotoxic in all periods tested. The results of bioinformatics and cytotoxicity demonstrate that the BVZ peptide has potential to be used as an antiangiogenic agent in the treatment of cancer. However, further *in vitro* and *in vivo* tests are needed to validate the function of the peptide.

Keywords: Cancer; VEGF; Angiogenesis; Bioinformatics; Synthetic peptides; *In vitro* analysis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Processo fisiológico e patológico da angiogênese.	16
Figura 2 - Funções do VEGF na progressão do câncer.	18
Figura 3 – Mecanismo de ação do Bevacizumabe.	20
Figura 4 – Estrutura tridimensional do complexo Bevacizumabe/VEGF.	29
Figura 5 – Localização do peptídeo BVZ na molécula de Bevacizumabe.	30
Figura 6 - Citotoxicidade <i>in vitro</i> do peptídeo BVZ no período de 24, 48 e 72 horas.	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Akt – Proteína quinase B

CCR – Câncer colorretal

CTC - Células tumorais circulantes

DCM - Diclorometano

DIC - N-diisopropilcarbodiimida

DMEM – Meio de Eagle modificado por Dulbecco (do inglês, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*)

DMF – Dimetilformamida

DMSO – Dimetilsulfóxido

EGF – Fator de Crescimento Epidérmico

EGFR – Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico

ELISA – Ensaio de imunoabsorção enzimática (do inglês, *Enzyme Linked Immuno Sorbet Assay*)

FDA - Administração de Alimentos e Medicamentos (do inglês, *Food and Drug Administration*)

FMOCS - Fluorenil-metil-oxicarbonila

INCA - Instituto Nacional de Câncer

MAPK – Proteína quinase ativada por mitógeno

MAT - Microambiente tumoral

mL – Mililitros

mg - Miligramas

MTT - Brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio

OMS – Organização Mundial de Saúde

PBS – Tampão fosfato salino

RT-PCR – Reação de transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (do inglês, *Reverse transcription polymerase chain reaction*)

PDB – Protein Data Bank

PI3K – Fosfatidil-inositol 3-quinase

PLC- γ – Fosfolipase C Gama

PRB – Proteína do Retinoblastoma

SFB – Soro fetal bovino

SUS – Sistema único de saúde

TES - 2,5% de trietilsilano

TFA - Ácido trifluoracético

µg – Microgramas

uL - Microlitros

VEGF - Fator de Crescimento Endotelial Vascular

VEGFR-1 – Receptor 1 do fator de crescimento endotelial vascular

VEGFR-2 - Receptor 2 do fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 CÂNCER	13
1.1.1 Fisiopatologia do câncer	14
1.2 PAPEL DO VEGF NO CÂNCER	15
1.3 TERAPIAS ANTIANGIOGÊNICAS	18
1.4 BIOINFORMÁTICA E DESENVOLVIMENTO DE NOVAS MOLÉCULAS	21
2. OBJETIVOS	23
2.1 OBJETIVO GERAL	23
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1 ETAPA DE PREDIÇÃO	24
3.2 SÍNTESE QUÍMICA DO PEPTÍDEO	24
3.3 PREPARO DO PEPTÍDEO PARA ENSAIOS <i>IN VITRO</i>	26
3.4 CULTURA CELULAR	26
3.5 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR – MTT	27
3.6 PROCEDIMENTO PARA ANÁLISE DE DADOS	28
4 RESULTADOS	29
4.1 PREDIÇÃO DO PEPTÍDEO POR BIOINFORMÁTICA.....	29
4.2 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR – MTT	31
5. DISCUSSÃO	34
6. CONCLUSÃO	39
REFERÊNCIAS	40

1. INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER

O termo câncer é utilizado para definir um conjunto de doenças que representa um problema de saúde pública mundial, abrangendo mais de 100 diferentes tipos de doenças malignas. Em comum, essas condições apresentam um crescimento celular rápido, desordenado e incontrolável, muitas vezes acompanhado por uma agressividade significativa. Esse fenômeno resulta em uma proliferação celular rápida, com capacidade de invadir tecidos adjacentes e se disseminar para órgãos distantes, levando à formação de metástases (INCA, 2023).

Essa patologia não possui uma causa única, podendo ser influenciada por uma interação de fatores internos e externos. Os fatores internos estão relacionados a hormônios, sistema imunológico e mutações genéticas. Já os fatores externos estão relacionados aos fatores ambientais, como raios UV, poluição, agrotóxicos, exposição a produtos químicos e a radiação solar sem proteção, má alimentação e abuso de drogas lícitas e ilícitas (OPAS, 2020). Estudos indicam que aproximadamente 80 a 90% das causas dos cânceres estão relacionadas aos fatores externos que possuem a capacidade de alterar a estrutura genética das células, resultando em células defeituosas que perdem o controle do ciclo celular e passam a multiplicar-se (INCA, 2023).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2023), o câncer é a segunda causa de morte em todo o mundo e, em muitos países, é a primeira ou segunda causa de morte prematura antes dos 70 anos. Estima-se que até 2040 haverá cerca de 30 milhões de novos casos da doença. No Brasil, conforme dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), são estimados cerca de 704 mil novos casos de câncer no país a cada ano durante o triênio 2023-2025. Excluindo os casos de câncer de pele não melanoma (483 mil), o tipo mais comum, os números permanecem significativos, seguido do câncer de mama, com 74 mil (10,5%); próstata, com 72 mil (10,2%); cólon e reto, com 46 mil (6,5%); pulmão, com 32 mil (4,6%); e estômago, com 21 mil (3,1%). Esses números refletem a magnitude do impacto do câncer na saúde pública e a necessidade de medidas preventivas e de tratamentos eficazes (INCA, 2023).

Atualmente, os tratamentos disponíveis para o câncer, incluem cirurgia, quimioterapia ou radioterapia. A cirurgia, possui o objetivo de retirada do tumor, feita geralmente no estágio inicial da doença. A quimioterapia, consiste em utilizar medicamentos para combater a doença, através de administração oral, intravenosa, intramuscular, subcutânea, intratecal ou tópica. Já a radioterapia, é um tratamento à base de radiações ionizantes (raios-x), com o objetivo de destruir as células tumorais ou impedir que elas se multipliquem. Apesar da disponibilidade desses tratamentos, existem algumas limitações. Por exemplo, a eficácia da cirurgia pode ser restrita em tumores muito grandes ou em estágios avançados da doença, a quimioterapia e a radioterapia podem causar efeitos colaterais significativos, afetando a qualidade de vida do paciente (INCA, 2023).

1.1.1 Fisiopatologia do câncer

Acredita-se que o início do tumor, seja o resultado de alterações genéticas em células, causada por fatores internos e, em grande maioria por fatores externos, que leva à proliferação anormal das células, de forma rápida (Kontomanolis et al., 2021). Essa anormalidade no crescimento das células cancerígenas ocorre devido às mutações em proteínas codificadas por genes supressores de tumor e proto-oncogenes, responsáveis por regular o ciclo celular, mediar vias de transdução de sinal de fatores de crescimento e regular a morte celular programada (Hammer, 2016)

Exemplos de supressores tumorais são a proteína do retinoblastoma (pRB) e p16, que regulam o ponto de verificação G1/S do ciclo celular, outro exemplo é a p53, uma proteína responsável por atuar no reconhecimento de dano ao DNA, permitindo o reparo da célula para continuar o ciclo celular e entrar na fase S, caso o dano seja irreparável, a célula entra na fase G0 e sofre apoptose (Motofei, 2022). Já as proto-oncogenes atuam em várias cascatas de sinalização de fatores de crescimento celular que promovem a proliferação celular de forma fisiológica ou patológica (Kontomanolis et al., 2021).

Dessa forma, mutações em proto-oncogenes e genes supressores de tumor fazem com que as células tumorais tenham uma proliferação e crescimento celular exacerbados, caracterizando um processo de oncogênese ou carcinogênese. Nesse processo, as células irão interagir com outras células do sistema imunológico como os linfócitos, células inflamatórias e com as células do estroma, caracterizando um microambiente tumoral (MAT) (Yang e Cao, 2022).

No câncer, pode ocorrer a formação de tumores secundários em tecidos e órgãos distantes do câncer primário original e, esse processo é chamado de metástase. O desenvolvimento da metástase consiste em: invasão, intravasamento local, sobrevivência na circulação, parada em órgão distante, extravasamento e colonização (Roberts et al., 2013). A etapa de invasão e intravasamento começa a partir de células tumorais que se despreendem da massa tumoral e entram sequencialmente nos vasos sanguíneos. Nesta etapa, ocorre a secreção de proteases, pois a matriz extracelular é uma barreira física, que as impede de migrar para os vasos sanguíneos ou linfáticos. Quando as células cancerígenas entram na corrente sanguínea ou vasos linfáticos, podem invadir tecidos normais adjacentes e favorecer uma nova colonização das células, caracterizando uma metástase (Park et al., 2020; Motofei, 2022).

À medida que as células cancerígenas crescem e se proliferam, ocorrem anormalidades em suas vias metabólicas, a fim de satisfazer as necessidades de nutrição e oxigenação do tumor. A queda dos níveis de oxigênio no MAT caracteriza uma hipóxia, na qual ocorre a expressão de fatores de transcrição para satisfazer as necessidades metabólicas aumentadas do tumor (Liu et al., 2023). Vale ressaltar que nenhum tumor cresce mais do que 2 mm³ na ausência da angiogênese, pois a falta de oxigênio no centro do tumor resulta em apoptose e necrose celular (Yang e Cao, 2022)

Assim, a tensão reduzida de oxigênio é um sinal chave para a indução da angiogênese, que é o processo de formação de novos vasos sanguíneos, importante para nutrir e oxigenar o tumor a fim de continuar a proliferação das células cancerígenas. Um dos principais fatores angiogênicos regulados pela hipóxia, é o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fortemente relacionado à metástase tumoral (Cao et al., 2009; Yang e Cao, 2022; Liu et al., 2023).

1.2 PAPEL DO VEGF NO CÂNCER

A família de genes VEGF encontrada em mamíferos é composta por VEGF-A (ou simplesmente VEGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e PlGF (Fator de Crescimento Placentário). Por sua vez, a família de receptores tirosina-quinase VEGFR inclui VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3. O VEGF-A é o principal ligante envolvido na angiogênese, interagindo com os receptores VEGFR-1 e VEGFR-2. Desses, o VEGFR-2 é o principal mediador desse processo, pois o VEGFR-1

apresenta fraca atividade angiogênica. O VEGF-B se liga ao VEGFR-1, desempenhando um papel na manutenção dos vasos sanguíneos. Enquanto isso, VEGF-C e VEGF-D se ligam tanto ao VEGFR-2, sem relevância significativa na angiogênese, quanto ao VEGFR-3, com atuação importante na linfangiogênese. O PlGF, por sua vez, também interage com o VEGFR-1, contribuindo para a angiogênese placentária (Shibuya, 2011). Tendo visto isso, VEGF-A e VEGFR-2 são mediadores chave no processo de angiogênese, que pode estar envolvido em um processo fisiológico ou patológico (Figura 1) (Bielenberg e Zetter, 2015). Assim, VEGF-A e VEGFR-2 destacam-se como mediadores chave da angiogênese, seja em processos fisiológicos ou patológicos.

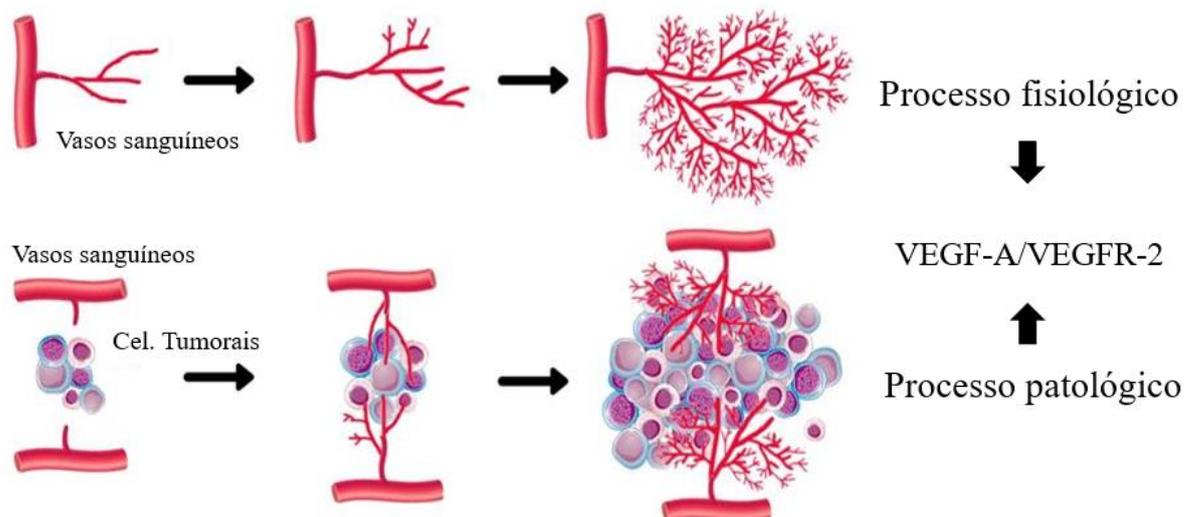


Figura 1 - Processo fisiológico e patológico da angiogênese. Células tumorais (Cel. Tumorais) também expressam VEGF-A/VEGFR-2.
Fonte: Adaptado de Bielenberg e Zetter, 2015.

No caso de patologias como o câncer, a via de sinalização mediada pela ligação do VEGF ao VEGFR-2, induz a proliferação, migração, invasão e angiogênese. O processo de angiogênese favorece o rápido crescimento e proliferação celular desordenada das células cancerígenas (Bielenberg e Zetter, 2015). Esse processo pode levar à metástase, caracterizando um pior prognóstico e maior índice de mortalidade do paciente, constituindo a principal causa de morte para mais de 90% dos pacientes com câncer (Ghalehbandi et al., 2023).

No microambiente tumoral, a ligação do VEGF ao VEGFR-2, ativa moléculas como fosfolipase C- γ (PLC- γ), PI3K, Akt e MAPK. Estas moléculas são expressas no interior de células que expressam VEGFR-2 e promovem a

sobrevivência, invasão e migração das células tumorais. Além disso, o VEGF está fortemente relacionado com o processo de metástase, desempenhando um papel crucial na sinalização de suas etapas. Ele facilita, por exemplo, o processo de invasão e intravasamento local, promovendo o afrouxamento das junções célula-célula, como E-caderina. Além disso, o VEGF reduz a adesão mediada pela caderina endotelial vascular (VE-caderina), aumentando a permeabilidade dos vasos sanguíneos. Também interfere na função dos pericitos, o que facilita o intravasamento de células cancerígenas em tecidos locais (Figura 2) (Roberts et al., 2013).

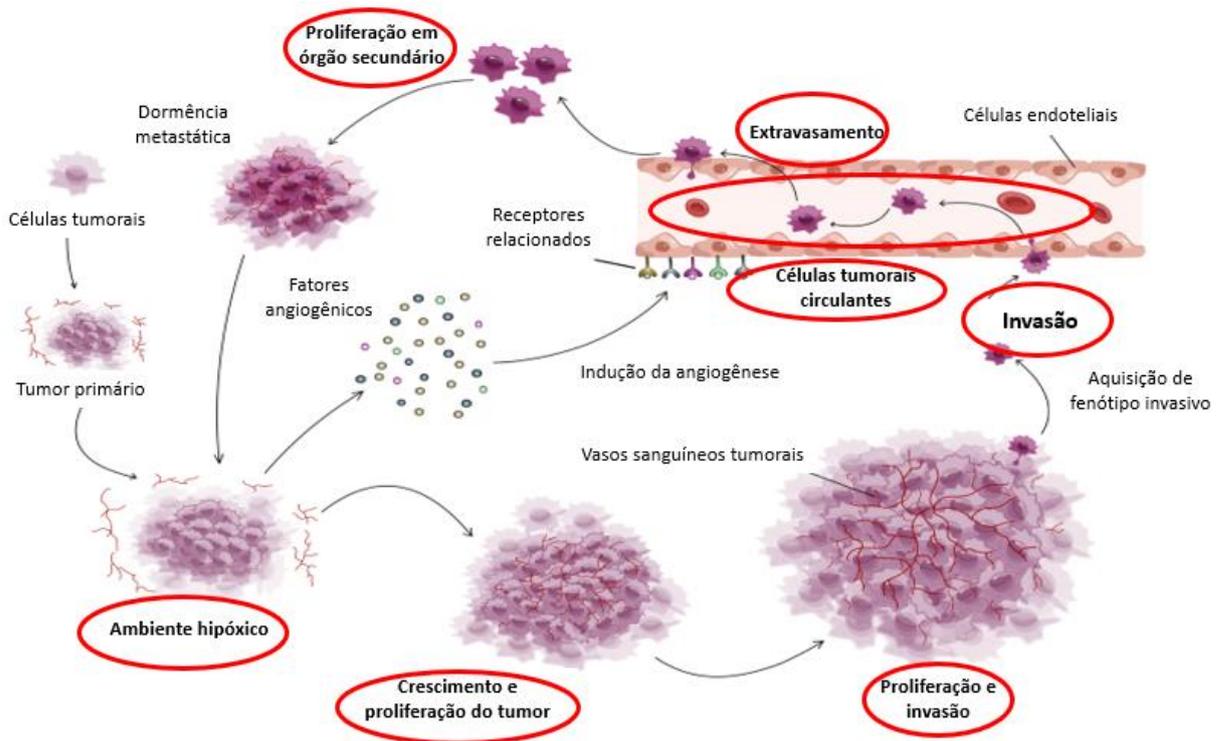


Figura 2 - Funções do VEGF na progressão do câncer. Células tumorais multiplicam-se e formam um tumor primário. À medida que este tumor cresce, favorece um ambiente hipóxico e a expressão de fatores angiogênicos que se ligam aos seus receptores específicos para continuar com crescimento e proliferação celular, adquirindo um fenótipo invasivo. No processo de invasão o VEGF favorece o desprendimento de células tumorais do microambiente tumoral e favorece as células tumorais na circulação contra tensões da circulação sanguínea. Por fim, o VEGF auxilia no extravasamento das células tumorais e colonização em órgão distante, ocorrendo metástase.

Fonte: Adaptado de Liu et al., 2013.

Na circulação, as células tumorais circulantes (CTC) possuem componentes do MAT primário, como o VEGF, e podem circular em grupos ou individualmente. As CTC agrupadas possuem maior probabilidade de formar metástases, pois esses aglomerados interagem com plaquetas, que são as maiores secretoras de VEGF na circulação. As plaquetas induzem a formação de um escudo

de revestimento em torno das células cancerígenas, que evita o reconhecimento pelo sistema imunológico, além de fornecer a estrutura necessária para suportar as tensões físicas da circulação, facilitando o escape das CTC e conseqüentemente a formação de metástases (Roberts et al., 2013).

Na fase de extravasamento, o processo é semelhante à migração de leucócitos em processos fisiológicos, com forte participação do VEGF e colonização em órgãos. O mecanismo pela qual o VEGF participa está relacionado a expressão de moléculas de adesão, como as integrinas, e afrouxamento da barreira endotelial vascular, para assim o tumor chegar ao tecido alvo e colonizá-lo, sendo que na etapa de colonização também existe a expressão de VEGF, a fim de formar novos vasos sanguíneos para nutrição e oxigenação do tumor (Figura 2) (Roberts et al., 2013; Fares et al., 2020; Yang e Cao, 2022).

Além das funções mencionadas, alguns estudos destacam as atividades intrínsecas do VEGF no câncer, ou seja, aquelas relacionadas à sua expressão intracelular. Bhattacharya et al. (2017) mencionou em seu estudo que o VEGF intrínscino regula positivamente pFAK, uma proteína fundamental para a migração e sobrevivência celular.

Adicionalmente, o VEGF é o fator angiogênico de maior predominância em câncer colorretal (CCR), sendo associado a um pior prognóstico e baixa sobrevida. Os níveis séricos elevados desse fator correlacionam-se diretamente com o estágio do tumor, apresentando níveis significativamente maiores em estágios mais avançados em comparação com os iniciais, favorecendo a formação de metástases (Fares et al., 2020).

Níveis pré-operatórios mais elevados de VEGF estão ainda associados à recorrência de CCR após a terapia, sendo que em casos de o tumor estar localmente avançado ou metastático, é improvável que a ressecção cirúrgica seja curativa. Infelizmente, quando o CCR está em fase metastático, a taxa de sobrevida em cinco anos da doença é inferior a 5% (Cao et al., 2009; Bendardaf et al., 2017; Abdulla et al., 2021; Dakowicz et al., 2022).

1.3 TERAPIAS ANTIANGIOGÊNICAS

O tratamento do câncer baseia-se principalmente em cirurgias, radioterapia e quimioterapia. No entanto, essas terapias possuem limitações como a cirurgia que pode ser restrita em tumores muito grandes, a quimioterapia e a radioterapia podem

causar efeitos colaterais significativos, afetando a qualidade de vida do paciente (INCA, 2023).

Uma alternativa de tratamento oncológico é a imunoterapia, que utiliza medicamentos com o objetivo de ativar o próprio sistema imunológico do paciente de combater o câncer, como os anticorpos monoclonais, que são imunoglobulinas altamente específicas para a ligação e atuação sobre determinadas moléculas, como moléculas que promovem a angiogênese (Yang e Cao, 2022).

Existem terapias antiangiogênicas clinicamente aprovadas pela *Food and Drug Administration* (FDA) e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), para o tratamento do câncer colorretal metastático, como Erbitux® (Cetuximabe), Cimaher (Nimotuzumabe), VECTIBIX (Panitumumabe) que possuem o mecanismo de ação de bloquear o Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR), impedindo a ligação do Fator de Crescimento Epidérmico (EGF), o que resulta em inibição do crescimento celular e diminuição da expressão de VEGF (Yang e Cao, 2022; Karpinska et al., 2023).

Outro medicamento antiangiogênico é o Avastin® (Bevacizumabe), que se liga ao VEGF e impede a sua ligação com seus receptores VEGFR-1 e VEGFR-2, diminuindo a angiogênese tumoral (Figura 3), sendo estes os principais mediadores da angiogênese (Yang e Cao, 2022; Karpinska et al., 2023).

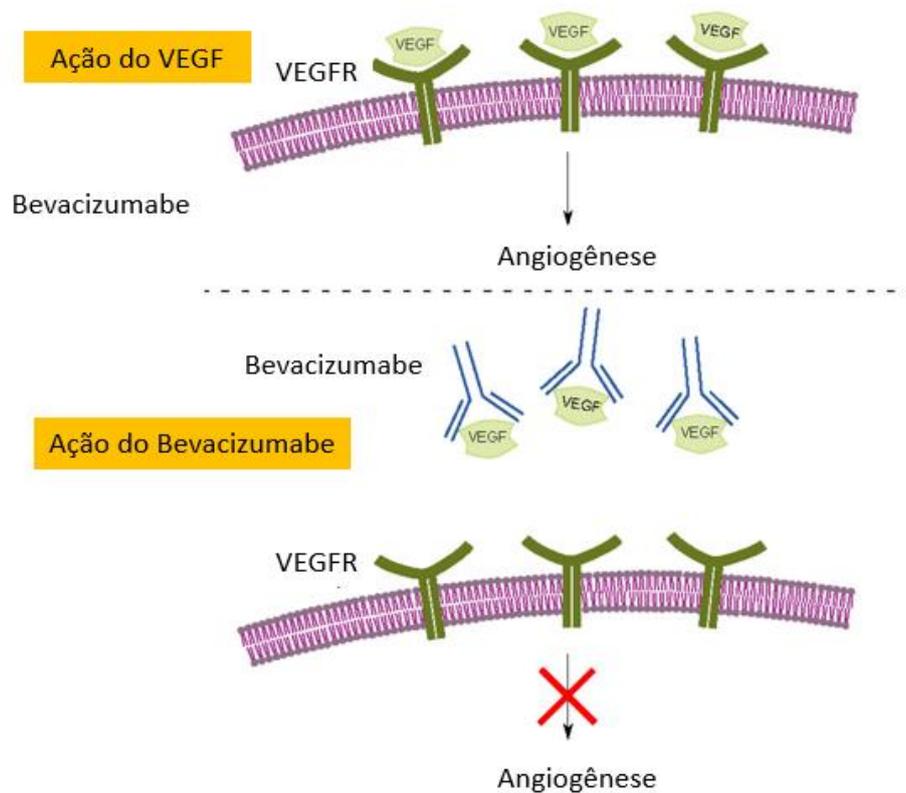


Figura 3 – Mecanismo de ação do Bevacizumabe. O VEGF possui atividade angiogênica, ligando-se ao VEGFR-2. A ação do bevacizumabe consiste em ligar-se ao VEGF e impedir sua ligação ao VEGFR-2, inibindo a angiogênese.

Fonte: Adaptado de Karpinska et al., 2023.

O Avastin® (Bevacizumabe) é conhecido por ser o primeiro anticorpo monoclonal antiangiogênico que se liga ao VEGF (Ceci et al., 2020; Garcia et al., 2020; Karpinska et al., 2023) Esse anticorpo monoclonal é prescrito para uma série de tumores, especialmente como primeira linha do tratamento do câncer colorretal metastático não ressecável (estágio IV) associado a um regime quimioterápico (Liu et al., 2023).

Embora seja um tratamento de primeira linha, o acesso a este medicamento enfrenta barreiras financeiras, podendo variar de acordo com o país e o sistema de saúde. Por exemplo, o acesso pode ser limitado devido à acessibilidade em áreas onde as despesas custeadas pelo próprio paciente são relevantes, principalmente em países emergentes como Brasil, México e Turquia. Em regiões onde os cuidados de saúde são baseados em seguros, o acesso ao Bevacizumabe pode ser limitado pela cobertura do plano e pelo alto custo do tratamento. No Brasil, o Sistema Único de Saúde (SUS) deve fornecer o medicamento quando o paciente

não possui plano de saúde ou tampouco condições financeiras de custear o tratamento. Para isso, o paciente precisa entrar com uma ação judicial, solicitando uma liminar, o que pode causar atrasos ao início do tratamento e permitir a progressão da doença, comprometendo a qualidade de vida dos pacientes e aumentando os riscos de óbito (Monk et al., 2017).

Além das limitações financeiras, os anticorpos monoclonais não possuem uma boa estabilidade, exigindo temperaturas específicas de armazenamento (2°C - 8°), e podem apresentar efeitos colaterais como hipertensão, cansaço, fraqueza e problemas gastrointestinais (Minhajet et al., 2023).

Diante destes desafios, é imprescindível o desenvolvimento de novas terapias que mimetizem as funções do bevacizumabe, a fim de tornar a terapia mais acessível aos pacientes, com menores custos financeiros, o que pode melhorar a adesão ao tratamento e possivelmente, permitir um controle mais rápido da doença (Rosen et al., 2017).

1.4 BIOINFORMÁTICA E DESENVOLVIMENTO DE NOVAS MOLÉCULAS

A bioinformática estrutural é uma área de pesquisa com caráter multidisciplinar, que aplica ferramentas computacionais para analisar, compreender visualizar e armazenar informações associadas a macromoléculas biológicas e possui como foco o desenvolvimento e a aplicação de técnicas em computação. Algumas pesquisas são realizadas utilizando-se o alinhamento de sequências, desenho de fármacos, interação proteína-proteína, busca de genes, predição de estruturas das proteínas, montagem de genoma entre outros (Luscombe et al., 2001).

É um campo interdisciplinar que abrange a ciência da computação, matemática, física e biologia, essencial para biologia e medicina moderna, que estuda por exemplo as interações entre anticorpos e antígenos, proteínas e receptores, além de predizer e modelar peptídeos que mimetizem funções de interesse. Essas interações moleculares são observadas através de *softwares*, onde é possível determinar a interação entre proteínas de interesse, para então obter a sequência de aminoácidos (peptídeo) referente à essa interação e, posteriormente, fazer a síntese química de peptídeos (Bayat, 2002; Machado-de-Ávila, 2014). A busca por estes peptídeos possui um caráter econômico, já que os estes são mais fáceis de serem conservados e sua síntese é de menor custo, simples e fácil de ser monitorada quanto

à qualidade. Além disso, são quimicamente mais estáveis, menores e mais flexíveis que uma proteína, e não são potencialmente infecciosos ou tóxicos (Steiner, 2019).

Neste contexto, o desenvolvimento de um peptídeo antiangiogênico que mimetize os efeitos do bevacizumabe surge como uma alternativa promissora no tratamento do câncer, especialmente o câncer colorretal. Embora o bevacizumabe seja um tratamento de primeira linha, ele é de difícil acesso, apresenta um custo elevado, baixa estabilidade e efeitos colaterais (Monk et al., 2017; Minhajat et al., 2023). Portanto, a criação de um peptídeo antiangiogênico capaz de se ligar ao VEGF, possibilitaria não apenas uma terapia com baixos custos e maior acessibilidade, mas também a diminuição dos efeitos adversos e uma maior estabilidade, melhorando a qualidade de vida e a taxa de sobrevida dos pacientes.

Assim, o objetivo deste trabalho foi predizer *in silico* um peptídeo antiangiogênico para o tratamento do câncer colorretal, seguido de análises *in vitro* sobre a citotoxicidade do mesmo.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Predizer *in silico* um peptídeo antiangiogênico e avaliar a sua citotoxicidade *in vitro*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Encontrar a estrutura tridimensional da interação da molécula Bevacizumabe e VEGF no *Protein Data Bank* (PDB);
- Identificar os aminoácidos da molécula do Bevacizumabe que possuem interação com o VEGF, através do *Swiss PDB Viewer*;
- Predizer a sequência do peptídeo a partir dos aminoácidos selecionados;
- Obter o peptídeo predito, através da síntese química de peptídeos, pelo método *Fmoc-Sínteses*;
- Avaliar a citotoxicidade do peptídeo produzido em linhagem celular imortalizada de adenocarcinoma colorretal humano (Caco-2), pelo teste de MTT;
- Avaliar a citotoxicidade do peptídeo produzido em linhagem celular imortalizada de fibroblastos murinos (NIH3T3), pelo teste de MTT.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

A primeira etapa do presente estudo foi constituída pela predição *in silico* do peptídeo mimetizando do bevacizumabe. Após a finalização da predição do peptídeo, ele foi sintetizado quimicamente de acordo com o protocolo da síntese química de peptídeos pelo método *Fmoc-Sínteses* e foi liofilizado, para posterior análise *in vitro*. Na segunda etapa do projeto, foi realizado o ensaio de viabilidade celular para avaliar a citotoxicidade do peptídeo, utilizando as linhagens celulares imortalizadas de adenocarcinoma colorretal humano (Caco-2) e de fibroblastos murinos (NIH3T3). As etapas serão descritas a seguir:

3.1 ETAPA DE PREDIÇÃO

Para iniciar a predição do peptídeo, foi necessário localizar no banco de dados PDB (Zhang et al., 2008) a estrutura tridimensional da interação entre a molécula de Bevacizumabe e VEGF. O programa de visualização de proteínas, *Swiss PDB Viewer* (Guex e Peitsch, 1997), foi utilizado para estudar a interação entre a proteína Bevacizumabe e VEGF.

Os aminoácidos da molécula do Bevacizumabe que estavam interagindo com VEGF foram selecionados e destacados na molécula do Bevacizumabe. A seleção dos aminoácidos ocorreu de apenas de forma visual, analisando a estrutura das duas moléculas e baseando-se em um estudo sobre a interação das duas moléculas (Muller et al., 1998). Além disso, foram adicionados aminoácidos ligantes, os quais são importantes para manter a estrutura conformacional do peptídeo, mas não interagem diretamente com a molécula de interesse (De-Pieri et al., 2024).

A partir disso, foi definida a sequência de aminoácidos do peptídeo proposto, com base na distância espacial entre os resíduos. Após definição do peptídeo, foi realizada a caracterização físico-química do peptídeo através dos programas *Protparam* e *PepCalc* (De-Pieri et al., 2024).

3.2 SÍNTESE QUÍMICA DO PEPTÍDEO

A síntese do peptídeo foi realizada manualmente utilizando aminoácidos específicos para síntese *in vitro*, a partir do protocolo *Fmoc-Sínteses* (Merrifield, 1965; Scussel et al., 2022). O protocolo *Fmoc-Sínteses* consiste em fixar o aminoácido C-terminal do peptídeo sobre um suporte sólido insolúvel e depois alongar a cadeia peptídica com a adição de sucessivos resíduos da porção C-terminal para N-terminal.

Esses aminoácidos possuem um grupamento amina protegido pelo grupamento fluorenil-metil-oxicarbonila (Fmoc) e sua cadeia lateral também é protegida para evitar possíveis reações indesejadas.

A síntese foi realizada em uma seringa de 6 mL com um filtro de polietileno hidrofóbico, contendo o suporte sólido (resina *rink*) e se inicia com a adição de dimetilformamida (DMF) por 30 minutos. Em seguida, foi adicionada a 4-metilpiperidina 25% em DMF em dois ciclos de desproteção, incubando a solução na seringa por 5 e 15 min para remover o grupo Fmoc da resina, e então foram realizadas três lavagens com DMF e uma com diclorometano (DCM). Para verificar o resultado, foi realizado o teste de azul de bromofenol, para isso é retirado alguns grãos de resina da seringa e adicionado azul de bromofenol 0,1% em DMF, que confirma a desproteção do aminoácido, representado pela mudança para cor azul dos grãos de peptídeo-resina. O primeiro resíduo de aminoácido, da porção C-terminal, é ancorado por meio de seu grupo ácido carboxílico na resina *rink*. O grupo Fmoc é removido por 4-metilpiperidina 25% em DMF em dois ciclos de desproteção, incubando a solução na seringa por 5 e 15 min. Após essa etapa de desproteção, foram feitas três lavagens com DMF e uma lavagem com DCM. O acoplamento do primeiro aminoácido à resina foi realizado por ativação do grupo carboxílico, com os reagentes de acoplamento, N, N-diisopropilcarbodiimida (DIC) e etil 2-ciano-2-(hidroxiimino)acetato (Oxyma), que foram utilizados para diluir o aminoácido e então essa solução foi colocada na seringa por trinta minutos.

Em seguida, foram realizadas quatro lavagens com metanol e DMF de forma intercalada, e por fim uma última lavagem com DCM. Entre todos os ciclos de desproteção e acoplamento, uma etapa de controle colorimétrico de desproteção e acoplamento foi realizada usando azul de bromofenol 0,1% em DMF. Quando o terminal N é desprotegido, a cor do peptídeo-resina é azul e, quando protegido, é amarela. Os ciclos de desproteção e acoplamento foram realizados até que toda a cadeia peptídica fosse sintetizada por sucessivas ligações peptídicas, que acoplam os resíduos de aminoácidos da região C-terminal em direção a região N-terminal. Após o último aminoácido ser acoplado, foi realizado o último ciclo de desproteção, dando fim aos ciclos de acoplamento dos aminoácidos. Após o último ciclo de desproteção, cada peptídeo foi removido da resina, por uma etapa chamada de clivagem. Na qual, acontece a eliminação dos grupamentos protetores da cadeia lateral e a clivagem da cadeia peptídica da resina, ou seja, separando a cadeia

peptídica do suporte sólido. Para isso, cada peptídeo foi incubado por três horas com uma solução de clivagem contendo 2,5% de trietilsilano (TES), 2,5 % de água destilada, 2,5% de 1,2-etanoditiol e 92,5% de ácido trifluoracético (TFA). Após esse período, a solução de clivagem foi filtrada e recolhida em um tubo tipo Falcon.

Por fim, foram adicionados 15 mL de éter etílico gelado (4°C), para ocorrer a precipitação do peptídeo, então essa solução foi congelada overnight (-20°C). No dia seguinte, foi realizada a centrifugação dessa solução por 10 minutos a 4°C a 10.000 rpm, após o processo foi descartado o sobrenadante. Em seguida, foi adicionado novamente éter etílico gelado no peptídeo (o precipitado) e outro ciclo de centrifugação nas mesmas condições foi realizado. O sobrenadante foi descartado, permanecendo somente o precipitado, ou seja, o peptídeo sintetizado. O peptídeo sintetizado foi liofilizado, passando pelas etapas, de congelamento em nitrogênio e liofilização em uma pressão de 80 mmHg com o condensador mantido a -100 °C até completa liofilização. O peptídeo sintetizado foi nomeado BVZ.

3.3 PREPARO DO PEPTÍDEO PARA ENSAIOS *IN VITRO*

Para a utilização do peptídeo liofilizado nos ensaios em cultura celular, foi necessário realizar a sua diluição. Para isso, foi pesado 1 mg do peptídeo, diluído em 50 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) e em 950 µL de Meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), estabelecendo uma concentração final de 1 mg/mL, para as soluções estoque do peptídeo. A partir da concentração de 1 mg/mL, foi realizado diluições com o meio DMEM a fim de estabelecer as concentrações do tratamento com o peptídeo, sendo de: 160, 320, 500 e 820 µg/mL. Além das quatro concentrações do tratamento com o peptídeo,

3.4 CULTURA CELULAR

Para os ensaios de cultura celular, foram utilizadas células imortalizadas de câncer de colorretal (Caco-2). Essa linhagem de células cancerígenas foi utilizada por apresentar uma alta expressão de VEGF e por ser o segundo tipo de câncer mais comum entre homens e mulheres com uma baixa taxa de sobrevivência (Sarkar et al., 2020; INCA, 2023). Além da Caco-2, foram utilizadas células saudáveis imortalizadas de fibroblastos murinos (NIH3T3) como controle.

As células imortalizadas Caco-2 e NIH3T3 foram cultivadas em garrafas de plástico de 25 cm², com meio DMEM suplementado com 1% de antibiótico penicilina

e estreptomicina (10 U.L/mL) e 10% de soro fetal bovino (SFB) (DMEM completo). Para o crescimento e adesão celular, elas foram mantidas em uma incubadora umidificada, com atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C. As trocas de meio foram realizadas em dias alternados, podendo haver adaptações, até se obter uma confluência de células suficiente, em torno de 80%, para o desenvolvimento dos experimentos *in vitro*. Ao obter a confluência necessária, as células foram tripsinizadas, para isso é retirado o DMEM completo da garrafa e adicionado 4 mL de tripsina durante 5 min, ou até as células ficarem em suspensão, desaderindo do fundo da garrafa. Então, foi adicionado 4 mL de DMEM completo com o intuito de neutralizar a tripsina. Em seguida, foi realizada a contagem do número total de células, na câmara Neubauer.

Posteriormente à contagem, foi realizada a diluição dessas células em meio DMEM completo na concentração desejada. Então, as células foram plaqueadas em placas esterilizadas de 96 poços, nas quais foram adicionados 100 µL/poço, para obter a concentração final de 1x10⁴ células/poço. Após, as células foram incubadas por 24 horas em uma incubadora umidificada, com atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C a fim de proporcionar a aderência das células na superfície da placa, para então realizar os ensaios celulares.

Decorrido o período de aderência das células Caco-2 e NIH3T3, elas foram tratadas com o peptídeo predito nas seguintes concentrações: 160, 320, 500 e 820 µg/mL, além do grupo controle, no qual as células são expostas apenas ao meio DMEM completo, ou seja, com 1% de antibiótico penicilina e estreptomicina (10 U.L/mL) e 10% de soro fetal bovino (SFB). Não foi realizado um grupo controle com DMEM + DMSO, pois em um estudo anterior realizado por nosso grupo de pesquisa, células NIH3T3 e Caco-2 expostas a uma concentração de 5% de DMSO em DMEM, não tiveram a viabilidade celular diminuída.

Após a adição dos tratamentos a placa foi incubada por 24, 48 e 72 horas em uma incubadora umidificada com atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C, e posteriormente foi realizado o ensaio de MTT. As concentrações foram testadas em triplicata para cada ensaio, sendo que o ensaio foi repetido em três dias diferentes para garantir a reprodutibilidade e confiabilidade dos resultados.

3.5 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR – MTT

Esse método consiste em avaliar a viabilidade celular, pela redução do brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio (MTT), que em sua forma

oxidada é solúvel em água e possui uma coloração amarela. Ao ser reduzido, o MTT forma cristais de formazan, um sal de coloração roxa e insolúvel em água. Essa reação de redução ocorre nas mitocôndrias das células, fazendo com que a viabilidade celular seja diretamente proporcional à produção dos cristais de formazan (Mosmann, 1983). Após a incubação das células com os tratamentos específicos por 24, 48 e 72 horas, foi preparada uma solução de 0,5 mg/mL de MTT diluído em PBS. Os tratamentos foram retirados dos poços e adicionado 100 µL/poço da solução de MTT, sendo incubado por 3 horas (5 % de CO₂ a 37 °C) para permitir a formação dos cristais de formazan. Após o período de incubação, foi retirada a solução de MTT de todos os poços e adicionado 100 µL/poço de álcool isopropílico, a fim de solubilizar os cristais de formazan.

Por fim, a placa foi analisada em um leitor de placas por absorvância, no comprimento de onda de 570 nm. A viabilidade celular foi determinada, através da comparação dos resultados das absorvâncias dos grupos testes, com as absorvâncias do grupo controle, ou seja, o grupo que possui apenas células viáveis, expostas apenas ao meio DMEM completo.

Após os resultados da absorvância, foram realizados os cálculos, para obter a porcentagem de células viáveis em cada grupo, para que dessa forma fosse avaliada a toxicidade do peptídeo sintético, no qual foram apresentados em porcentagem de viabilidade celular, onde o grupo controle é considerado como 100% de células vivas.

3.6 PROCEDIMENTO PARA ANÁLISE DE DADOS

As análises estatísticas de viabilidade celular foram realizadas por meio da análise de variância de uma via (ANOVA), seguido do teste de Dunnett como *post hoc*. Os dados foram expressos como média ± desvio padrão, considerando os valores de $p \leq 0,05$ como significativos. Para a construção deste estudo, foi utilizado o *software GraphPad Prism*, versão 8.0.1.

4 RESULTADOS

4.1 PREDIÇÃO DO PEPTÍDEO POR BIOINFORMÁTICA

Através de ferramentas de bioinformática, foi realizada a predição do peptídeo de interesse. Para isso, foi realizada uma busca no banco de dados PDB, a fim de localizar a estrutura tridimensional cristalografada por difração de raio-X, da interação entre o medicamento Bevacizumabe e a molécula do VEGF.

Através dessa busca, foi encontrada uma estrutura cristalografada do complexo Bevacizumabe/VEGF, representando a estrutura da ligação entre a molécula do anticorpo monoclonal Bevacizumabe e a proteína VEGF. Essa estrutura está disponível no PDB, com o código PDB: 1BJ1, com uma resolução de 2.40 Å. Após a escolha da estrutura tridimensional, foi realizado o *download* do arquivo da estrutura, no formato PDB. Em seguida, o arquivo PDB foi aberto no *software Swiss PDB Viewer*, um programa de visualização de proteínas, no qual foi possível visualizar detalhadamente a estrutura tridimensional do complexo proteico Bevacizumabe/VEGF (Figura 4).

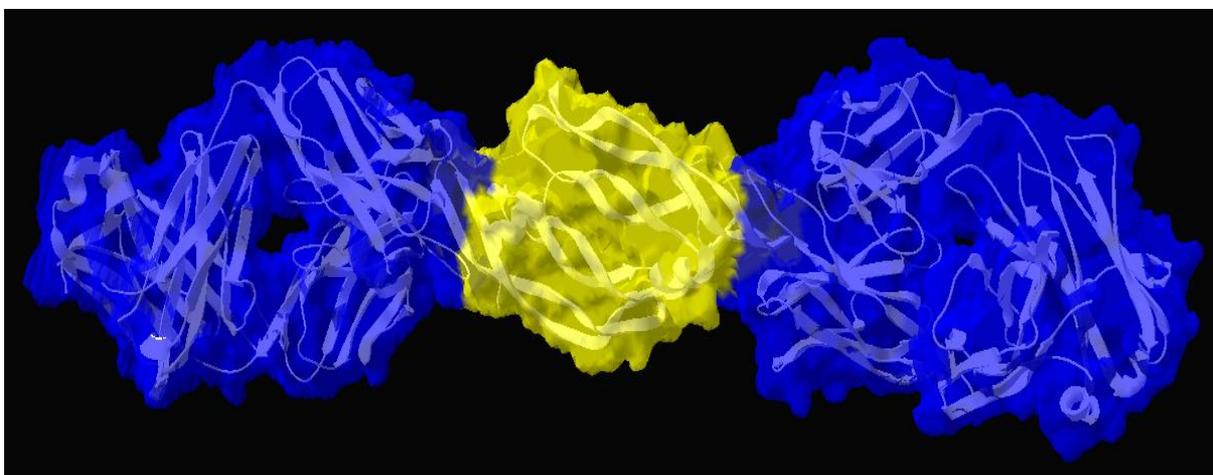


Figura 4 – Estrutura tridimensional do complexo Bevacizumabe/VEGF

Estrutura cristalografada obtida no PDB com código PDB:1BJ1 e visualizada no Swiss PDB Viewer. A molécula Bevacizumabe está representada pela cor azul e a molécula de VEGF está representada pela cor amarela.

Fonte: Elaborado pela autora, 2024.

A partir da visualização da estrutura 1BJ1 no *Swiss PDB Viewer*, foi possível verificar os aminoácidos de forma individual, observando e analisando quais eram os aminoácidos chaves para a interação com o VEGF. Alguns aminoácidos selecionados, são aminoácidos cuja sua exclusão diminui a ligação com o VEGF cerca

de 150 vezes (Muller et al., 1998). No entanto, outros aminoácidos-chaves da molécula de interesse (Bevacizumabe) foram selecionados para a predição, pois na visualização no *Swiss PDB Viewer*, os aminoácidos interagem e fazem ligação com o VEGF, sendo estes os aminoácidos mais acessíveis e externos da molécula do Bevacizumabe. Após a seleção dos aminoácidos-chaves, foi predito um peptídeo baseado na interação entre a molécula do Bevacizumabe e o VEGF. Este, é um peptídeo conformacional e sua sequência foi definida pela ordem dos aminoácidos, baseando-se na proximidade dos aminoácidos um com o outro, dando ênfase para a linearidade dos aminoácidos na molécula. Além disso, foram adicionados aminoácidos ligantes, os quais são importantes para manter a estrutura conformacional do peptídeo, mas não interagem diretamente com a molécula de interesse (De-Pieri et al., 2024). Como citado, o peptídeo foi predito com base nos aminoácidos da molécula Bevacizumabe, que fazem interação ou ligação com os aminoácidos presentes no VEGF.

Assim, obteve-se a predição do peptídeo nomeado BVZ, que recebeu este nome por mimetizar seu anticorpo monoclonal de origem, o Bevacizumabe. Este peptídeo apresenta uma sequência de 28 aminoácidos, com a seguinte sequência: Ser 105 – Gly 104 - Tyr 103 – Tyr 102 – His 101 – Pro 100 – Tyr 99 – Lys 98 – Glu 1 - Val 2 – Ser 25 – Gly 26 – Tyr 27 – Thr 28 – Phe 29 – Thr 30 – Asn 31 – Tyr 32 – Gly 33 – Met 34; Asn 35 – Trp 50 – Asn 52 – Thr 53 – Tyr 54 – Thr 55 – Gly 56 – Glu 57 (SGYYHPYKEVSGYTFTNYGMNWNTYTGE) (Figura 5).

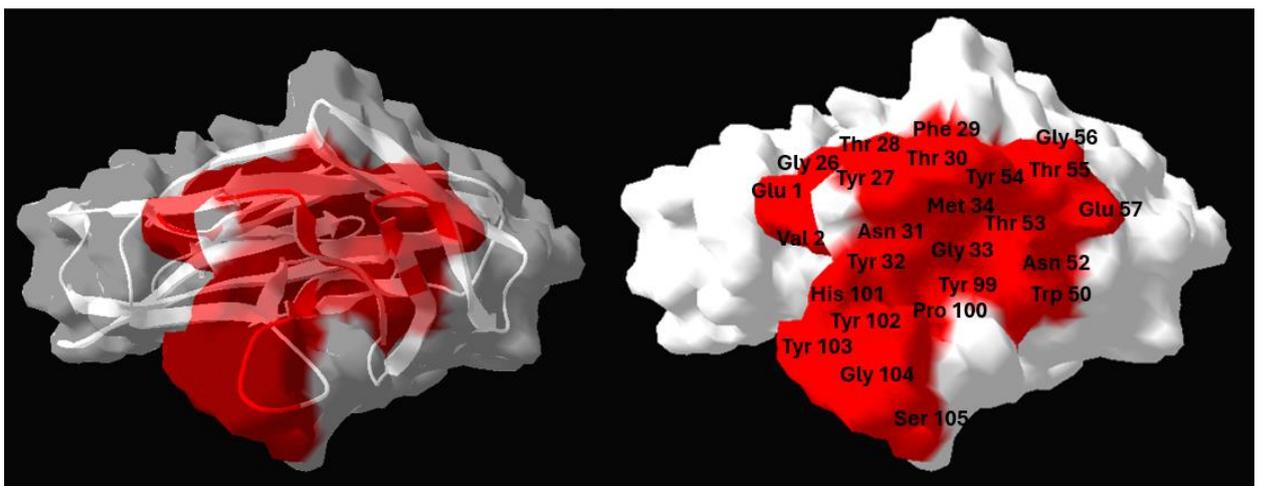


Figura 5– Localização do peptídeo BVZ na molécula de Bevacizumabe. Demonstração da estrutura tridimensional da molécula Bevacizumabe com suas fitas, dobramentos e sua superfície espacial. Em ambas as imagens os aminoácidos que foram selecionados para o peptídeo BVZ estão representados pela cor vermelha. Alguns aminoácidos que fazem parte da sequência do peptídeo não constam na figura, pois estes aminoácidos estão de forma mais interna na molécula. A figura representa apenas a parte frontal do peptídeo.

Fonte: Elaborado pela autora, 2024.

Através de outras ferramentas de bioinformática foram determinadas apenas as informações físico-químicas sobre o peptídeo predito. Para isso, foram utilizados os programas *PepCalc* e *Expasy*, para obter informações acerca da solubilidade, massa isotrópica, ponto isoelétrico, resíduos polares e resíduos hidrofóbicos (Tabela 1). Essas informações são fornecidas pelos sites com base na sequência de aminoácidos dos peptídeos.

Tabela 1: Características físico-químicas do peptídeo.

Parâmetros	BVZ
Resíduos Totais	28
Solubilidade em água	Pouca
Massa Isotrópica	3330,54 Da
Ponto Isoelétrico	5,38
Resíduos Hidrofílicos	8
Resíduos Hidrofóbicos	15

Tabela elaborada pela autora, 2024.

4.2 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR – MTT

Para o teste de MTT, células NIH3T3 e Caco-2 foram expostas aos tratamentos com o peptídeo BVZ, nas concentrações de: 160, 320, 500 e 820 µg/mL no período de 24 horas, 48 horas e 72 horas. O grupo controle de ambas as células, são células NIH3T3 ou Caco-2 que não receberam nenhum tipo de tratamento, foram expostas somente ao meio DMEM, ou seja, com 1% de antibiótico penicilina e estreptomicina (10 U.L/mL) e 10% de soro fetal bovino (SFB) (Figura 6).

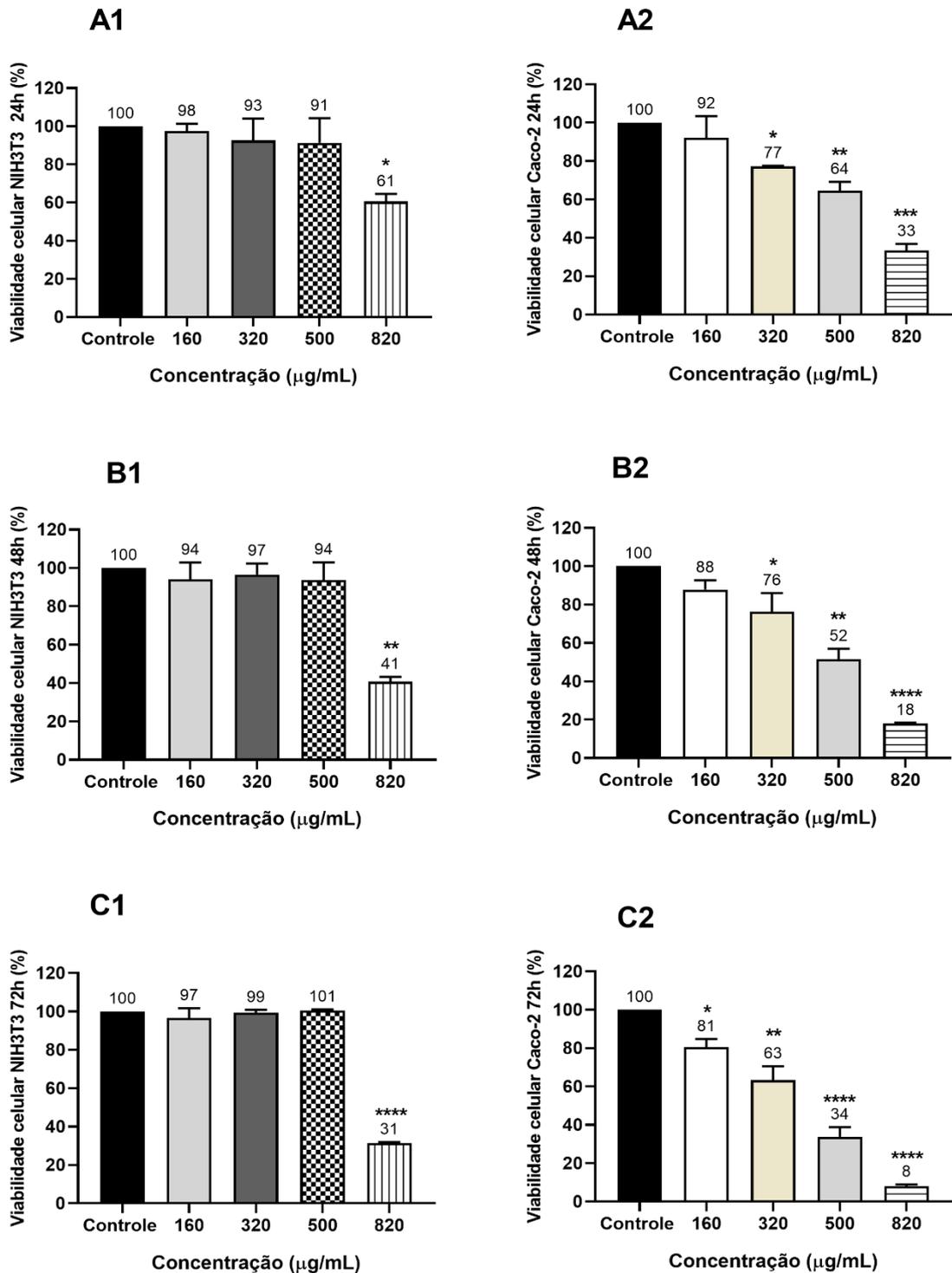


Figura 6- Citotoxicidade *in vitro* do peptídeo BVZ no período de 24, 48 e 72 horas. Citotoxicidade *in vitro* do peptídeo BVZ nas concentrações de 160, 320, 500 e 820 µg/mL em células saudáveis de fibroblastos (NIH3T3) (A1, B1 e C1) e câncer colorretal (Caco-2) (A2, B2, C2), no período de 24 horas (A1 e A2), 48 horas (B1 e B2) e 72 horas (C1 e C2). Dados expressos como média ± desvio padrão; diferenças significativas na viabilidade celular são mostradas *($p \leq 0,05$); **($p \leq 0,005$); ***($p \leq 0,0005$); ****($p \leq 0,0001$) quando comparados ao controle (One-Way ANOVA, seguida pelo teste de Dunnett como post hoc).

Fonte: Elaborado pela autora, 2024.

No período de 24 horas, as células NIH3T3 (A1), apresentaram uma diminuição significativa no percentual de viabilidade celular na concentração de 820 µg/mL (61%), quando comparadas ao controle (100%). Em células Caco-2 (A2), as concentrações de 320, 500 e 820 µg/mL, foram capazes de reduzir a viabilidade celular de forma significativa para 77%, 64% e 33% respectivamente, também em comparação ao controle.

No período de 48 horas as células NIH3T3 (B1), apresentaram uma diminuição significativa no percentual de viabilidade celular na concentração de 820 µg/mL (41%), quando comparadas ao controle, apresentando citotoxicidade. Em células Caco-2 (B2), as concentrações de 320, 500 e 820 µg/mL reduziram a viabilidade celular de forma significativa para 76%, 52% e 18% respectivamente, comparadas ao controle. No entanto, apenas as concentrações de 500 e 820 µg/mL, foram consideradas citotóxicas.

No período de 72 horas as células NIH3T3 (C1), apresentaram uma diminuição significativa no percentual de viabilidade celular na concentração de 820 µg/mL (31%), quando comparadas ao controle, também apresentando citotoxicidade. Em células Caco-2 (C2), as concentrações de 160, 320, 500 e 820 µg/mL reduziram a viabilidade celular de forma significativa para 81%, 63%, 34% e 8% respectivamente, comparadas ao controle. Porém, a única concentração que não foi capaz de causar citotoxicidade em células Caco-2, foi a concentração de 160 µg/mL. Todas as demais concentrações foram citotóxicas, causando uma diminuição do percentual de viabilidade celular inferior a 70%. De acordo com a ISO 10993-5:2009, para uma substância em estudo ser considerada citotóxica, o percentual de viabilidade celular precisa ser menor que 70%.

5. DISCUSSÃO

O câncer é um conjunto de doenças que representa um problema de saúde pública mundial, que em geral, caracteriza-se por um crescimento celular rápido, desordenado e incontrolável, muitas vezes acompanhado por uma agressividade significativa, podendo invadir tecidos adjacentes e levar a formação de metástase, que é a disseminação e colonização dessas células em um órgão distante (Opas, 2020; INCA, 2023).

À medida que as células tumorais se proliferam e crescem, o fornecimento de nutrientes e oxigênio ao tumor é viabilizado pela formação de novos vasos sanguíneos, um processo denominado angiogênese. Os principais mediadores deste processo são o VEGF e seu receptor VEGFR-2. O VEGF é um fator de crescimento angiogênico que desempenha um papel crucial no câncer, promovendo a proliferação de células cancerígenas e favorecendo os processos de invasão e intravasamento local na metástase, e é um fator angiogênico de grande predominância nos cânceres colorretal, favorecendo a formação de metástases (Roberts et al., 2013; Fares et al., 2020; Yang e Cao, 2022).

Atualmente existem terapias antiangiogênicas aprovadas pela FDA e ANVISA, como por exemplo o bevacizumabe. Conhecido por nome comercial AVASTIN®, é um exemplo de anticorpo monoclonal que atua sobre o VEGF, com o objetivo de bloquear a sua ligação com o VEGFR-2 impedindo a angiogênese, consequentemente melhorando o prognóstico de pacientes com câncer. No entanto, apresenta limitações de alto custo, difícil acesso e baixa estabilidade, fazendo necessário alternativas de tratamento (Monk et al., 2017).

As aplicações terapêuticas de peptídeos representam um campo de pesquisa de interesse crescente. Rossino et al. (2023) mencionou peptídeos como agentes terapêuticos já utilizados na clínica, com atividades antimicrobianas, antivirais e antineoplásicas. Três exemplos de fármacos peptídicos aprovados para uso clínico são: Zoladex® (Goserrelina) utilizado para tratar câncer de mama e próstata, Firmagon® (Degarelix) e Plenax® (Abarelix), ambos utilizados para tratar câncer de próstata. Estes fármacos possuem característica de boa estabilidade, importante na busca de alternativas farmacológicas, pois não necessitam de uma temperatura controlada (Wang et al., 2022).

Visto as limitações do anticorpo monoclonal Bevacizumabe e aplicações de fármacos peptídicos na oncologia, com o intuito de oferecer alternativas

economicamente mais viáveis, estáveis e eficazes para o tratamento para o câncer, foi desenvolvido um peptídeo antiangiogênico que possua os efeitos semelhantes ao do Bevacizumabe, com o objetivo de tornar a terapia antiangiogênica mais acessível, possivelmente substituindo o uso do anticorpo monoclonal em questão.

O peptídeo foi então predito baseado nos aminoácidos da proteína Bevacizumabe, que fazem interação ou ligação com os aminoácidos presentes no VEGF. Dessa forma, a escolha dos aminoácidos para compor a sequência de cada peptídeo predito foi baseado através de alguns critérios, como: a aproximação espacial entre esses resíduos; o tamanho final do peptídeo e dados da literatura que comprovem a ligação dos resíduos. Assim, para iniciar a predição dos peptídeos foi selecionado um modelo de estrutura cristalografada da interação entre Bevacizumabe/VEGF, que apresentava melhor resolução, entre as disponíveis no PDB. Segundo Santoyo (2012), estruturas que apresentam menores valores de angstrom (mais perto de zero), possuem uma melhor resolução. Neste caso, a estrutura escolhida para ser utilizada como base para a predição do peptídeo, está disponível no PDB com o seguinte código: 1BJ1 (Muller et al., 1998), com resolução de 2.40 Å.

No estudo realizado por Muller e colaboradores (1998), foi apresentada a estrutura cristalina do anticorpo monoclonal humanizado Bevcizumabe, ligado ao VEGF. Os autores induziram mutações com alanina em resíduos críticos do Bevacizumabe que se ligavam ao VEGF. Foi observado que ao modificar os aminoácidos Asn 31, Tyr 32, Trp 50, Asn 52 do anticorpo monoclonal, a sua ligação com VEGF diminui em cerca de 150 vezes, de forma isolada para cada aminoácido. Os aminoácidos Thr 30, Asn 31, Tyr 32, Gly 33, quando substituídos por alanina reduzem a interação com VEGF de 70-110 vezes. Outros aminoácidos que apresentam importantes interações são Tyr 99, Tyr 27, Phe 29, Met 34, Asn 35, que quando substituídos por alanina, reduzem cerca de 5 – 70 vezes a interação do anticorpo monoclonal com o VEGF (Muller et al., 1998). A redução da interação dos aminoácidos do Bevacizumabe com o VEGF, ocorre de forma isolada para cada aminoácido.

Todos os aminoácidos citados acima, estão presentes no peptídeo BVZ, desenvolvido neste presente trabalho e, além destes aminoácidos foram verificadas outras interações entre os aminoácidos do anticorpo Bevacizumabe e aminoácidos do VEGF, através do *Swiss PDB Viewer* e são: Ser 105 – Gly 104 - Tyr 103 – Tyr 102 –

His 101 – Pro 100 – Lys 98 – Glu 1 lig - Val 2 lig – Ser 25 – Gly 26 – Thr 28 – Asn 35 – Thr 53 – Tyr 54 – Thr 55 – Gly 56 – Glu 57. Glu 1 e Val 2 são aminoácidos ligantes, importantes para manter a integridade do peptídeo (Machado-de-Ávila et al., 2014).

Além disso, em nosso estudo foi realizado o teste de MTT, que é utilizado para avaliar a citotoxicidade celular. Este teste pode ser associado à proliferação celular, visto que o reagente é reduzido em mitocôndrias de células vivas formando cristais de formazan. Adan et al. (2016) e Zhao et al. (2018) propuseram que a redução da formação dos cristais de formazan, pode ser associado à redução da proliferação celular.

No estudo *in vitro* realizado por Zhao et al. (2018) células de câncer colorretal humano HT-29 expostas ao tratamento com bevacizumabe apresentaram diminuição na viabilidade celular, que foi associada a redução da proliferação celular, a partir da concentração de 5 mg/mL no período de 36 horas. Ademais, Miranda-Gonçalves et al. (2017) avaliaram em seu estudo *in vitro* a expressão e de VEGF em linhagens celulares de glioblastoma, câncer colorretal e câncer pulmonar. Os autores observaram que ambas as linhagens expressam VEGF. Após, foi analisada a citotoxicidade do bevacizumabe nas mesmas linhagens em um período de 72 horas, em diferentes concentrações. No estudo em questão, a concentração que mostrou toxicidade em todas as linhagens foi de 1,5 mg/mL. Além disso, o estudo mostrou que Bevacizumabe é internalizado nas células ligando-se ao VEGF intrínscito, ou seja, quando ainda não foi secretado, e apresentou redução na viabilidade celular, mostrando-se tóxico, podendo estar relacionado também a diminuição da proliferação celular, visto que o VEGF está ligado a proliferação, crescimento e migração celular.

Ambos os resultados citados acima diferenciam-se dos resultados do presente estudo, pois uma viabilidade celular inferior a 70% só foi observada em um período maior de exposição com maiores doses do medicamento. Vale ressaltar que de acordo com a ISO 10993-5:2009, para uma substância em estudo ser considerada citotóxica, o percentual de viabilidade celular precisa ser menor que 70%.

Em nosso estudo, há uma viabilidade celular inferior a 70% no período de 24 horas e 48 horas a partir da concentração de 500 µg/mL e, em 72 horas a partir da concentração de 320 µg/mL. Especula-se que os resultados com o peptídeo BVZ em menores concentrações tenham sido mais promissores comparados aos resultados anteriores, por ser uma molécula com baixo peso molecular (Liu et al., 2019). Esta

característica está relacionada com uma melhor capacidade de penetração tumoral, e consequente inibição da secreção de VEGF, prejudicando a proliferação celular. A penetração incompleta no tumor é uma limitação importante para a terapêutica macromolecular, como os anticorpos.

A taxa de penetração de uma macromolécula é altamente dependente do seu tamanho molecular e da afinidade de ligação às células tumorais e, além disso, peptídeos têm uma alta seletividade e especificidade, devido ao seu tamanho menor, reduzindo interações indesejadas (Liu et al., 2019). Além disso, especula-se que houve uma viabilidade celular reduzida com menores concentrações do peptídeo em 72 horas, pois a partir de 48 horas até 96 horas têm-se uma maior expressão de VEGF comparado a um período de 24 horas, então, uma menor concentração do peptídeo poderia ser suficiente para ligar-se ao VEGF e diminuir a viabilidade celular (Calviello et al., 2004; Sarkar et al., 2020).

Em células saudáveis de fibroblastos NIH3T3, em todos os períodos analisados apenas a concentração de 820 µg/mL apresentou-se citotóxica. No estudo de Spitzer et al. (2006), uma linhagem celular de células epiteliais pigmentares da retina humana ARPE19, expostas a uma concentração de 2,5 mg/mL de bevacizumabe foi capaz induzir uma diminuição do número de células e aumento de células mortas quando as células foram incubadas por mais de 24 horas. O número de células viáveis diminuiu em até 30% em comparação ao controle após 48 horas.

Acredita-se que por fibroblastos também expressarem VEGF (Shams et al., 2022), a maior concentração do peptídeo foi capaz de reduzir a viabilidade celular ou proliferação celular por ser uma molécula com baixo peso molecular, apresentando uma melhor penetração quando comparado com o Bevacizumabe. No entanto, as concentrações de 500 µg/mL em 24 e 48 horas; 350 µg/mL e 500 µg/mL em 72 horas, mostraram-se promissoras, pois apresentaram um potencial citotóxico em Caco-2 e não demonstram efeitos citotóxicos em NIH3T3 em nenhum período de teste. Além disso, menores concentrações diminuiriam a viabilidade celular em Caco-2, não diminuindo em NIH3T3, pois células tumorais podem expressar mais VEGF que células saudáveis, visto que células tumorais possuem um rápido crescimento e proliferação celular.

Os peptídeos atraem atenção no campo do diagnóstico e tratamento de tumores devido ao seu pequeno tamanho, alta afinidade, baixa imunogenicidade,

baixo custo e boa estabilidade, quando comparado com proteínas. Estas características permitem sua aplicação na terapia antitumoral, incluindo seu uso isolado como agentes terapêuticos direcionados (Wang et al., 2022), sendo esta uma possível forma de aplicação do peptídeo BVZ.

Apesar do presente estudo demonstrar resultados promissores na em uma determinada concentração do peptídeo, novos testes devem ser realizados nos próximos passos do estudo. Algumas limitações como o tipo de célula saudável utilizada no estudo deve ser levado em consideração, uma vez que células NIH3T3 não são ideais para teste de angiogênese, no entanto, por ausência de outros tipos celulares saudáveis em nosso banco de células, foi utilizado células NIH3T3. Outras linhagens celulares cancerígenas devem ser testadas, a fim de analisar o potencial do peptídeo em outros tipos de câncer. Teste como docking molecular deve ser realizado, para analisar a ligação do BVZ com a molécula de VEGF. O teste de ELISA e RT-PCR também devem ser realizados para analisar a expressão e dosar o VEGF, antes e após o tratamento com o peptídeo, para analisar se o BVZ minimizou a expressão e secreção de VEGF, já que este é um peptídeo que se liga a esta molécula. Ensaio de angiogênese como migração celular e proliferação celular devem ser realizados para avaliar o potencial antiangiogênico do BVZ. Além disso experimentos para avaliar o potencial do BVZ in vivo tornam-se interessantes para posteriores e possíveis usos clínicos.

6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados o BVZ mostrou citotoxicidade *in vitro* em células Caco-2 a partir da concentração de 500 µg/mL. Em células NIH3T3, nos três períodos de tratamento, a concentração de 820 µg/mL mostrou-se citotóxica.

Dessa forma, o peptídeo BVZ na concentração de 500 ug/mL deve ser submetido a outros testes *in vitro* para avaliar seu potencial anticâncer e possível uso clínico.

REFERÊNCIAS

- ABDULLA, M.H., SHAIK, A.S., MOHAMMED M., KHAYAL, K., TRAIKI, T.B., ZUBAIDI, A. M., AI-JOHANI, T., SHAKOOR Z, AI-OBEED OA. Expression of VEGF, EGF and HGF in early- and late-stage colorectal cancer. **Mol. Clin. Oncol.** v 15, p. 1-7, 2021.
- BAYAT, A. Science, medicine, and the future: Bioinformatics. **British Medical Journal.** v. 324, p. 1018-1022, 2002.
- BENDARDAF, R., EL-SERAFI, A., SYRJÄNEN, K., COLLAN, Y., PYRHÖNEN, S., The effect of vascular endothelial growth factor-1 expression on survival of advanced colorectal cancer patients. **Libyan J Med.**v. 1, p. 1-5, 2017.
- BIELENBERG, D. R., ZETTER, B. R. The Contribution of Angiogenesis to the Process of Metastasis. **Cancer J.** v. 4, p. 267-73, 2015.
- BHATTACHARYA, R., FAN, F., WANG, R., YE, X., XIA, L., BOULBES, D., & Ellis, L. M. Intracrine VEGF signalling mediates colorectal cancer cell migration and invasion. **British Journal of Cancer.** v. 6, p. 848–855, 2017.
- CAO, D., HOU, M., GUAN, Y. S., JIANG, M., YANG, Y., GOU, H. F. Expression of HIF-1alpha and VEGF in colorectal cancer: association with clinical outcomes and prognostic implications. **BMC Cancer.** v. 9, p. 1-9, 2009.
- CECI, C., ATZORI, M. G., LACAL, P. M., GRAZIANI, G. Role of VEGFs/VEGFR-1 Signaling and Its Inhibition in Modulating Tumor Invasion: Experimental Evidence in Different Metastatic Cancer Models. **Int. J. Mol. Sci.** v. 4, p. 1-53, 2020
- CALVIELLO, G., DI NICUOLO, F., GRAGNOLI, S., PICCIONI, E., SERINI, S., MAGGIANO, N., TRINGALI, G., NAVARRA, P., RANELLETTI, F.O., PALOZZA, P. n-3 PUFAs reduce VEGF expression in human colon cancer cells modulating the COX-2/PGE₂ induced ERK-1 and -2 and HIF-1 α induction pathway. **Carcinogenesis.** v. 25, p. 2303–2310, 2004
- DAKOWICZ, D., ZAJKOWSKA, M., MROCZKO, B. Relationship between VEGF Family Members, Their Receptors and Cell Death in the Neoplastic Transformation of Colorectal Cancer. **Int J Mol Sci.** v. 23, p. 1-13, 2022.
- DE-PIERI, E., ZACCARON, R. P., MEZZARI, C. G., CARDOSO, M. DE M., DE ROCH CASAGRANDE, L., SILVEIRA, P. C. L., & MACHADO-DE-ÁVILA, R. A. DAP1-2: a synthetic peptide targeting IL-1R1 receptor effectively suppresses IL-1 β in vitro. **Immunologic Research.** v. 72, p. 788–796, 2024.
- FARES, J., FARES, M. Y., KHACHFE, H.H., SALHAB, H., FARES, Y. Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. **Sig Transduct Target Ther.** v. 5, p. 21-17, 2020.
- GARCIA, J., HURWITZB, I. H., SANDLERB, B. A., MILESC, D., COLEMAND, R. L., DEURLOOE, R., CHINOT, L. O. Bevacizumab (Avastin®) in cancer treatment: A review of 15 years of clinical experience and future outlook. **Cancer Treatment Reviews.** v. 86, p. 1-18, 2020

GHALEHBANDI, S., YUZUGULEN, J., PRANJOL, M. Z. I., & POURGHOLAMI, M. H. The role of VEGF in cancer-induced angiogenesis and research progress of drugs targeting VEGF. **In European Journal of Pharmacology**. V. 949, 2023.

GUEX, N., PEITSCH, M. C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. **Electrophoresis**. v. 18, p. 2714-2723,1997.

HAMMER, G. D., STHEPHEN, J. M. **Fisiopatologia da Doença**. Porto Alegre. AMGH, 2016.

Inca, Instituto Nacional de Câncer, Ministério da Saúde. **Estimativa 2023: Incidência de Câncer no Brasil**. 2023. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2023.pdf>

Inca, Instituto Nacional de Câncer. **O que causa o câncer?** 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/causas-e-prevencao-do-cancer/o-que-causa-o-cancer>.

Inca, Instituto Nacional de Câncer. **Tratamento do Câncer**. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tratamento>

KONTOMANOLIS, N. E., KOUTRAS, A., SYLLAIOS, A., SCHIZAS, D., KALAGASIDOU, S., PAGKALOS, A., ALATZIDOU, D., KANTARI, P., NTOUNIS, T., FASOULAKIS, Z. Basic principles of molecular biology of cancer cell-Molecular cancer indicators. **J BUON**. v. 5, p. 1723-1734, 2021.

LUSCOMBE, N. M., GREENBAUM, D., GERSTEIN, M. What is bioinformatics? A proposed definition and overview of the field. **Methods Inf Med**. v. 40 p. 346-358, 2001.

LIU, Z. L., CHEN, H. H., ZHENG, L. L. Angiogenic signaling pathways and anti-angiogenic therapy for cancer. **Sig Transduct Target Ther**. v. 8, p. 1-39, 2023.

MACHADO-DE-ÁVILA, R. A., VELLOSO, M., OLIVEIRA, D., STRANSKY, S., FLOR-SÁ, A., SCHNEIDER, F. S., NESHICH, G., CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Induction of Neutralizing Antibodies against Mutalysin-II from Lachesis muta Snake Venom Elicited by a Conformational Bcell Epitope Predicted by Blue Star Sting Data Base. **Immunome Res**. v. 11, p. 1-6, 2014.

Machado-de-Ávila, RA. **Predição de epítomos descontínuos ou conformacionais em proteínas através da bioinformática estrutural**. 2011. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-Graduação em Bioinformática. Belo Horizonte; Universidade Federal de Minas Gerais, 2011.

MINHAJAT, R., HARJANTI, T., ISLAM, I. C., WINARTA, S., LIYADI, Y. N., BAMATRAF, N. P., & AMANUDDIN, R. Bevacizumab side effects and adverse clinical complications in colorectal cancer patients: review article. **Annals of Medicine & Surgery**. v. 85, p. 3931–3937, 2023.

MIRANDA-GONÇALVES, V., CARDOSO-CARNEIRO, D., VALBOM, I., CURY, F. P., SILVA, V. A., GRANJA, S., REIS, R. M., BALTAZAR, F., & MARTINHO, O.

Metabolic alterations underlying Bevacizumab therapy in glioblastoma cells. **Oncotarget**. v. 8, p 103657-103670, 2017.

MONK, B. J., LAMMERS, P. E., CARTWRIGHT, T., JACOBS, I. Barriers to the Access of Bevacizumab in Patients with Solid Tumors and the Potential Impact of Biosimilars: A Physician Survey. **Pharmaceuticals (Basel)**. v. 10, p. 1-11, 2017.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**. v. 65, p. 55-63, 1983.

MOTOFEI, I. G. Biology of cancer; from cellular and molecular mechanisms to developmental processes and adaptation. **Seminars in Cancer Biology**. v. 86, p. 600-615. 2022

MULLER, I. A., CHEN, I., CHRISTINGER, H. W., LI, B., CUNNINGHAM, B. C., LOWMAN, H. B., VOSS de M, A., LESS, S. VEGF and the Fab fragment of a humanized neutralizing antibody: Crystal structure of the complex at 2.4 Å resolution and mutational analysis of the interface. **Structure**. v. 6, p. 1153-1167, 1998.

Opas, Organização Pan-Americana de Saúde. **Câncer**. 2020. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/topicos/cancer>.

Opas, Organização Pan-Americana de Saúde. Dia Mundial do Câncer de 2023: **Elimine a lacuna no cuidado**. 2023. Disponível em: <https://www.paho.org/en/campaigns/world-cancer-day-2023-close-care-gap>.

PARK, C. K., DHARMASSIVAM, M., RICHARDSON, R. The Role of Extracellular Proteases in Tumor Progression and the Development of Innovative Metal Ion Chelators That Inhibit Their Activity. **Journal of Molecular Sciences**. v. 21, p 1-24, 2020.

ROBERTS, E., COSSIGN, A. F. D., QUAN, G. M .Y. The Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Metastatic Prostate Cancer to the Skeleton. **Prostate Cancer**. v. 2013, p. 1-8, 2013.

ROSEN, L. S., JACOBS, I. A., BURKES, R. L. Bevacizumab in Colorectal Cancer: Current Role in Treatment and the Potential of Biosimilars. **Target Oncol**. v. 12, p. 599-610, 2017.

ROSSINO, G., MARCHESE, E., GALLI, G., VERDE, F., FINIZIO, M., SERRA, M., LINCIANO, P., COLINA, S. Peptides as Therapeutic Agents: challenges and opportunities in the green transition era. **Molecules**. v. 20, p – 7165, 2023.

SARKAR, S., PENG, C. C., TUNG, Y. C. Comparison of VEGF-A secretion from tumor cells under cellular stresses in conventional monolayer culture and microfluidic three-dimensional spheroid models. **PLOS ONE**. v. 15, p. 1-21, 2020.

SCUSSEL, R., FEUSER, P. E., LUIZ, G. P., GALVANI, N. C., FAGUNDES, M. Í., GOLÇALVES DAL-BÓ A., HERMES DE ARAÚJO, P. H, COELHO, E. A. F, CHÁVEZ-OLÓRTEGUI C, MACHADO-DE-ÁVILA, R. A. Peptide-Integrated Superparamagnetic Nanoparticles for the Identification of Epitopes from SARS-

CoV-2 Spike and Nucleocapsid Proteins. **ACS Appl Nano Mater.** v. 5, p. 642-653, 2022.

SHAMS, F., MORAVVEJ, H., HOSSEINZADEH, S., MOSTAFAVI, E., BAYAT, H., KAZEMI, B., BANDEHPOUR, M., ROSTAMI, E., RAHIMPOUR, A., & MOOSAVIAN, H. Overexpression of VEGF in dermal fibroblast cells accelerates the angiogenesis and wound healing function: in vitro and in vivo studies. **Scientific Reports**, v. 12, 2022.

SHIBUYA, M. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies. **Genes and Cancer**. v. 12, p. 1097–1105, 2011.

SPITZER, M. S., WALLENFELS-THILO, B., SIERRA, A., YOERUEK, E., PETERS, S., HENKE-FAHLE, S., BARTZ-SCHMIDT, K. U., & SZURMAN, P. Antiproliferative and cytotoxic properties of bevacizumab on different ocular cells. **British Journal of Ophthalmology**, v. 10, p. 1316–1321, 2006.

Steiner, Bethina Trevisol. **Biotecnologia peptídica aplicada ao desenvolvimento de uma molécula com potencial analgésico em modelo de dor do câncer a partir da toxina $\text{pha1}\beta$ do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer***. 2019. 73 F. Dissertação (Mestrado) - Curso De Ciências Da Saúde, Unesc, Criciúma, 2019.

WANG, L., WANG, N., ZHANG, W., CHENG, X., YAN, Z., SHAO, G., WANG, X., WANG, R., & FU, C. Therapeutic peptides: current applications and future directions. In Signal Transduction and Targeted Therapy. **Springer Nature**. v. 7, 2022.

YANG, Y., CAO, Y. The impact of VEGF on cancer metastasis and systemic disease. **Seminars in Cancer Biology**. v. 86, p. 251-261. 2022

ZHANG, Q., WANG, P., KIM, Y., HASTE-ANDERSEN, P., BEAVER, J., BOURNE, P. E., BUI, H. H., BUUS, S., FRANKILD, S., GREENBAUM, J., LUND, O., LUNDEGAARD, C., NIELSEN, M., PONOMARENKO, J., SETTE, A., ZHU, Z., PETERS, B. Immune epitope database analysis resource (IEDB-AR). **Nucleic Acids Res.** v. 1, p. 513-518, 2008.

ZHAO, Z., XIA, G., LI, N., SU, R., CHEN, X., & ZHONG, L. Autophagy inhibition promotes bevacizumab-induced apoptosis and proliferation inhibition in colorectal cancer cells. **Journal of Cancer**, v. 9, p. 3407–3416, 2018.