

Triagem Virtual e Análise Toxicológica de Produtos Naturais para Inibição da Proteína VEGFR-2

*Virtual Screening and Toxicological Analysis of
Natural Products for Protein Inhibition
VEGFR-2*

<https://publicacoes.ifpa.edu.br/index.php/rbac/index>

Nalanda da Silva Maués

*Graduanda em Licenciatura em Ciências Biológicas
Instituto Federal do Pará (IFPA), Campus Abaetetuba*
mauesnalanda@gmail.com

Renato Araújo da Costa

*Professor de Ensino Básico, Técnico e Tecnológico
Instituto Federal do Pará (IFPA), Campus Abaetetuba*
renato.costa@ifpa.edu.br

Resumo Expandido

RESUMO: Este estudo avaliou a atividade inibitória de produtos naturais da biodiversidade brasileira contra a proteína VEGFR-2, essencial para a angiogênese e o câncer. Usando triagem virtual com o banco de dados NuBBE, 1.448 compostos foram analisados e reclassificados pela energia livre de ligação MM-GBSA. Dez compostos com melhores resultados foram selecionados para análise de toxicidade e semelhança a fármacos. Os compostos NuBBE_980 e NuBBE_981 se destacaram por apresentarem afinidade superior ao sorafenib e serem inativos em hepatotoxicidade, carcinogenicidade, mutagenicidade e citotoxicidade. Eles demonstraram interações significativas com resíduos chave da VEGFR-2 e potencial citotóxico in vitro, indicando que são promissores para novas terapias anticâncer e inibição da angiogênese.

Palavras-chave: VEGFR-2. Produtos Naturais. Triagem.

ABSTRACT: This study evaluated the inhibitory activity of natural products from Brazilian biodiversity against the VEGFR-2 protein, which is essential for angiogenesis and cancer. Using virtual screening with the NuBBE database, 1,448 compounds were analyzed and reclassified by MM-GBSA binding free energy. Ten compounds with the best results were selected for toxicity and drug-likeness analysis. The compounds NuBBE_980 and NuBBE_981 stood out for having superior affinity to sorafenib and being inactive in hepatotoxicity, carcinogenicity, mutagenicity, and cytotoxicity tests. They demonstrated significant interactions with key VEGFR-2 residues and in vitro cytotoxic potential, indicating that they are promising for new anticancer therapies and angiogenesis inhibition.

Keywords: VEGFR-2. Natural Products. Virtual Screening.

INTRODUÇÃO

O Receptor de Fator de Crescimento Endotelial Vascular Tipo 2 (VEGFR-2) é um receptor tirosina quinase (RTK) responsável por regular a angiogênese, um processo fisiológico natural indispensável que auxilia no crescimento de células e reparo de tecidos (El-Meguid *et al.*, 2022; Modi; Kulkarni, 2019). No entanto, a superexpressão do VEGFR-2 pode contribuir para o desenvolvimento de diversos tipos de câncer, especialmente o câncer de mama (El-Meguid *et al.*, 2022).

Até o momento, vários medicamentos, como sorafenibe, pazopanibe, axitinibe,

regorafenibe e lenvatinibe, foram aprovados pela Food and Drug Administration (FDA) para inibição do VEGFR-2. Contudo, o uso desses medicamentos tem sido acompanhado por efeitos colaterais e resistência, o que pode comprometer a eficácia do tratamento do câncer (Kang *et al.*, 2018; Modi; Kulkarni, 2019). Assim, é altamente desejável descobrir e desenvolver novos medicamentos que ofereçam menos efeitos colaterais e eficácia melhorada (Xia *et al.*, 2014).

A medicina tradicional, praticada há milênios, sempre teve uma estreita relação com produtos naturais. Extratos de plantas medicinais foram amplamente utilizados no tratamento de diversas doenças (Rizvi *et al.*, 2022). O crescente reconhecimento do potencial terapêutico das plantas levou à descoberta de fitoquímicos, e os avanços tecnológicos possibilitaram o isolamento desses compostos e a avaliação de sua segurança, aspectos essenciais para o processo de cura (Thakur; Singh; Khedkar, 2020). Esses compostos naturais demonstraram várias atividades biológicas e têm servido como inspiração para o desenvolvimento de novos medicamentos, incluindo aqueles com propriedades anticancerígenas, conforme revisado por Patil *et al.* (2024). Assim, produtos naturais e seus derivados podem representar agentes quimioterápicos superiores devido à sua alta seletividade, custo reduzido e baixa toxicidade (Torquato *et al.*, 2017).

As estratégias convencionais de descoberta de medicamentos, que envolvem a identificação e o desenvolvimento de pequenas moléculas, são demoradas, custosas e frequentemente falham nos ensaios clínicos (Hinkson; Madej; Stahlberg, 2020). Em contrapartida, a bioinformática se destaca como uma alternativa promissora, utilizando métodos de triagem virtual para analisar grandes volumes de dados estruturais no desenvolvimento de novos medicamentos (Shamsi *et al.*, 2024). Essa abordagem eficaz tem sido amplamente utilizada na descoberta de medicamentos (Massagué *et al.*, 2015), incluindo inibidores da proteína VEGFR-2 (Salimi *et al.*, 2022; Shamsi *et al.*, 2024; Baammi; Allali; Daoud, 2023).

Neste estudo, pretendemos identificar potenciais inibidores do VEGFR-2 de fontes naturais da biodiversidade brasileira usando um fluxo computacional de alto desempenho de triagem virtual. Este enfoque não apenas busca contribuir para o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes e com menos efeitos colaterais, mas também valoriza o potencial biotecnológico dos recursos naturais do Brasil.

METODOLOGIA

Realizamos triagem virtual com compostos contidos no Banco de Dados de Núcleos

de Bioensaios, Ecofisiologia e Biossíntese de Produtos Naturais (NuBBEDB) (Russo *et al.*, 2023). Ao todo, o NuBBE possui um total de 2223 compostos naturais, que primeiramente, foram filtrados com base nos critérios da "Regra dos 5" de Lipinski (Lipinski *et al.*, 2001), para identificar moléculas com potencial farmacêutico, reduzindo para um total de 1448 compostos que não violaram essa regra e foram considerados para a triagem virtual.

A estrutura cristalina da proteína foi recuperada do Protein Data Bank (PDB) com o código PDB: 4ASD em complexo com sorafenib (BAY) (El-Meguid *et al.*, 2022).

Antes da análise de encaixe, preparamos a proteína VEGFR-2 removendo moléculas de água, íons e o ligante. A protonação dos aminoácidos foi analisada no servidor H++, e os átomos de hidrogênio foram adicionados a toda a estrutura.

A triagem virtual foi realizada utilizando o fluxo de trabalho ChemFlow (Barreto Gomes *et al.*, 2023), composto por três módulos independentes: DockFlow, LigFlow e ScoreFlow. O DockFlow foi empregado para o encaixe molecular virtual, utilizando o programa PLANTS (Korb; Stützle; Exner, 2009); o LigFlow foi responsável pela parametrização e atribuição de cargas aos compostos, etapa necessária para a execução da dinâmica molecular; e o ScoreFlow reclassificou as poses de encaixe utilizando os métodos MM/PBSA ou MM/GBSA, conforme implementado no MMPBSA.py do AmberTools22. Após a reclassificação das poses, foram selecionadas as 10 moléculas com os melhores valores de energia livre de ligação para análise de toxicidade, utilizando o servidor ProTox II (Banerjee *et al.*, 2018). Foram avaliados os parâmetros de hepatotoxicidade, neurotoxicidade, carcinogenicidade, mutagenicidade e citotoxicidade. Apenas as moléculas inativas nesses testes foram selecionadas para as etapas subsequentes. Na sequência, realizou-se uma análise mais detalhada das interações das moléculas com os resíduos-chave do sítio ativo da proteína, utilizando o programa Biovia Discovery Studio. Esse processo visou selecionar o composto que apresentou o maior número de interações significativas com os resíduos do sítio ativo da proteína. Por fim, a molécula com o melhor perfil foi escolhida para a realização de simulações de dinâmica molecular.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A triagem virtual tem se mostrado uma ferramenta crucial para identificar compostos promissores em grandes bibliotecas de produtos naturais. Neste estudo, 1.448 produtos naturais exclusivos do banco de dados NuBBE foram avaliados quanto à sua interação com o sítio ativo

da proteína VEGFR-2. Para minimizar o risco de falso-positivos, a energia livre de ligação dos compostos foi calculada utilizando o método MM-GBSA, e os compostos foram reclassificados com base nesses valores. Como resultado, dez compostos foram selecionados para uma avaliação adicional, incluindo a análise de toxicidade com parâmetros de hepatotoxicidade, carcinogenicidade, mutagenicidade, citotoxicidade, e semelhança a fármacos. A Tabela 1 apresenta os dez compostos selecionados com os seus respectivos valores de energia livre de ligação MM-GBSA, bem como os resultados dessas análises de toxicidade e semelhança a fármacos.

Tabela 1. Valores de Energia livre de ligação MM-GBSA; análise toxicológica e análise de semelhança a fármacos.

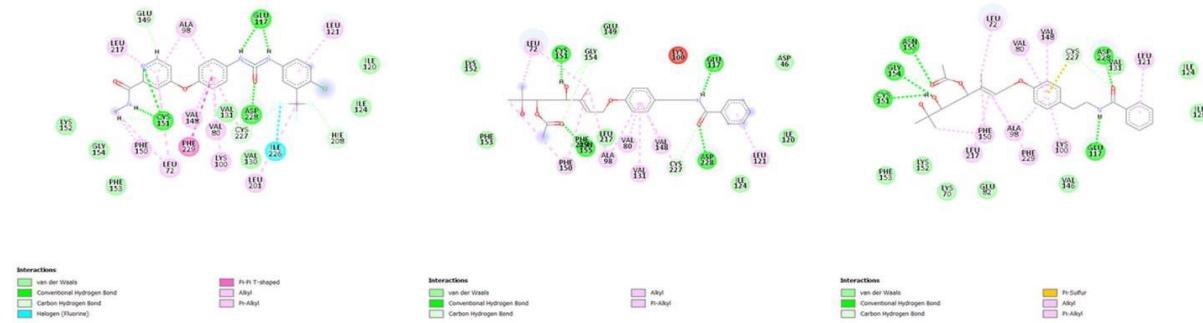
ProTox	MMGBSA (kcal/mol)	Hepato-toxicidade	Carcino-Genicidade	Mutagenicidade	Cito-toxicidade	Semelhança a fármacos
1800	-56,14	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	-9,4
980	-55,33	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	3,3
412	-50,59	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	-7,5
981	-50,50	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	3
2218	-50,09	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	-1,5
1807	-49,00	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	-13
1862	-48,73	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	-5,4
306	-48,69	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	-10
2221	-48,63	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	-1,7
BAX	-47,95	Active	Inactive	Inactive	Active	

Fonte: Os autores.

De acordo com a Tabela 1, os dez produtos naturais selecionados apresentaram valores de energia livre de ligação MM-GBSA mais favoráveis do que o inibidor de referência, sorafenib (BAX). Esses valores mais baixos indicam uma afinidade de ligação mais forte ao sítio de ligação da proteína VEGFR-2 (Sahakyan, 2021). Além disso, todos os compostos mostraram-se inativos em relação aos parâmetros de hepatotoxicidade, carcinogenicidade, mutagenicidade e citotoxicidade, conforme avaliação pelo PROTOX-II. A análise de semelhança a fármacos realizada pelo software DataWarrior (Sander *et al.*, 2015) revelou que os compostos NuBBE_980 e NuBBE_981 apresentaram valores positivos de probabilidade de similaridade medicamentosa, destacando-se como bons candidatos a medicamentos (Rocha *et al.*, 2024).

Esses dois compostos foram então selecionados para uma análise detalhada das interações com os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da proteína VEGFR-2 e comparados com as interações observadas para o inibidor sorafenib, conforme mostrado na Figura 1.

Figura 1. Interações realizadas com os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da proteína VEGFR-2.



Fonte: Os autores.

O composto mais eficaz para o encaixe com VEGFR-2 foi o NuBBE_980, que apresentou uma energia livre de ligação MM-GBSA de -55,33 kcal/mol. Este composto estabeleceu fortes interações com VEGFR-2, evidenciadas pela formação de cinco ligações de hidrogênio com os resíduos Glu117, Cys151, Gly154, Asn155 e Asp228, além de interações hidrofóbicas adicionais no sítio ativo da proteína. O NuBBE_981, com uma energia livre de ligação MM- GBSA de -50,50 kcal/mol, mostrou quatro interações de hidrogênio com os resíduos Glu117, Cys151, Asn155 e Asp228, além de interações hidrofóbicas com outros resíduos do sítio ativo (Figura 1). As interações de hidrogênio com os resíduos Glu117, Cys151 e Asp228, também observadas com o inibidor de referência sorafenib, corroboram nossos resultados.

Tanto o NuBBE_980 quanto o NuBBE_981 já foram relatados por possuírem potencial citotóxico in vitro em linhagens de células cancerígenas (Sribuhom *et al.*, 2017). Agora, eles também demonstram uma forte afinidade com o sítio ativo da proteína VEGFR-2. Esta descoberta é de grande relevância, pois sugere que essas moléculas podem atuar diretamente no alvo terapêutico VEGFR-2, além de terem o potencial de serem desenvolvidas como candidatos promissores para novas terapias anticâncer. A combinação de interações robustas com VEGFR-2 e a citotoxicidade previamente estabelecida reforça o potencial desses compostos em inibir a angiogênese, um processo crucial no desenvolvimento e progressão de tumores (Salimi *et al.*, 2022). Assim, os resultados destacam a importância dos compostos NuBBE_980 e NuBBE_981 como potenciais inibidores da VEGFR-2, justificando uma investigação mais aprofundada para seu desenvolvimento como agentes terapêuticos contra o câncer.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os compostos naturais NuBBE_980 e NuBBE_981 demonstraram forte potencial

como inibidores da VEGFR-2, apresentando energia livre de ligação mais favorável do que o sorafenib, além de serem inativos em testes de toxicidade. As robustas interações com resíduos críticos no sítio ativo da VEGFR-2 e a evidência de citotoxicidade in vitro ressaltam a importância desses compostos no desenvolvimento de novas terapias anticâncer. A combinação de alta afinidade com o alvo e a baixa toxicidade sugere que esses compostos podem superar as limitações dos medicamentos atuais, como efeitos colaterais e resistência. Portanto, NuBBE_980 e NuBBE_981 são candidatos valiosos para pesquisas adicionais e desenvolvimento clínico como novos agentes terapêuticos contra o câncer.

Referências

- ABD EL-MEGUID, E. A. *et al.* Novel benzothiazole-based dual VEGFR-2/EGFR inhibitors targeting breast and liver cancers: Synthesis, cytotoxic activity, QSAR and molecular docking studies. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 58, p. 128529, 2022.
- BANERJEE, P. *et al.* ProTox-II: a webserver for the prediction of toxicity of chemicals. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. W1, p. W257-W263, 2018.
- BAAMMI, S.; EL ALLALI, A.; DAOUD, R. Unleashing Nature's potential: a computational approach to discovering novel VEGFR-2 inhibitors from African natural compound using virtual screening, ADMET analysis, molecular dynamics, and MMPBSA calculations. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 10, p. 1227643, 2023.
- BARRETO GOMES, D. E. *et al.* ChemFlow— From 2D Chemical Libraries to Protein– Ligand Binding Free Energies. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 63, n. 2, p. 407-411, 2023.
- CERETO-MASSAGUÉ, A. *et al.* Molecular fingerprint similarity search in virtual screening. **Methods**, v. 71, p. 58-63, 2015.
- CHUNARKAR-PATIL, P. *et al.* Anticancer Drug Discovery based on Natural products: from computational approaches to Clinical studies. **Biomedicines**, v. 12, n. 1, p. 201, 2024.
- DA ROCHA, J. A. P. *et al.* Harnessing Brazilian biodiversity database: identification of flavonoids as potential inhibitors of SARS-CoV-2 main protease using computational approaches and all-atom molecular dynamics simulation. **Frontiers in Chemistry**, v. 12, p. 1336001, 2024.
- FV TORQUATO, H. *et al.* Anti-cancer phytometabolites targeting cancer stem cells. **Current Genomics**, v. 18, n. 2, p. 156-174, 2017.
- HINKSON, I. V.; MADEJ, B.; STAHLBERG, E. A. Accelerating therapeutics for opportunities in medicine: a paradigm shift in drug discovery. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, p. 770, 2020.
- KORB, O.; STUTZLE, T.; EXNER, T. E. Empirical scoring functions for advanced protein–ligand docking with PLANTS. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 49, n. 1, p. 84-96, 2009.
- KANG, De *et al.* Discovery of VEGFR2 inhibitors by integrating naïve Bayesian classification, molecular docking and drug screening approaches. **RSC Advances**, v. 8, n. 10, p. 5286-5297, 2018.
- LIPINSKI, C. A. *et al.* Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 46, n. 1-3, p. 3-26, 2001.
- MANNOCHIO-RUSSO, H. *et al.* Twenty-five years of natural products research in NuBBE. **Frontiers in Natural Products**, v. 2, p. 1252092, 2023.
- MODI, S. J.; KULKARNI, V. M. Vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR-2)/KDR inhibitors: medicinal chemistry perspective. **Medicine in Drug Discovery**, v. 2, p. 100009, 2019.
- RIZVI, Syed AA *et al.* Introduction to traditional medicine and their role in prevention and treatment

of emerging and re-emerging diseases. **Biomolecules**, v. 12, n. 10, p. 1442, 2022.

SALIMI, A. *et al.* The use of machine learning modeling, virtual screening, molecular docking, and molecular dynamics simulations to identify potential VEGFR2 kinase inhibitors. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 18825, 2022.

SRIBUHOM, T. *et al.* Benzoyltyramine alkaloids atalantums A–G from the peels of Atalantia monophylla and their cytotoxicity against cholangiocarcinoma cell lines. **Journal of Natural Products**, v. 80, n. 2, p. 403-408, 2017.

SAHAKYAN, H. Improving virtual screening results with MM/GBSA and MM/PBSA rescoring. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 35, n. 6, p. 731-736, 2021.

SHAMSI, A. *et al.* Structure-based drug-development study against fibroblast growth factor receptor 2: molecular docking and Molecular dynamics simulation approaches. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, p. 19439, 2024.

SALIMI, A. *et al.* The use of machine learning modeling, virtual screening, molecular docking, and molecular dynamics simulations to identify potential VEGFR2 kinase inhibitors. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 18825, 2022.

SANDER, T. *et al.* DataWarrior: an open-source program for chemistry aware data visualization and analysis. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 55, n. 2, p. 460-473, 2015.

THAKUR, M.; SINGH, K.; KHEDKAR, R. Phytochemicals: Extraction process, safety assessment, toxicological evaluations, and regulatory issues. In: **Functional and preservative properties of phytochemicals**. Academic Press, 2020. p. 341-361.

XIA, Y. *et al.* YLT192, a novel, orally active bioavailable inhibitor of VEGFR2 signaling with potent antiangiogenic activity and antitumor efficacy in preclinical models. **Scientific Reports**, v. 4, n. 1, p. 6031, 2014.