

## Sistema VEGF, um Alvo Multi-terapêutico

de Freitas, Guilherme B. L.;\* Hoelz, Lucas V. B.; Aguiar, Daniel L. M.; de Alencastro, Ricardo B.; San Gil, Rosane A. S.

Rev. Virtual Quim., 2009, 1 (3), 257-269. Data de publicação na Web: 01 de Setembro de 2009  
<http://www.uff.br/rvq>

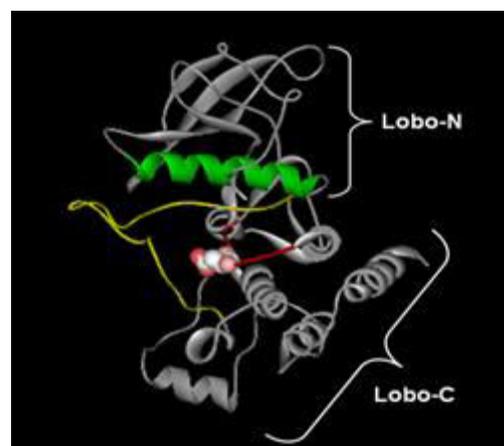
### VEGF System, a Multi Therapeutic Target

**Abstract :** The ability to modulate the vascular endothelial growth factor system (VEGF) is fundamental in the treatment of several pathophysiology and in the maintenance of homeostasis. Here, some strategies of control are discussed, *e.g.* extracellular actions, monoclonal antibodies and aptamers acting as inhibitors of VEGF and its receptors (VEGFR). In addition, in the cytoplasm one must include inhibitors of the tyrosine kinase domain.

**Keywords:** angiogenesis; VEGF; inhibitors; drugs; tyrosine kinase

### Resumo

A capacidade de modulação do sistema fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) é fundamental no tratamento de diversas fisiopatologias e na manutenção da homeostase. Desta forma, neste trabalho são discutidas algumas estratégias de controle, *e.g.* com ações extracelulares, anticorpos monoclonais e aptâmeros agem como inibidores de VEGF e seus respectivos receptores (VEGFR). Por outro lado, no ambiente citoplasmático, ocorre a prevalência da atividade de moléculas inibidoras do domínio tirosina-quinase.



**palavras-chave:** angiogênese; VEGF; inibidores; fármacos; tirosina-quinase

\* Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Pós-graduação em Química. Cidade Universitária, Centro de Tecnologia, Bloco A, Sala 609, 21949-900, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

✉ [gbarroso@iq.uff.br](mailto:gbarroso@iq.uff.br)

DOI: [10.5935/1984-6835.20090025](https://doi.org/10.5935/1984-6835.20090025)

## Sistema VEGF, um Alvo Multi-terapêutico

Guilherme B. L. De Freitas,<sup>a\*</sup> Lucas V. B. Hoelz,<sup>a</sup> Daniel L. M. Aguiar,<sup>b</sup> Ricardo B. De Alencastro,<sup>a</sup> Rosane A. S. San Gil<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Química, Laboratório de Modelagem Molecular (LabMMol), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Cidade Universitária, Centro de Tecnologia, Bloco A, Sala 609, 21949-900, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

<sup>b</sup> Instituto de Química, Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear (LabRMN), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Cidade Universitária, Centro de Tecnologia, Bloco A, Sala 605, 21949-900, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

\*[gbarroso@iq.ufrj.br](mailto:gbarroso@iq.ufrj.br)

*Recebido em 23 de junho de 2009; Aceito para publicação em 8 de Agosto de 2009*

1. Introdução
2. Compreensão da biologia angiogênica
3. Estrutura e ativação dos receptores VEGFR1 e VEGFR2
4. Estratégias antiangiogênicas via sistema VEGF
5. Inibidores VEGF-VEGFR aplicados para uso clínico
  - 5.1. Anticorpos monoclonais
  - 5.2. Inibidores das quinases em VEGFRs
6. Conclusões
7. Glossário

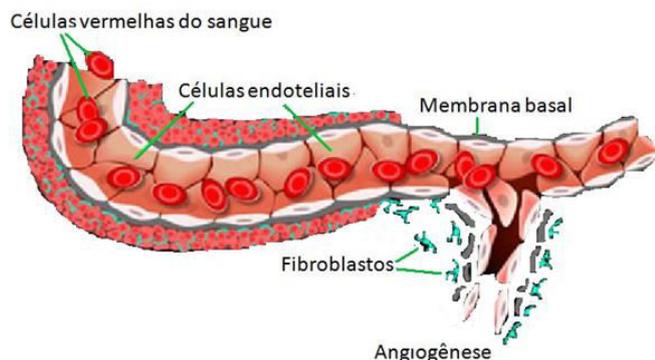
### 1. Introdução

Todos os tecidos do corpo humano demandam oxigênio e nutrientes, que são transportados através do sistema de vasos sanguíneos.<sup>1</sup> Para que este transporte seja adequado, é necessário um sistema vascular altamente desenvolvido. Esta eficiência é mantida por meio da angiogênese, processo que se caracteriza pelo crescimento de novos vasos sanguíneos a partir de uma rede vascular pré-existente. A angiogênese, de forma resumida, envolve processos de divisão celular, degradação seletiva da membrana basal e do ambiente da matriz extracelular seguida por migração de células endoteliais e, por fim, formação de uma nova estrutura tubular (Figura 1).<sup>2</sup> Além disso, a progressão de vários processos fisiopatológicos, *e.g.*, crescimento de tumores,

psoríase, artrite reumatóide e retinopatia diabética, está diretamente relacionada ao aumento anormal das redes vasculares.<sup>3-4</sup> Outras doenças, porém, como infartos cerebrais e cardíacos são causados por uma baixa suplementação de oxigênio, o que danifica esses tecidos, além de induzir a morte celular isquêmica.<sup>5</sup>

A angiogênese é regulada por um complexo sistema de controle com fatores pró- e antiangiogênicos. Em adultos ela é estritamente controlada por um processo fisiológico denominado “balanço angiogênico”, *i.e.*, um equilíbrio entre os sinais estimulativos e inibitórios do crescimento dos vasos sanguíneos. Em circunstâncias normais, a formação de novos vasos sanguíneos ocorre durante a cicatrização, a regeneração do organismo e, no

sistema reprodutivo feminino, durante a ovulação e formação da placenta.<sup>6</sup>



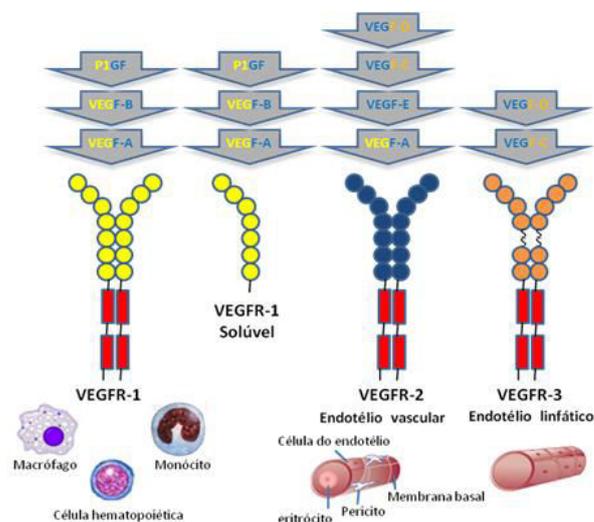
**Figura 1.** Representação do processo angiogênico, destacando-se os principais integrantes do endotélio vascular [adaptado da ref. 7, Copyright © 2009 Genentech USA, Inc.]

## 2. Compreensão da biologia angiogênica

Em 1983, Donald Senger e um grupo de pesquisadores do Hospital Israelita de Boston liderado por Harold Dvorak estudavam as propriedades fisiológicas da metástase (que se caracteriza como um tumor secundário originado pela disseminação de células cancerosas procedentes de um primeiro tumor), quando identificaram uma proteína correlacionada com células tumorais, a qual foi nomeada de fator vascular de permeabilidade (VPF, em inglês: *Vascular Permeability Factor*). Em seguida, outra proteína foi isolada e denominada fator de crescimento vascular endotelial específico de células. A clonagem molecular dos genes dessas “duas proteínas”, *a posteriori* comprovou se tratarem da mesma estrutura, que foi nomeada, finalmente, como fator de crescimento vascular endotelial (VEGF, em inglês: *Vascular endothelial growth factor*).<sup>8</sup>

O VEGF é um dímero protéico, ou seja formado pela interação de duas proteínas, sinalizador com ação autócrina e parácrina que ativa receptores transmembranares expressos, principalmente, em células endoteliais. Esta proteína se caracteriza como um dos membros da superfamília de fatores de crescimento que possuem um nó de cistina (em inglês: *cystine knot growth superfamily of signaling proteins*), formado por oito resíduos de cisteínas ligados por pontes dissulfeto.<sup>9</sup> Em humanos, foram identificados seis membros: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E e P1GF (em inglês: *Placental Growth Factor*), tendo VEGF-A um papel mais ativo no processo angiogênico.

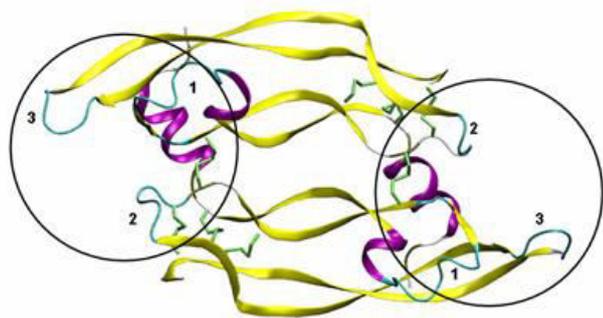
Cada um dos fatores acima listados pode ativar um ou mais dos receptores conhecidos, VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3, além do domínio extracelular do VEGFR-1 (Flt-1, em inglês: *fms like tyrosine-kinase receptor-1*), o qual é expresso como uma proteína solúvel, conforme mostrado na Figura 2. O VEGFR-1 localiza-se na superfície de células hematopoiéticas do tecido, macrófagos e monócitos, bem como endotélio vascular, já o VEGFR-2 (KDR, em inglês: *kinase domain receptor; Flk-1*) por sua vez, é encontrado em ambos os endotélios vascular e linfático, enquanto o VEGFR-3 se localiza, predominantemente, no endotélio linfático.<sup>2,10</sup>



**Figura 2.** Especificidade dos VEGFs por seus receptores e a identificação dos tecidos que expressam os respectivos VEGFRs. As cores amarelo, azul e branco, correlacionam os VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3 com seus ligantes. Os ligantes coloridos por duas cores interagem com mais de um tipo de receptor [adaptado da Ref. 11, Copyright © 2009, com permissão da Elsevier]

A estrutura tridimensional do domínio de ligação do VEGF no seu receptor (VEGF<sub>resíduos 8-109</sub>) foi determinada (PDB ID: 1VPF) e refinada até uma resolução de 1,93Å (PDB ID: 2VPF),<sup>12</sup> conforme indicado na Figura 3, e mostrou razoável semelhança com os fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGF) (PDB ID: 1PDG). Estudos de mutação mostraram que os pólos do homodímero do VEGF (forma ativa) governam as interações com o receptor VEGFR-2.<sup>12</sup> A estrutura cristalográfica do complexo formado por VEGF e VEGFR-1 (Flt-1) também mostrou que os pólos do VEGF são responsáveis pelas principais interações com este

receptor, e que estas interações são predominantemente de natureza hidrofóbica.<sup>13-14</sup>



**Figura 3.** Estrutura cristalográfica do VEGF (PDB ID: 1VPF).<sup>15</sup> As ligações dissulfeto estão em verde. Os dois pólos são identificados por circunferências. Cada pólo inclui as alças -1 e -3 de um mesmo monômero, a alça-2 do outro monômero, resíduos extremos, e alguns resíduos das regiões terminais [adaptado da Ref. 16, com permissão do autor]

### 3. Estrutura e ativação dos receptores VEGFR1 e VEGFR2

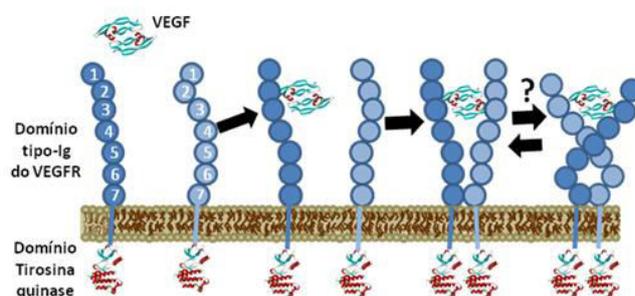
Os receptores VEGFR1 e VEGFR2 são proteínas de membrana constituídas em humanos por 1.338 e 1.356 resíduos de aminoácidos, respectivamente, em que as estruturas podem ser divididas em 4 regiões ao longo da estrutura protéica: um domínio extracelular de ligação do ligante (formado por 7 domínios do tipo imunoglobulina), um domínio transmembranar (formado por uma alfa-hélice com cerca de 20 resíduos de aminoácidos), seguido por uma região flexível justa-membrana ligada a um domínio tirosina-quinase e, por fim, uma cadeia carbóxi-terminal (Figura 4).<sup>17-18</sup>

A região justa-membrana recebe este nome devido sua localização entre o domínio quinase e o transmembranar. Sua importância na ativação dos receptores VEGFRs e na subsequente cascata de sinalização ainda permanece sem respostas e merece maiores estudos. A grande flexibilidade pode indicar uma ferramenta de manutenção no processo intracelular de dimerização e transfosforilação.

Os VEGFRs têm alta identidade entre si, principalmente nos domínios extracelular e quinase, e são intimamente relacionados com a família de receptores dos fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGFR), incluindo o receptor 1 do fator estimulador de colônias (CSF-1 ou c-Fms), receptores de células estaminais (SCF, c-Kit), e a classe 3 de receptores tirosina-quinases (Flt3). No entanto, o domínio extracelular dos VEGFRs contém 7 domínios

do tipo imunoglobulina, enquanto os PDGFRs contêm apenas 5.<sup>5,18-19</sup>

Existe o consenso de que a ativação dos receptores VEGFR está envolvida no controle da formação de vasos sanguíneos e linfáticos em mamíferos, assim como nos estágios iniciais da embriogênese.<sup>19-20</sup> Os VEGFRs são receptores do tipo tirosina-quinase ativados através de dimerização induzida por ligantes (Figura 4). No estudo de Ruch e colaboradores<sup>21</sup> foi demonstrado que o domínio monomérico extracelular do receptor VEGFR-2 tem estrutura flexível, fato este que podemos correlacionar à mesma região do VEGFR-1, devido à natureza homóloga e de alta identidade entre estas biomacromoléculas. A ligação do VEGF nos domínios membrana-distal do tipo-imunoglobulina, representados pelos números 1, 2 e 3 na Figura 4, causa a dimerização do receptor e promove adicionalmente a interação entre os monômeros do receptor através do domínio 7 do tipo-imunoglobulina. Por este mecanismo, a dimerização do receptor VEGFR-2 induzida pelo ligante consegue se comunicar através da membrana, ativando a região intracelular das enzimas tirosina-quinases (Figura 4).<sup>21</sup>



**Figura 4.** Dimerização da região membrana-proximal promovida pela interação VEGF-VEGFR. Modelos propostos para investigação da sinalização intracelular após a ligação do VEGF com o VEGFR [adaptado da Ref. 21, Copyright © 2009, com permissão da Nature Publishing Group]

Alguns estudos afirmam que os domínios extracelulares do VEGFR-2 são muito flexíveis quando não estão ligados ao VEGF, e não apresentariam, portanto, uma única conformação. A associação, induzida pelo VEGF, dos dois domínios extracelulares do VEGFR-2, é estabilizada por interações homotípicas (interação ocorrida entre indivíduos de mesma espécie) dos domínios membrana-distal (domínios 1, 2 e 3) e membrana-proximal (domínios 4, 5, 6 e 7) das regiões do tipo imunoglobulina. Em todo o comprimento do receptor, o arranjo rígido dos dois monômeros é necessário para o exato

posicionamento dos domínios quinases, induzindo a conformação dos sítios ativos na quinase para um estado ativado.<sup>21</sup>

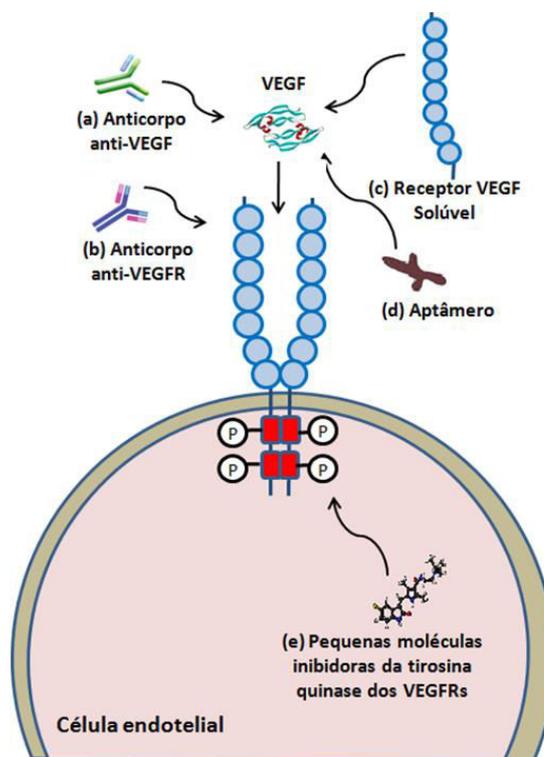
Resumidamente, a transdução de sinais dos receptores do tipo tirosina-quinase tem várias etapas bioquímicas: (1) interação do ligante com receptor; (2) dimerização do receptor; (3) ativação da porção tirosina-quinase; (4) auto-fosforilação do receptor; (5) ligação e ativação de proteínas adaptadoras aos sítios de auto-fosforilação. Sabe-se atualmente que os receptores VEGFR seguem essencialmente o processo citado acima, o que possibilita intervenções terapêuticas para controlar o processo fisiopatológico da angiogênese.<sup>22</sup>

#### 4. Estratégias antiangiogênicas via sistema VEGF

A inibição da angiogênese é um processo complexo que inclui um grande número de alvos potenciais. Esses alvos incluem os fatores de crescimento e os receptores do tipo tirosina-quinase (nos domínios extra e intra-celulares), bem como receptores transmembranares envolvidos na adesão de células ligadas ao citoesqueleto, as integrinas, e a produção de metaloproteases de matriz que são resultantes da ativação de células endoteliais e que permitem a divisão celular para o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos.<sup>23</sup> No entanto, diversos estudos reconhecem o sistema VEGF como um regulador chave da angiogênese, que atua na iniciação e na regulação de múltiplas respostas celulares, além de sua especificidade pelo endotélio vascular.<sup>24</sup>

Este fato levou ao desenvolvimento de vários agentes terapêuticos que atuam nesta sinalização, dentre os quais podemos destacar os anticorpos neutralizantes para VEGF ou VEGFRs, que são receptores solúveis ou híbridos para VEGF, também conhecidos como “armadilha-VEGF” (em inglês: VEGF-trap). Estes anticorpos são construídos com base nos domínios extracelulares 2 e 3 presentes nos receptores VEGFR-1 e VEGFR-2, respectivamente, fundidos com o fragmento Fc (parte estrutural do anticorpo responsável pelo reconhecimento do alvo molecular) de um anticorpo. Outra estratégia altamente promissora é a dos inibidores tirosina-quinase (TKIs) com seletividade para VEGFRs. Estes agentes, por meio de uma interação antagonista no sítio catalítico do receptor, inibem a porção tirosina-quinase, o que impede a fosforilação de proteínas por transferência de um grupo fosforila do adenosina trifosfato (ATP) e, em casos excepcionais, de

guanosina trifosfato (GTP), para os resíduos de tirosina. Com isso, há um impedimento do processo de transfosforilação entre os homodímeros e, conseqüentemente, ocorre uma inibição de toda a cascata de sinalização do sistema VEGF (Figura 5).<sup>25-26</sup>



**Figura 5.** Diferentes estratégias de inibição da sinalização do VEGF: (a) anticorpos monoclonais com ação direta sobre VEGF-A ou (b) sobre os receptores de VEGF, (c) receptores quiméricos solúveis, (d) aptâmeros e (e) inibidores de VEGF

[adaptado da Ref. 27, Copyright © 2009, com permissão da Nature Publishing Group]

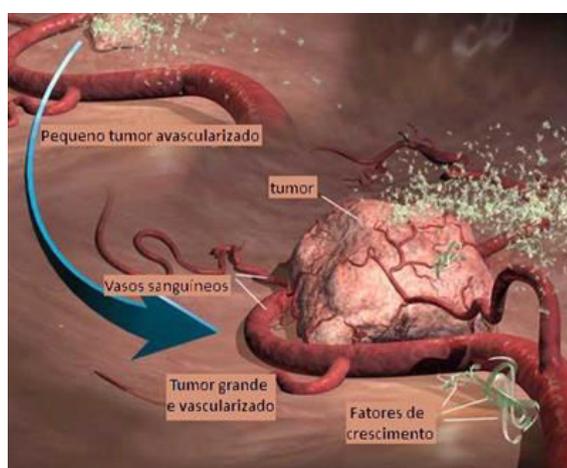
### 5. Inibidores VEGF-VEGFR de uso clínico

#### 5.1. Anticorpos monoclonais

Os anticorpos monoclonais são imunoglobulinas altamente específicas que se ligam e atuam sobre biomoléculas envolvidas em determinadas patologias, como por exemplo o câncer. Ao identificar e se ligar a moléculas-alvo, o anticorpo monoclonal altera sua ação, o que inibe o processo fisiopatológico por ela regulado. Devido a sua elevada especificidade, os anticorpos monoclonais reduzem os efeitos colaterais decorrentes da ação tóxica sobre células normais.<sup>28</sup>

A maior parte dos tumores sólidos gerados na mama, pulmões, cólon e reto, dentre outros órgãos, expressam altos níveis de VEGF-A em comparação com os tecidos normais. De acordo com Hanahan e colaboradores, o alto nível de VEGF-A está relacionado ao estresse hipóxico e a ativação de

oncogenes durante o crescimento do tumor.<sup>3</sup> Para um crescimento em torno de 1 a 2 mm de diâmetro, o tumor necessita de um suplemento de sangue independente, que é adquirido pela expressão de fatores de crescimento (incluindo os VEGFs) que induzem a angiogênese. Este processo continua mesmo com o câncer em seu estágio avançado. Com isso, ocorre a neovascularização direcionada para o tumor sólido, com subsequente crescimento e metástase (Figura 6). A neutralização do VEGF-A humano por anticorpos diminui consideravelmente o crescimento de tumores humanos transplantados em camundongos, o que sugere o bloqueio do VEGF-A como alvo terapêutico na supressão de tumores sólidos em humanos.



**Figura 6.** Demonstração do crescimento e vascularização do tumor sólido através do sistema VEGF [adaptado da ref. 30, Copyright © 2009 Genentech USA, Inc.]

O bevacizumabe<sup>29</sup> (Avastatin®; Genentech), um anticorpo monoclonal atualmente em testes clínicos de fase-III, melhorou significativamente o tempo de sobrevivência de pacientes com tumores diagnosticados precocemente, bem como em estágios avançados da doença em indivíduos com câncer colorretal.<sup>31</sup> Além disso, este medicamento foi aprovado pela agência americana *Food and Drug Administration* (FDA) para uso, concomitante com quimioterapia, no tratamento do estágio III e IV de câncer colorretal. O bevacizumabe foi também aprovado para o tratamento de câncer de pulmão de células não pequenas (CPNPC) e não escamosas.<sup>32-33</sup> O CPNPC corresponde a um grupo heterogêneo composto de três tipos histológicos principais e distintos: carcinoma epidermóide, adenocarcinoma e carcinoma de grandes células, e ocorre em cerca de 75% dos pacientes diagnosticados com câncer de pulmão.<sup>34</sup> A principal razão para este fármaco não ter sido ainda

utilizado no tratamento do câncer de pulmão do tipo escamoso é o risco severo de trombozes e hemorragias, o que exige mais estudos.<sup>35</sup>

A degeneração macular relacionada à idade (DMRI) é a principal causa de vários casos de perda de visão em pacientes idosos no mundo, e pode ser classificada de duas formas: neovascular (ou “molhada”) e não-neovascular (ou “seca”). A forma DMRI neovascular envolve neovascularização anormal sob a mácula, parte central da retina, levando à perda da visão.<sup>36</sup>

Interações entre proteínas e oligonucleotídeos, reconhecidas como onnipresente no mundo biológico, tem sido empregadas com sucesso no desenvolvimento de uma nova classe terapêutica, os aptâmeros. Aptâmeros são atualmente desenvolvidos como agentes para uma extensa variedade de aplicações, incluindo diagnósticos, terapias e biossensores. A ampla utilidade se justifica pela sua versatilidade, com alta seletividade e sensibilidade, e sua fácil produção. Uma comercial síntese de aptâmeros em grande escala é bastante simples e apresenta satisfatório custo-benefício; ao contrário, anticorpos necessitam um processo de produção complexo usando um sistema de expressão em células (eucariótica ou procariótica).<sup>37-38</sup>

O sal de sódio do pegaptanibe<sup>39</sup> (Macugen®, Eyetech Pharmaceuticals/Pfizer) é um aptâmero de ácido ribonucléico, com 28 bases nitrogenadas ligadas por covalência a duas moléculas de polietileno glicosilado de 20 kDa. Aptâmeros são ligantes olinucleotídeos que são selecionados para interagir com alta afinidade a específicos alvos moleculares.<sup>37-38</sup>

O pegaptanibe interage e bloqueia especificamente a atividade da isoforma VEGF-A165. Esta seletividade provém da conformação do aptâmero. Com o objetivo de prolongar a atividade farmacocinética intra-ocular do aptâmero, a estrutura de seu carboidrato foi modificada para prevenir a degradação por enzimas endógenas como endonucleases e exonucleases, e uma molécula de polietileno glicosilado foi adicionada para aumentar a meia-vida do fármaco no vítreo. O bloqueio da interação da isoforma VEGF-A165 com seu receptor na célula endotelial pelo pegaptanibe inibe a permeabilidade vascular e a neovascularização retiniana.<sup>36,40</sup> Trata-se, portanto, de uma terapia anti-VEGF que foi recentemente avaliada no tratamento da DMRI neovascular por meio de vários ensaios clínicos multi-cêntricos (ensaios clínicos realizados de acordo com um único protocolo, em mais de um centro de ensaios e, conseqüentemente, por dois ou mais investigadores). Frente aos resultados

apresentados após 1 ano de investigação, o pegaptanibe passou a ser a primeira medicação antiangiogênica para uso intravítreo destinada ao tratamento da DMRI neovascular aprovada pelo FDA.<sup>41</sup> Entretanto, Gragoudas e colaboradores citam alguns trabalhos que relatam uma redução de perda de visão em aproximadamente 50% dos pacientes tratados por um período de um ano com pegaptanibe, com uma estabilização no tratamento a partir do segundo ano de uso da terapia.<sup>42</sup>

A partir da busca por uma melhor terapia para o DMRI, surgiu o ranibizumabe<sup>43</sup> (Lucentis®; Genentech), um fragmento do anticorpo monoclonal humanizado (ver glossário), originalmente conhecido como rhuFabV2, que se liga ao fator de crescimento vascular endotelial, e previne desta forma a interação deste fator com seus receptores VEGFR-1 e VEGFR-2 localizados na superfície das células endoteliais. Isso causa redução na proliferação dessas células, além de também reduzir o desvio vascular e a formação de novos vasos sanguíneos. O ranibizumabe foi aprovado pelo FDA em junho de 2006 para o tratamento de pacientes com DMRI neovascular, tornando-se um membro da classe de medicamentos de ação terapêutica anti-VEGF para uso intra-ocular.<sup>44-46</sup>

Recentemente, Stone descreveu a eficácia do ranibizumabe como milagrosa, por ser o primeiro tratamento para DMRI que melhora a visão.<sup>47</sup> Em dois ensaios de controle randômico, este fármaco não só preveniu a perda da visão como também aumentou significativamente a perspicácia visual (90% dos pacientes tratados), ou seja, superou os resultados obtidos pelo pegaptanibe.<sup>48-49</sup> De acordo com Moura, este resultado cria uma perspectiva de tratamento de DMRI para aproximadamente 30 milhões de pacientes em todo o mundo.<sup>50</sup> Além disso este número pode ser aumentado consideravelmente pelo uso potencial deste medicamento no tratamento do edema macular diabético, para o qual os testes de fase II já foram iniciados.<sup>44</sup>

Em 2006, Spaide e colaboradores avaliaram o uso de bevacizumabe intravítreo em 266 pacientes com quadro de degeneração macular relacionada à idade. Neste experimento a utilização do bevacizumabe aumentou a perspicácia visual e espessura macular, sem demonstrar efeitos colaterais sistêmicos e oculares significativos nos pacientes.<sup>51</sup> Estes resultados confirmam a importância da utilização de anticorpos, os quais conseguem cada vez mais conferir especificidade e eficácia, auxiliando no domínio da modulação do sistema VEGF para o tratamento de doenças relacionadas à neovascularização.

## 5.2. Inibidores de quinases em VEGFRs

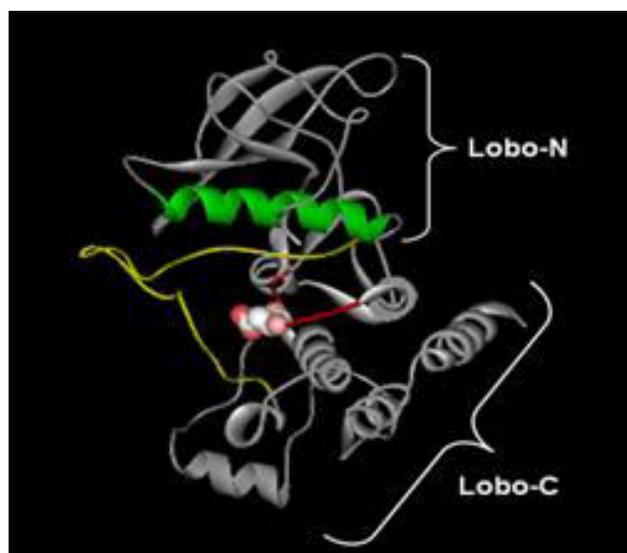
Além dos anticorpos monoclonais, a classe de inibidores de quinase tem sido usada com grande êxito na regulação do processo angiogênico. Diferentemente dos anticorpos monoclonais, que são administrados pela via intravenosa, os inibidores dos receptores do tipo tirosina-quinase podem ser administrados por via oral, o que garante maior adesão do paciente ao tratamento. Esses inibidores competem pelo sítio de ligação do ATP no domínio catalítico de várias tirosina-quinases oncogênicas.

As proteínas quinases constituem a maior família de proteínas em eucariotos. Estas estruturas desempenham um controle chave de comunicação, regulação e transdução de sinais celulares. O mecanismo regulador inclui vários fenômenos que vão desde alterações químicas e estruturais da proteína até a função transcricional. Por esse motivo, um detalhado entendimento sobre o mecanismo de controle das proteínas quinases tornou-se foco de interesse de muitas pesquisas.<sup>31</sup>

O domínio quinase dos VEGFRs, assim como nas demais proteínas quinases, é formado por dois lobos: lobo-C e lobo-N (Figura 7). O sítio ativo se localiza na cavidade entre estes dois lobos, e inclui um resíduo de aspartato localizado no *loop* catalítico da enzima. Este resíduo tem participação crucial na estabilização do estado de transição, durante a transferência do fosfato da molécula de ATP para resíduos específicos de tirosina, com subsequente transfosforilação entre os homodímeros.<sup>52</sup> Outras regiões importantes na regulação da forma ativa e inativa da enzima, assim como na estabilização das conformações obtidas nestes estados são a  $\alpha$ -hélice e o segmento de ativação (Figura 7). Eles evidenciam as mudanças conformacionais induzidas pela dimerização dos receptores VEGF após a interação de ligantes nos domínios extracelulares, tendo este movimento a capacidade de aferir “proteção” ou “desproteção” do sítio catalítico frente a aproximação do ATP.

Existem dois tipos gerais de mudanças conformacionais associados às proteínas quinases. O primeiro envolve a interconversão do estado ativo, momento em que a proteína desencadeia suas atividades biológicas, usualmente ela encontra-se interagindo com um ligante (agonista) e estado inativo, que ocorre quando nenhuma atividade é observada. Geralmente uma biomacromolécula, como por exemplo uma enzima, encontra-se em um estado inativo (inerte), o qual só será alterado quando sofrer algum tipo de estímulo frequentemente ocasionado pela interação com um ligante. A estabilidade funcional na inativação e ativação implica

em mudanças conformacionais da posição da  $\alpha$ -hélice no lobo-N e da conformação do segmento de ativação no lobo-C. O segundo tipo de mudança conformacional ocorre no estado ativo, com os dois movimentando-se um de encontro ao outro, de forma a abrir e fechar a cavidade enzimática e regular o ciclo catalítico.<sup>54</sup> No trabalho de Harris e colaboradores,<sup>55</sup> a estrutura do domínio quinase do receptor VEGFR-2 foi determinada por difração de raios X (PDB ID: 1y6a), o que foi essencial para determinação dos resíduos e regiões farmacofóricas envolvidos na interação e estabilização do ligante no sítio catalítico.<sup>55</sup> Devido ao alto grau de identidade entre VEGFR-1 e o VEGFR-2, acredita-se que a conformação tridimensional do VEGFR-1, o qual até o momento não tem sua estrutura determinada experimentalmente, seja semelhante a do subtipo de receptor 2.



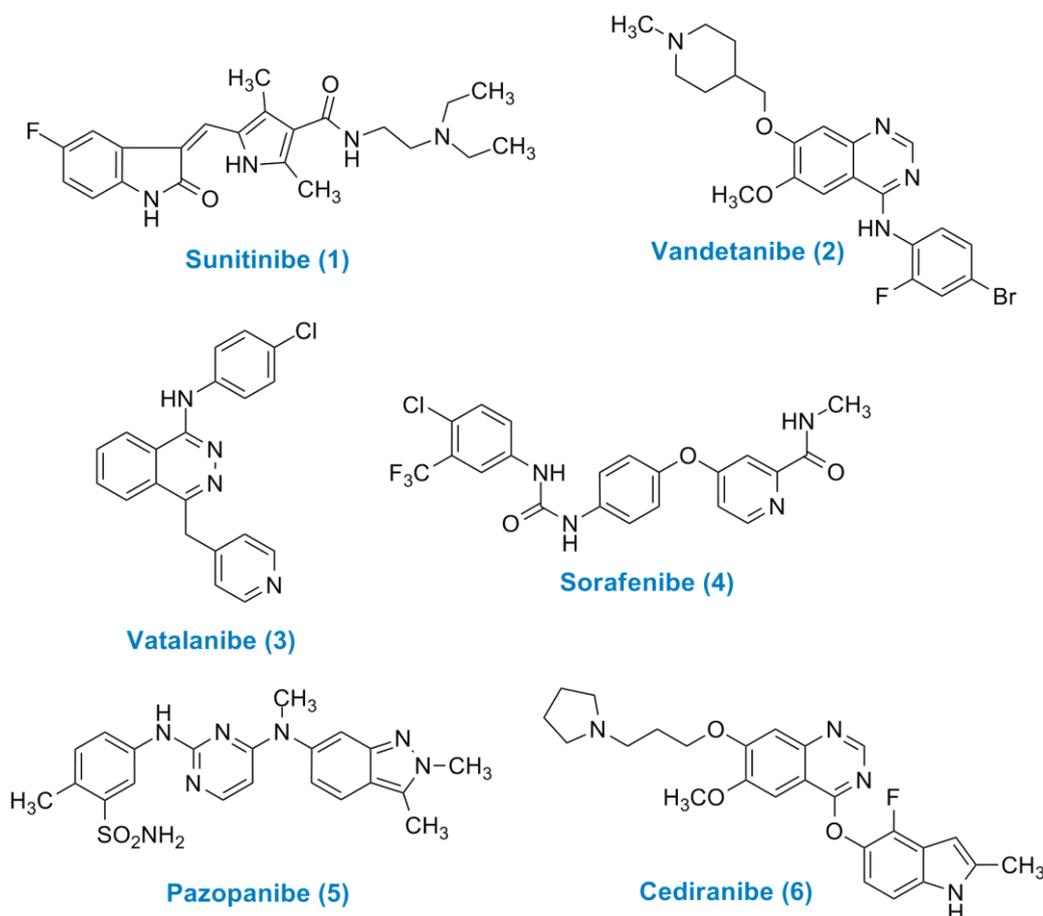
**Figura 7.** Representação estrutural do domínio tirosina-quinase do receptor VEGFR-2 (adaptado de PDB ID: 2oh4).<sup>53</sup> Em destaque estão a  $\alpha$ -hélice (verde), o segmento de ativação (amarelo) e o sítio catalítico (vermelho) com a demonstração do resíduo de aspartato

Muitos dos inibidores de quinase (ver glossário) dos receptores de VEGF sob investigação inibem múltiplas quinases não envolvidas na angiogênese, o que resulta em diversos efeitos colaterais. Para contornar este problema novos inibidores estão sendo desenvolvidos visando o aumento da seletividade, e portanto a minimização desses efeitos indesejáveis. Atualmente, alguns inibidores moleculares ativos oralmente para os receptores VEGFR-1 e 2 (Figura 8) estão sendo integrados ao mercado farmacêutico: sunitinibe<sup>56</sup> (SU 11248, Sutent),<sup>57</sup> vandetanibe<sup>58</sup> (Zactima, ZD6474),<sup>59</sup>

vatalanibe<sup>60</sup> (PTK787/ZK 222584 – PTK/ZK),<sup>61</sup> sorafenibe<sup>62</sup> (Bay 43-9006, Nexavar), pazopanibe<sup>63</sup> (GW-786034)<sup>64</sup> e cediranibe<sup>65</sup> (AZD-2171).<sup>66</sup>

O sunitinibe, também conhecido como SU11248 ou sutent (Figura 8, 1 - Pfizer) é uma molécula desenvolvida racionalmente, que inibe a atividade quinase de membros da família de receptores tirosina-quinase como o VEGFR-1 e 2, PDGFR-a e PDGFR-b, c-Kit além das quinases FLT-3 e RET. A inibição desses receptores bloqueia a transdução de sinais e, com isso, afeta muitos dos processos envolvidos no crescimento, progressão, metástase e angiogênese de tumores. Estudos pré-clínicos com o emprego de várias linhas de células de tumores mostraram que os efeitos antiangiogênicos do sunitinibe são mediados por VEGFR e PDGFR-b, e que este fármaco também tem efeito antitumoral direto em doenças correlacionadas com as vias de sinalização que envolvem KIT (conhecido como um receptor de citocina expressado principalmente na superfície de células do tecido hematopoiético) e Flt3.<sup>67-68</sup> Em janeiro de 2006, o sunitinibe foi aprovado pela FDA para o tratamento de carcinoma avançado de células renais e para casos de resistência e intolerância ao fármaco imatinibe (considerado o primeiro fármaco inibidor de tirosina-quinase) no tratamento do tumor estromal gastrointestinal (GIST), que constitui um grupo incomum de neoplasias de origem mesenquimal, sendo mais frequente no estômago e no intestino delgado.<sup>69-70</sup>

Caracterizado como um inibidor de características multiquinases, o vandetanibe (Figura 8, 2) é um recente inibidor, que age principalmente sobre a atividade tirosina-quinase dos receptores VEGFR-2 e EGFR. Ele é também conhecido como zactima e tem uma potencial ação inibidora de proliferação e sobrevivência de células tumorais.<sup>70</sup> Estudos *in vitro* demonstraram que o vandetanibe é um inibidor seletivo da proliferação celular estimulada por VEGF e EGF. Com o objetivo de reforçar as características mencionadas acima, Wedge e colaboradores<sup>71</sup> mostraram que vandetanibe é um inibidor potente da atividade tirosina-quinase de VEGFR-2 ( $IC_{50} = 40$  nM), além de também apresentar valores na faixa nanomolar para inibir a atividade quinase de EGFR ( $IC_{50} = 500$  nM), e VEGFR-3 ( $IC_{50} = 108$  nM).<sup>71</sup> Além disso, o vandetanibe inibe a quinase RET ( $IC_{50} = 100$  nM) e o crescimento *in vitro* de células tumorais dependente do RET. Vários estudos de Fases II e III que estão sendo realizados com este protótipo indicam que, em breve, o vandetanibe poderá ser uma outra opção para o tratamento de pacientes com câncer de pulmão de células não pequenas (CPNPC).<sup>72</sup>



**Figura 8.** Fórmulas estruturais de alguns inibidores da atividade tirosina-quinase dos VEGFR-1 e VEGFR-2

O vatalanibe (Figura 8, **3** - Novartis) apresenta atividade contra VEGFR-1, 2 e 3, além dos receptores do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR), c-Kit e c-Fms. No entanto, este protótipo exibe maior afinidade pelo receptor VEGFR-2. Ele claramente revela um efeito antitumoral em vários tipos de tumores sólidos e atualmente se encontra em estudos triagem de fase III no tratamento para tumores colorretais (popularmente conhecido como câncer do intestino grosso) e de fase II contra tumores no cérebro, pâncreas, próstata, mesotelioma, melanoma, sistema ginecológico, linfoma e CPNPC.<sup>70</sup>

Introduzido no mercado farmacêutico pelo grupo da alemã Bayer e da empresa americana Onyx, o sorafenibe, também conhecido como nexavar (Figura 8, **4**) age inibindo as quinases serina-treonina Raf-1 e B-Raf, e as tirosinas quinases VEGFR-1, 2 e 3 além do PDGFR- $\beta$  com efeitos antitumorais em células cancerígenas do cólon, pâncreas e seio. Este fármaco foi aprovado pela FDA em dezembro de 2005. Dentre suas principais ações farmacológicas, destaca-se a inibição da proliferação e angiogênese de células tumorais, além do aumento na taxa de apoptose.<sup>70-73</sup> A sinalização celular que é mediada por Raf-1 e VEGF tem sido implicada na patogênese molecular do

carcinoma hepatocelular, proporcionando uma base racional para investigar o sorafenibe para esta anomalia.<sup>74-75</sup>

O pazopanibe (Figura 8, **5**) é um derivado de 2H-indazolilpirimidina sintetizado pela GlaxoSmithKline. Ele exibe atividade inibitória contra as quinases dos subtipos 1, 2 e 3 de receptores VEGFR com valores de IC<sub>50</sub> de 10, 30, e 47 nM, respectivamente. O pazopanibe é também conhecido como um protótipo multiquinases, pois age sobre diversas enzimas. No trabalho de Kumar e colaboradores,<sup>64</sup> foram realizados ensaios *in vitro* em um sistema de células livres, para testar a atividade do pazopanibe sobre determinadas enzimas. Ficou evidenciado a sua baixa seletividade e consequentemente o alto risco de efeitos colaterais.<sup>64</sup> Atualmente, encontra-se em estudos de Fase II para o tratamento de tumores no cérebro, tireóide, sarcoma, sistema renal, urotelial, ovariano, neuroendócrino, nasofaríngeo, ginecológico e no fígado.<sup>76</sup>

Alberts e colaboradores<sup>68</sup> mostraram, a partir de estudos de Fase II a eficácia do cediranibe (Figura 8, **6**) em pacientes com carcinoma hepatocelular. O cediranibe (Recentin ou AZD2171 - AstraZeneca) é um potente inibidor de VEGFR, KDR (IC<sub>50</sub> < 0,002  $\mu$ M) e

FLT-1 ( $IC_{50} = 0,005 \mu M$ ), e dos receptores c-Kit, PDGFR-b, e Flt-4 em concentrações nanomolares.<sup>68</sup> Em recentes estudos de Fase II, foi confirmado que o cediranibe consegue normalizar transitoriamente os vasos do tumor em glioblastomas, causando mudanças rápidas na estrutura e função do vaso do tumor e aliviando o edema cerebral, dados estes avaliados por imagem de ressonância magnética. Além disso, AZD2171 induz uma diminuição do volume e massa do tumor para menos da metade diagnosticada no início do tratamento com apenas poucos dias de aplicação. Até o momento, não há nenhum dado concreto da associação do cediranibe com quimioterapia ou radioterapia. Entretanto, é grande a perspectiva da otimização de sua atividade pelo sinergismo com terapias que agem diretamente no sistema extracelular.<sup>66</sup>

Como foi citado, os inibidores tirosina-quinase dos receptores VEGFR-1 e 2, contribuem para o tratamento de uma grande quantidade de patologias, principalmente tumorais. Entretanto, o uso da grande maioria tem sido classificado como terapias de segunda ou terceira linha. Para que os inibidores tenham um papel primário na terapia, tem que haver uma hipótese clara de sua utilização, *e.g.* alvos e mecanismos de ação biológicos pré-estabelecidos, além de relevantes dados pré-clínicos, e ter sido aplicado em grupos bem caracterizados de pacientes. Nos últimos anos tem-se buscado um melhor entendimento do mecanismo de ação e maior seletividade destes inibidores, o que provavelmente permitirá a classificação dos futuros inibidores de quinase como tratamento de primeira linha.

## 6. Conclusões

O sistema dos fatores de crescimento vascular endotelial engloba inúmeras moléculas e macromoléculas biológicas classificadas como fatores pró e pré-angiogênicos. Estas estruturas auxiliam no controle de patologias (crescimento de tumores, psoríase, artrite reumatóide e retinopatia diabética), diretamente relacionadas ao aumento anormal das redes vasculares. Outras doenças originadas pela baixa suplementação resultante do déficit de vascularização em determinadas áreas induzem diversos danos nesses tecidos, podendo levar à morte celular isquêmica, fator principal de injúrias como infartos cerebrais e cardíacos. Por outro lado, em processos de cicatrização, regeneração do organismo, e durante a ovulação e formação da placenta, o sistema VEGF torna-se fundamental para o controle homeostático.

Pode-se concluir que o aumento do interesse na pesquisa por novos inibidores da atividade tirosina-quinase, durante a última década, se justifica pelo aumento proporcional dos conhecimentos adquiridos nos aspectos estruturais e de sinalização do sistema VEGF, assim como, a grande biodisponibilidade e variedade estrutural entre as classes de inibidores disponíveis no mercado farmacêutico e em fase de testes pré-clínicos. No entanto, um estudo minucioso do domínio quinase destes receptores é fundamental para o planejamento de novos inibidores seletivos, o que acarretaria na redução significativa da interação com outros receptores e, conseqüentemente, dos efeitos colaterais e dose administrada.

Esta revisão descreve de modo sucinto o sistema VEGF, incluindo a expressão dos fatores de crescimento vascular endotelial (VEGF), mecanismos de ativação dos receptores VEGFR-1 e 2 e a dimerização destes receptores, além de mostra o amplo espectro de ação fornecido pelo tratamento com anticorpos monoclonais e inibidores do domínio tirosina-quinase, justificando porque o sistema VEGF é conhecido como um alvo multi-terapêutico.

## 7. Glossário

**Hormônio autócrino:** Tem ação direta na mesma célula que o libera. Interleucina-2, que estimula a proliferação de células T, é um hormônio autócrino.<sup>77</sup>

**Hormônio parácrino:** Age somente em células próximas aquela que o libera. Prostaglandinas e muitos fatores de crescimento são exemplos de hormônios parácrinos.<sup>77</sup>

**Receptores quiméricos:** Quimera é um animal ou tecido composto de elementos derivados de indivíduos diferentes; um híbrido. Um receptor quimérico é uma proteína contendo segmentos derivados de proteínas diferentes.<sup>78</sup>

**Quinase:** Nome de um conjunto de enzimas da classe das transferases que catalisam a transferência de um grupo fosfato terminal ( $\gamma$ ) de um determinado composto doador (ATP ou GTP) para uma molécula receptora (substrato). O substrato que serve como receptor do grupo fosforila para uma específica quinase é identificado no prefixo do nome da quinase, *e.g.* glucoquinase, a qual é envolvida na manutenção dos níveis de glucose no sangue. As proteíno-quinases, que fosforilam resíduos específicos de treonina, serina e tirosina em proteínas-alvo, tem um papel crítico na regulação da atividade de muitas proteínas celulares.<sup>77, 78</sup>

**Anticorpo monoclonal humanizado:** É um tipo de anticorpo feito em laboratório através da combinação de um anticorpo humano com uma pequena parte de anticorpos monoclonais de ratos e/ou camundongos. A parte do anticorpo de rato ou camundongo liga-se ao antígeno alvo, e a subunidade humana ajuda a proteger o anticorpo contra uma destruição causada pelo sistema imune do hospedeiro.

## Agradecimentos

Às agências de fomento CNPq, CAPES e FAPERJ, e ao Programa de Pós-graduação em Química da UFRJ.

## Referências Bibliográficas

- <sup>1</sup> Risau, W. *Nature* **1997**, *386*, 671. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>2</sup> Hoeben, A.; Landuyt, B.; Highley, M. S.; Wildiers, H.; Van Oosterom, A.T.; Bruijn, E. A. *Pharmacol. Rev.* **2004**, *56*, 549. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>3</sup> Hanahan, D.; Folkman, J. *Cell* **1996**, *86*, 353. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>4</sup> Oppenheimer-Marks, N.; Lipsky, P. E. *Springer Semin. Immunopathol.* **1998**, *20*, 95. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>5</sup> Shibuya, M. J. *Biochem. Mol. Biol.* **2006**, *39*, 469. [[PubMed](#)]
- <sup>6</sup> Maas, J. W. M.; Groothuis, P. G.; Dunselman, G. A. J.; Goeij, A. F. P. M.; Boudier, H. A. J. S. *Hum. Reprod.* **2001**, *16*, 1557. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>7</sup> Research Genentech, Sítio da *Genentech Bioncology*. Disponível em: <<http://www.gene.com/gene/research/focusareas/tgr/>>. Acesso em: 20 maio 2009.
- <sup>8</sup> Ferrara, N. *Nat. Rev. Cancer.* **2002**, *2*, 795. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>9</sup> Holmes, D. I. R.; Zachary, I. *Genome Biol.* **2005**, *6*, 209. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>10</sup> Ferrara, N.; Gerber, H. P.; Lecouter, J. *Nat. Med.* **2003**, *9*, 669. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>11</sup> Cross, M. J.; Dixelius, J.; Matsumoto, T.; Claesson-Welsh, L. *Trends Biochem. Sci.* **2003**, *28*, 488. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>12</sup> PDB ID: 2VPF. Muller, Y. A.; Christinger, H. W.; Keyt, B. A.; Vos, A. M. *Structure* **1997**, *5*, 1325. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>13</sup> Wiesmann, C.; Fuh, G.; Christinger, H. W.; Eigenbrot, C.; Wells, J. A.; De Vos, A. *Cell* **1997**, *91*, 695. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>14</sup> Horta, B. A. C.; Cirino, J. J. V.; Alencastro, R. B. *J. Mol. Graphics Mod.* **2008**, *26*, 1091. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>15</sup> PDB ID: 1VPF. Muller, Y. A.; Li, B.; Christinger, H. W.; Wells, J. A.; Cunningham, B. C.; De Vos, A. M. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1997**, *94*, 7192. [[CrossRef](#)]
- <sup>16</sup> Horta, B. A. C; Tese de Doutorado, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, 2008. [[Link](#)]
- <sup>17</sup> Millauer, B.; Wizigmann-Voos, S.; Schnurch, H.; Martinez, R.; Moller, N. P. H.; Risau, W.; Ullrich, A. *Cell* **1993**, *72*, 835. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>18</sup> Shibuya, M.; Yamaguchi, S.; Yamane, A.; Ikeda, T. T. A.; Matsushime, H.; Sato, M. *Oncogene* **1990**, *5*, 519. [[PubMed](#)]
- <sup>19</sup> Alitalo, K; Carmeliet, P. *Cancer Cell* **2002**, *1*, 219. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>20</sup> Yancopoulos, G. D.; Davis, S.; Gale, N. W.; Rudge, J. S.; Wiegand, S. J.; Holash, J. *Nature* **2000**, *407*, 242. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>21</sup> Ruch, C.; Skiniotis, G.; Steinmetz, M. O.; Walz, T.; Ballmer-Hofer, K. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2007**, *14*, 249. [[CrossRef](#)]
- <sup>22</sup> Schlessinger, J. *Cell* **2000**, *103*, 211. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>23</sup> Brock, C. S.; Lee, S. M. *Eur. Respir. J.* **2002**, *19*, 557. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>24</sup> Petrova, T. V.; Makinen, T.; Alitalo, K. *Exp. Cell Res.* **1999**, *253*, 117. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>25</sup> Ellis, L. M.; Hicjlin, D. J. *Nat. Rev. Cancer.* **2008**, *8*, 579. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>26</sup> Silva, B. V.; Horta, B. A. C.; Alencastro, R. B.; Pinto, A. C. *Quim. Nova* **2009**, *32*, 453. [[CrossRef](#)]
- <sup>27</sup> Ferrara, N.; Kerbel, R. S. *Nature* **2005**, *438*, 967. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>28</sup> Pinho, M. S. L. *Rev. Bras. Coloproct.* **2004**, *24*, 382. [[CrossRef](#)]
- <sup>29</sup> Research Genentech, Sítio da *Genentech Bioncology*. Disponível em: <<http://www.gene.com/gene/products/information/oncology/avastin/>>. Acesso em: 20 junho 2009.

- <sup>30</sup> Research Genentech, Sítio da Genentech Bioncology. Disponível em: <<http://www.researchvegf.com/researchvegf/index.m>>. Acesso em: 20 junho 2009.
- <sup>31</sup> Hurwitz, H. Fehrenbacher, L.; Novotny, W.; Cartwright, T.; Hainsworth, J.; Heim, W.; Berlin, J.; Baron, A.; Griffing, S.; Holmgren, E.; Ferrara, N.; Fyfe, G.; Rogers, B.; Ross, R.; Kabbinavar, F. *N. Engl. J. Med.* **2004**, *350*, 2335. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>32</sup> Sandler, A. Gray, R.; Perry, M. C.; Brahmer, J.; Schiller, J. H.; Dowlati, A.; Lilienbaum, R.; Johnson, D. H. *N. Engl. J. Med.* **2006**, *355*, 2542. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>33</sup> Ramalingam, S. S.; Dahlberg, S. E.; Langer, C. J.; Gray, R.; Belani, C. P.; Brahmer, J. R.; Sandler, A. B.; Schiller, J. H.; Johnson, D. H. *J. Clin. Onc.* **2008**, *26*, 60. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>34</sup> Câncer de pulmão, Sítio do Instituto Nacional de Câncer. Disponível em: <[http://www.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=340](http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=340)>. Acesso em: 20 maio 2009.
- <sup>35</sup> Cohen, M. H.; Gootenberg, J.; Keegan, P.; Pazdur, R. *Oncologist* **2007**, *12*, 713. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>36</sup> Fine, S. L.; Berger, J. W.; Maguire, M. G.; Ho, A. C. *N. Engl. J. Med.* **2000**, *342*, 483. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>37</sup> Rodrigues, E. B.; Rossi, E. E.; Junior, A. G.; Meyer, C. H.; Ho, A. C. *Arq. Bras. Oftalmol.* **2006**, *69*, 756. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>38</sup> Moshfeghi, A. A.; Puliafito, C. A. *Expert. Opin. Investig. Drugs* **2005**, *14*, 671. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>39</sup> About MACUGEN® (pegaptanib sodium injection), Sítio da Eyetech Inc. Disponível em: <<http://www.macugen.com/>>. Acesso em: 20 maio 2009.
- <sup>40</sup> Van Wijngaarden, P.; Coster, D. J.; Williams, K. A. *JAMA* **2005**, *293*, 1509. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>41</sup> Ng, E. W.; Shima, D. T.; Calias, P.; Cunningham, E. T.; Guyer, D. R.; Adamis, A. P. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, *5*, 123. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>42</sup> Gragoudas, E. S.; Adamis, A. P.; Cunningham, E. T.; Feinsod, M.; Guyer, D. R. *N. Engl. J. Med.* **2004**, *351*, 2805. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>43</sup> Research Genentech, Sítio da Genentech Bioncology. Disponível em: <<http://www.gene.com/gene/products/information/tgr/lucentis/>>. Acesso em: 20 junho 2009.
- <sup>44</sup> Narayanan, R.; Kupppermann, B. D.; Jones, C.; Kirkpatrick, P. *Nature Rev. Drug Discov.* **2006**, *5*, 815. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>45</sup> Chen, Y.; Wiesmann, C.; Fuh, G.; Li, B.; Christinger, H. W.; McKay, P.; De Vos A.; Lowman, H. B. *J. Mol. Biol.* **1999**, *293*, 865. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>46</sup> Gaudreault, J.; Fei, D.; Rusit, J.; Suboc, P.; Shiu, V. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2005**, *46*, 726. [CrossRef]
- <sup>47</sup> Stone, E. M. *N. Engl. J. Med.* **2006**, *355*, 1493. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>48</sup> Rosenfeld, P. J.; Brown, D. M.; Heier, J.S.; Boyer, D. S.; Kaiser, P. K.; Chung, C. Y.; Kim, R. Y. *N. Engl. J. Med.* **2006**, *355*, 1419. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>49</sup> Brown, D. M.; Kaiser, P. K.; Michels, M.; Soubrane, G.; Heier, J. S.; Kim, R. Y.; Schneider, S. *N. Engl. J. Med.* **2006**, *355*, 1432. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>50</sup> Droga vai poder melhorar a visão em até 40%; Matéria de Moura, J. em 12/09/2008 para o *Jornal do Brasil online; Ciência e Tecnologia*. Disponível em: <<http://jbonline.terra.com.br/extra/2008/09/12/e120912901.html>>. Acesso em: 15 junho 2009.
- <sup>51</sup> Spaide, R. F.; Laud, K.; Fine, H. F.; Klancnik, J. M. Jr.; Meyerle, C. B.; Yannuzzi, L. A.; Sorenson, J.; Slakter, J.; Fisher, Y. L.; Cooney, M. J. *Retina* **2006**, *26*, 383. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>52</sup> Kornev, A. P.; Haste, N. M.; Taylor, S. S.; Eyck, L. F. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**, *103*, 17783. [CrossRef]
- <sup>53</sup> PDB ID: 2oh4. Hasegawa, M.; Nishigaki, N.; Washio, Y.; Kano, K.; Harris, P.A.; Sato, H.; Mori, I.; West, R.I.; Shibahara, M.; Toyoda, H.; Wang, L.; Nolte, R.T.; Veal, J.M.; Cheung, M. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 4453. [PubMed] [CrossRef]
- <sup>54</sup> Roskoski, R. Jr. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *375*, 287. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>55</sup> Harris, P. A.; Cheung, M.; Hunter III, R. N.; Brown, M. L.; Veal, J. M.; Nolte, R. T.; Wang, L.; Liu, W.; Crosby, R. M.; Johnson, J. H.; Epperly, A. H.; Kumar, R.; Luttrell, D. K.; Stafford, J. A. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 1610. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>56</sup> Official SUTENT® site, Sítio da Pfizer. Disponível em: <<http://www.sutent.com/>>. Acesso em: 20 maio 2009.
- <sup>57</sup> Mendel, D. B.; Laird, A. D.; Xin, X.; Louie, S. G.; Christensen, J. G.; Li, G.; Schreck, R. E.; Abrams, T. J.; Ngai, T. J.; Lee, L. B.; Murray, L. J.; Carver, J.; Chan, E.; Moss, K.G.; Haznedar, J. O.; Sukbuntherng, J.; Blake, R. A.; Sun, L.; Tang, C.; Miller, T.; Shirazian, S.; McMahon, G.; Cherrington, J. M. *Clin. Cancer Res.* **2003**, *9*, 327. [PubMed]
- <sup>58</sup> Industry Projects, Sítio da Drug Development Technology. Disponível em: <<http://www.drugdevelopment->

[technology.com/projects/zactima/](http://technology.com/projects/zactima/)>. Acesso em: 20 maio 2009.

<sup>59</sup> Hennequin, L. F.; Stokes, E. S.; Thomas, A. P.; Johnstone, C.; Plé, P. A.; Ogilvie, D. J.; Dukes, M.; Wedge, S. R.; Kendrew, J.; Curwen, J. O. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1312 [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

<sup>60</sup> NCI Drug Dictionary, Sítio do *National Cancer Institute*. Disponível em: <<http://www.cancer.gov/Templates/drugdictionary.aspx?CdrID=43530>>. Acesso em: 22 junho 2009.

<sup>61</sup> Bold, G.; Altmann, K. H.; Frei, J.; Lang, M.; Manley, P. W.; Traxler, P.; Wietfeld, B.; Brüggem, J.; Buchdunger, E.; Cozens, R.; Ferrari, S.; Furet, P.; Hofmann, F.; Martiny-Baron, G.; Mestan, J.; Rösel, J.; Sills, M.; Stover, D.; Acemoglu, F.; Boss, E.; Emmenegger, R.; Lässer, L.; Masso, E.; Roth, R.; Schlachter, C.; Vetterli, W. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 2310. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

<sup>62</sup> NCI Drug Dictionary, Sítio do National Cancer Institute. Disponível em: <<http://www.cancer.gov/Templates/drugdictionary.aspx?CdrID=299013>>. Acesso em: 23 junho 2009.

<sup>63</sup> NCI Drug Dictionary, Sítio do National Cancer Institute. Disponível em: <<http://www.cancer.gov/Templates/drugdictionary.aspx?CdrID=476479>>. Acesso em: 22 junho 2009.

<sup>64</sup> KumaR, R.; Knick, V. B.; Rudolph, S. K.; Johnson, J. H.; Crosby, R. M.; Crouthamel, M. C.; Hoppe, T. M.; Miller, C. G.; Harrington, L. E.; Onori, J. A.; Mullin, R. J.; Gilmer, T. M.; Truesdale, A. T.; Epperly, A. H.; Boloo, A.; Stafford, J. A.; Luttrell, D. K.; Cheung, M. *Mol. Cancer Ther.* **2007**, *6*, 2012. [[PubMed](#)]

<sup>65</sup> NCI Drug Dictionary, Sítio do National Cancer Institute. Disponível em: <<http://www.cancer.gov/Templates/drugdictionary.aspx?CdrID=425596>>. Acesso em: 20 maio 2009.

<sup>66</sup> Kamoun, W. S.; Ley, C. D.; Farrar, C. T.; Duyverman, A. M.; Lahdenranta, J.; Lacorre, D. A.; Batchelor, T. T.; Di Tomaso, E.; Duda, D. G.; Munn, L. L.; Fukumura, D.; Sorensen, A. A.; Jain, R. K. *J. Clin. Oncol.* **2009**, *27*, 2542. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

<sup>67</sup> Murray, L. J.; Abrams, T. J.; Long, K. R.; Ngai, T. J.; Olson, L. M.; Hong, W.; Keast, P. K.; Brassard, J. A.; O'farrell, A. M.; Cherrington, J. M.; Pryer, N. K. *Clin. Exp. Metastasis* **2003**, *20*, 757. [[CrossRef](#)]

<sup>68</sup> Zhu, A. X. *Cancer* **2008**, *112*, 250. [[PubMed](#)]

<sup>69</sup> Wen, P. Y.; Yung, W. K.; Lamborn, K. R.; Norden, A. D.; Cloughesy, T. F.; Abrey, L. E.; Fine, H. A.; Chang, S. M.; Robins, H. I.; Fink, K.; Deangelis, L. M.; Mehta, M.; Di Tomaso, E.; Drappatz, J.; Kesari, S.; Ligon, K. L.;

Aldape, K.; Jain, R. K.; Stiles, C. D.; Egorin, M. J.; Prados, M. D. *Neuro-Oncol.* **2009**, *8*, 454. [[CrossRef](#)]

<sup>70</sup> Steeghs, N.; Nortier, J. W.; Gelderblom, H. *Ann. Surg. Oncol.* **2007**, *17*, 942. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

<sup>71</sup> Wedge, S. R.; Ogilvie, D. J.; Dukes, M.; Kendrew, J.; Chester, R.; Jackson, J. A.; Boffey, S. J.; Valentine, P. J.; Curwen, J. O.; Musgrove, H. L.; Graham, G. A.; Hughes, G. D.; Thomas, A. P.; Stokes, E. S.; Curry, B.; Richmond, G. H.; Wadsworth, P. F.; Bigley, A. L.; Hennequin, L. F. *Cancer Res.* **2002**, *62*, 4645. [[PubMed](#)]

<sup>72</sup> Morabito, A.; Piccirillo, M. C.; Falasconi, F.; De Feo, G.; Del Giudice, A.; Bryce, J.; Di Maio, M.; De Maio, E.; Normanno, N.; Perrone, F. *Oncologist* **2009**, *14*, 378. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

<sup>73</sup> Llovet, J. M.; Ricci, S.; Mazzaferro, V.; Hilgard, P.; Gane, E.; Blanc, J. F.; De Oliveira, A. C.; Santoro, A.; Raoul, J. L.; Forner, A.; Schwartz, M.; Porta, C.; Zeuzem, S.; Bolondi, L.; Greten, T. F.; Galle, P. R.; Seitz, J. F.; Borbath, I.; Häussinger, D.; Giannaris, T.; Shan, M.; Moscovici, M.; Voliotis, D.; Bruix, J.; for the SHARP Investigators Study Group. *N. Engl. J. Med.* **2008**, *359*, 378. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

<sup>74</sup> Villanueva, A.; Newell, P.; Chiang, D. Y.; Friedman, S. L.; Lovet, J. M. *Semin. Liver Dis.* **2007**, *27*, 55. [[CrossRef](#)]

<sup>75</sup> Calvisi, D. F.; Ladu, S.; Gorden, A.; Farina, M.; Conner, E. A.; Lee, J. S.; Factor, V. M.; Thorgeirsson, S. S. *Gastroenterology* **2006**, *130*, 1117. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

<sup>76</sup> Podar, K.; Tonon, G.; Sattler, M.; Tai, Y. T.; Legouill, S.; Yasui, H.; Ishitsuka, K.; Kumar, S.; Kumar, R.; Pandite, L. N.; Hideshima, T.; Chauhan, D.; Anderson, K. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2006**, *103*, 19478. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

<sup>77</sup> Voet, D.; Voet, J. G. *Biochemistry*, 2a. ed., Wiley: New York, 1995.

<sup>78</sup> Lodish, H., Berk, A.; Matsudaira, P.; Kaiser, C.A.; Krieger, M.; Scott, M.P.; Zipursky, S.L.; Darnell, J. *Biologia Celular e Molecular*, 5a. ed., Artmed Editora: Porto Alegre, 2005.