

Agentes antitumorais inibidores da angiogênese - Modelos farmacofóricos para inibidores da integrina $\alpha\beta3$

Thais Horta Álvares da Silva^{1*}, Anna Paola Butera², Daniel Henriques Soares Leal¹,
Ricardo José Alves¹

¹Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais,

²Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais

O câncer é, atualmente, uma das principais causas de morte no mundo. A angiogênese, formação de novos vasos capilares a partir de células endoteliais, é essencial para vários processos fisiopatológicos, tais como o desenvolvimento e a disseminação dos tumores. As integrinas são uma família de receptores de superfície que estão envolvidos na angiogênese, na qual a integrina $\alpha\beta3$ exerce papel importante. Os antagonistas da integrina $\alpha\beta3$ têm efeitos diretos na prevenção do crescimento, angiogênese e metástase tumorais. A avaliação in vitro frente à integrina $\alpha\beta3$ de coleções de ciclopeptídeos levou a compostos muito ativos e seletivos. Antagonistas não-peptídicos da integrina $\alpha\beta3$ também foram planejados e sintetizados. A partir da determinação da estrutura tridimensional da integrina $\alpha\beta3$ complexada com um inibidor, tornou-se possível o planejamento racional de ligantes com alta afinidade. Além disto, estes estudos permitiram a validação e o refinamento de modelo farmacofórico para os inibidores da integrina $\alpha\beta3$.

Unitermos

- Angiogênese
- Terapia do câncer
- Antagonistas da integrina $\alpha\beta3$
- Integrinas
- Agentes antitumorais

*Correspondência:

T. H. A. Silva
Av. Antônio Carlos, 66627
Faculdade de Farmácia
Universidade Federal de Minas Gerais
31270-901 - Belo Horizonte - MG, Brasil
E-mail: thais@farmacia.ufmg.br

O CÂNCER

O câncer é, atualmente, uma das principais causas de morte. Estima-se que mais de 126 mil pessoas no Brasil e cerca de 6 milhões de pessoas em todo o mundo morrem em decorrência da doença (Instituto Nacional do Câncer, 2003). Segundo o Instituto Nacional do Câncer – INCA (2006), deverão ocorrer mais de 472 mil casos novos de câncer em 2006. O quadro atual é caracterizado pela existência de tratamentos de elevado custo e índice terapêutico relativamente reduzido. Há diversas classes farmacológicas disponíveis de agentes quimioterápicos para tratamento do

câncer, mas nenhuma delas tem se mostrado capaz de erradicar as células cancerosas sem afetar tecidos normais (Salmon, Sartorelli, 2003). Qualquer que seja a causa, o câncer (ou neoplasia) é essencialmente uma doença de células, caracterizada por um desvio nos mecanismos de controle dos processos de proliferação e diferenciação celular. As lesões expansivas, denominadas tumores quando ocorrem em órgãos sólidos, à medida que se desenvolvem, podem comprimir ou invadir estruturas adjacentes normais.

Os tumores benignos são essencialmente bem delimitados, crescem geralmente de forma esférica e não invadem os tecidos ao seu redor, enquanto os tumores malignos

apresentam como sua mais importante propriedade a capacidade de invasão de tecidos vizinhos. Esse processo de invasão e alastramento, denominado metástase, pode avançar até atingir o sistema circulatório, permitindo que as células malignas ganhem vias de disseminação (por exemplo, vasos sanguíneos) e atinjam outros sítios, distantes do local original, e neles iniciem novas colônias de células neoplásicas. Nos estágios iniciais do desenvolvimento, normalmente quando o tumor tem menos de dois milímetros de diâmetro, a nutrição da massa tumoral faz-se essencialmente por difusão a partir dos tecidos vizinhos. Superando esse tamanho, os tumores passam a depender de vasos sanguíneos próprios para que não entrem em degeneração e necrose (Brasileiro Filho, Guimarães, Bogliolo, 2000; Bergers *et al.*, 1999). Além disso, naturalmente, os novos vasos formados servem como vias de disseminação das células malignas para outros focos de colonização (Fidler, Ellis, 1994). A metástase tumoral envolve diferentes interações célula-célula e célula-matriz tais como a liberação de células tumorais a partir do tumor primário, migração no sistema linfático ou vasos sanguíneos, ancoramento no sistema capilar do órgão alvo e extravasamento.

A MATRIZ EXTRACELULAR E SUA IMPORTÂNCIA PARA A ANGIOGÊNESE

As matrizes extracelulares são constituídas por malha de diferentes combinações de colágenos, proteoglicanos, ácido hialurônico e várias glicoproteínas como a fibronectina e a laminina, que preenchem a maioria dos espaços intercelulares (Ruoslahti, Pierschbacher, 1987; Haubner, Finsinger, Kessler, 1997).

A adesão das células à vizinhança das matrizes extracelulares determina o seu formato, mantém a função celular adequada e a integridade do tecido. A matriz extracelular também auxilia o ancoramento das células, sinaliza o tráfego celular e dirige a diferenciação celular. O controle do comportamento celular parece originar em resposta às interações célula-matriz. As proteínas adesivas da matriz não apenas promovem a adesão celular como também estimulam a migração celular. A matriz também pode exercer seu efeito na diferenciação celular agindo como fator indutor, fazendo com que as células capazes respondam à ativação por hormônios ou por outros fatores solúveis, ou a própria matriz pode fornecer um sinal indutivo (Ruoslahti, Pierschbacher, 1987).

A adesão celular exerce papel importante na transdução de sinal e, portanto, está envolvida na transferência de informação entre células. A ligação das células à matriz extracelular também sinaliza para dentro do citoplasma e leva a reorientação do citoesqueleto e a mu-

danças no comportamento celular como, por exemplo, no estímulo à proliferação celular (Haubner, Finsinger, Kessler, 1997; Clark, Brugge, 1995). Existem quatro classes principais de receptores celulares envolvidos nas interações célula-célula e célula-matriz: caderinas, selectinas, superfamília de receptores de imunoglobulinas e integrinas (Ruoslahti, Pierschbacher, 1987; Haubner, Finsinger, Kessler, 1997).

A ANGIOGÊNESE

A formação de novos vasos capilares a partir de células endoteliais é essencial ao desenvolvimento de órgãos, cicatrização de ferimentos e nos processos inflamatórios. A angiogênese e a metástase tumoral são processos funcionalmente relacionados, pois ambos envolvem uma tríade de eventos fisiopatológicos: mobilidade celular, proteólise tecidual e proliferação celular (Liotta, Steeg, Steller-Stevenson, 1991). O processo de angiogênese envolve série de etapas (Figura 1). As células endoteliais do vaso-mãe são estimuladas pelas citocinas angiogênicas. A lâmina basal é degradada pela ação de proteases da matriz extracelular e liberadas pelo endotélio. As células endoteliais migram para o estroma perivascular, proliferam e iniciam o brotamento capilar. A direção da migração é apontada para a fonte dos estímulos angiogênicos. O broto formado expande e assume a forma tubular e uma nova lâmina basal se desenvolve. A proliferação endotelial permite a extensão dos túbulos microvasculares que se unem por anastomose e dão origem à cadeia circulatória funcional (Liotta, Steeg, Steller-Stevenson, 1991; Giannis, Rübsan, 1997).

Os eventos adesivos requeridos na angiogênese são rigorosamente regulados. Eles são limitados às células afetadas, ativados por um curto período de tempo (alguns dias) e, logo após, suprimidos completamente. No endotélio em “repouso” (sem atividade angiogênica), a integrina $\alpha\beta 3$ praticamente não é detectada. Na angiogênese induzida por citocinas ou por tumores, entretanto, sua expressão é intensamente estimulada (Brooks, 1996; Liekens, De Clercq, Neyts, 2001). A falta de interações célula-matriz específicas induz a sinal apoptótico nas células endoteliais envolvidas na angiogênese e, portanto, previne a neovascularização. Em vários modelos animais, foi demonstrado que antagonistas de integrina bloqueiam a angiogênese induzida por fatores de crescimento e tumores (Eliceiri, Cheresch, 2001; Brassard *et al.*, 1999; Cheresch, 1998).

A angiogênese não está envolvida apenas no desenvolvimento e disseminação dos tumores, mas também em vários processos fisiológicos e patológicos. Ela é essencial no desenvolvimento dos órgãos, na cura de ferimentos e em processos inflamatórios, sendo rigorosamente regulada

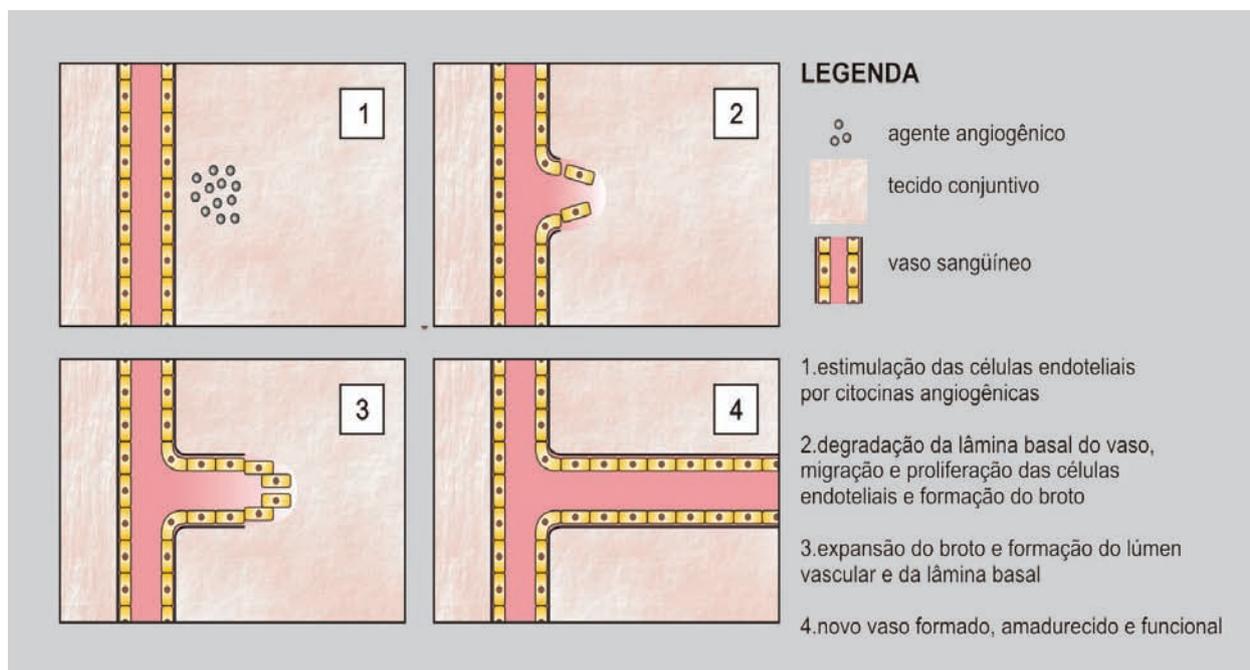


FIGURA 1 - Representação esquemática da angiogênese.

pelo organismo (Haubner, Finsinger, Kessler, 1997). A angiogênese também está envolvida em doenças como artrite reumatóide e retinopatia diabética (Haubner, Finsinger, Kessler, 1997).

AS INTEGRINAS

As integrinas são uma família de macromoléculas mediadoras da adesão celular e reguladoras da angiogênese e da homeostasia vasculares. Fornecem interação física com a matriz extracelular necessária para a adesão, migração e posicionamento celulares e a indução de eventos sinalizadores essenciais para a sobrevivência, proliferação e diferenciação celular.

As integrinas são uma família de glicoproteínas transmembrana heterodiméricas, consistindo de duas sub-unidades α (150 a 180 KD) e β (~90 KD), associadas não-covalentemente. Atualmente, são conhecidos dezoito tipos de subunidades α e oito tipos de subunidades β que, combinadas, constituem pelo menos 24 integrinas já descritas (Xiong *et al.*, 2001; Tucker, 2002). O contato entre as sub-unidades α e β envolve suas metades amino-terminais que, juntas, formam uma “cabeça” globular e as porções remanescentes formam duas caudas em formato cilíndrico que transpassam a membrana plasmática. Ambas sub-unidades α e β apresentam um pequeno domínio transmembrana (20 a 30 resíduos) e uma região intracelular (20 a 50 resíduos) (Haubner,

Finsinger, Kessler, 1997). Existem duas séries principais de integrinas, aquelas onde a sub-unidade α contém uma região extra de ~180 aminoácidos, o domínio α -A, e aquelas que não têm (Figura 2). O domínio α -A é formado por um conjunto de aminoácidos próximos à função amino-terminal, capaz de se ligar a cátions bivalentes, como Ca^{2+} ou Mg^{2+} , representando o sítio de adesão dependente de íon metálico - MIDAS. A sub-unidade β também possui um domínio tipo-A, o domínio β A. Para integrinas com dois domínios A, o domínio α A é que participa da ligação com o ligante e pouco se sabe da função do domínio β A. Para as integrinas que possuem apenas o domínio β A, este é responsável pela ligação com o ligante (Xiong *et al.*, 2001).

Como os outros receptores, as integrinas transmitem sinais para o interior da célula (chamada sinalização “de fora para dentro”), por meio dos domínios citoplasmáticos. Os domínios da subunidade β conectam-se a filamentos de actina do citoesqueleto por meio de proteínas intracelulares como talina, vinculina e α -actinina (Haubner, Finsinger, Kessler, 1997). Nesse processo, regulam a organização do citoesqueleto, ativam cascatas de quinases sinalizadoras e modulam o ciclo celular. Algumas integrinas são expressas constitutivamente, ou seja, são produzidas normalmente pelo organismo em condições fisiológicas. Outras, entretanto, possuem regulação diferenciada e respondem a estados de ativação das células, por exemplo, por citocinas

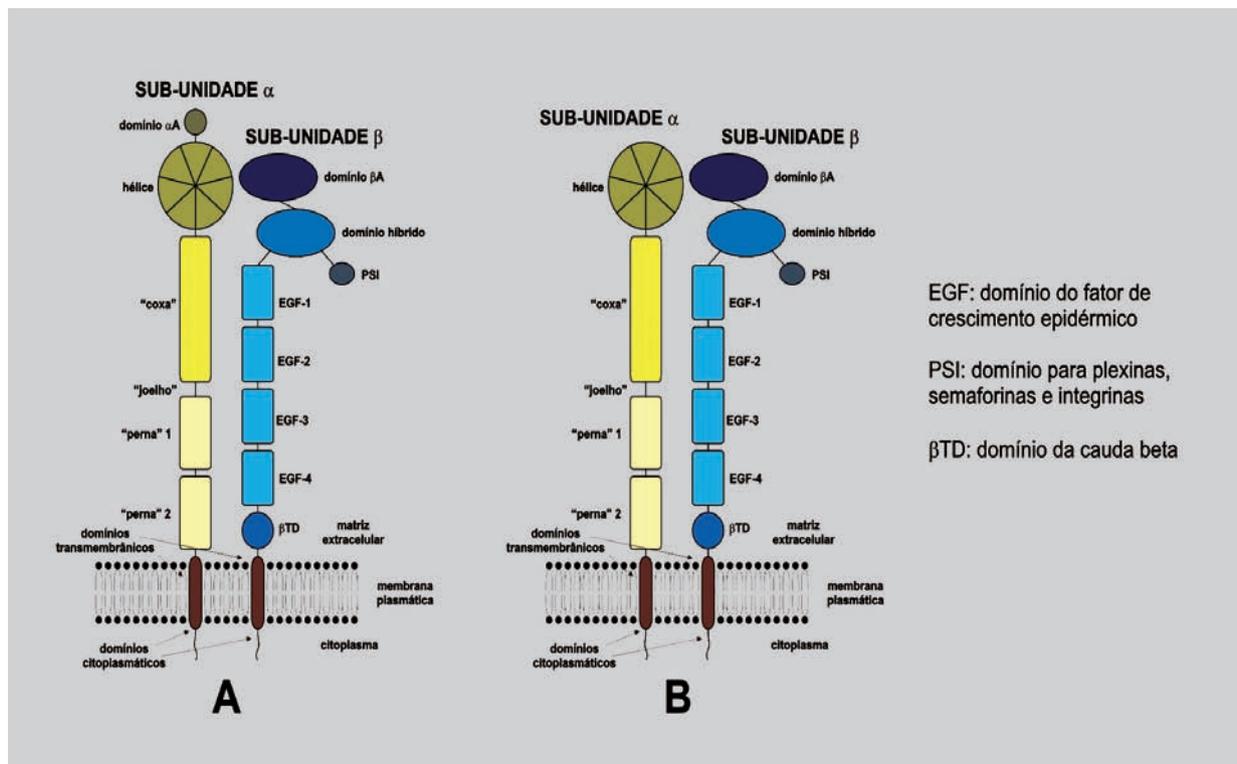


FIGURA 2 - Representação esquemática da estrutura das sub-unidades α e β das integrinas que existem em duas classes diferentes: uma com um domínio α -A adicional na sub-unidade α (A) e outra sem o domínio α A na sub-unidade α (B). [adaptado de Seow *et al.*, 2002]

angiogênicas [VEGF (*vascular endothelial growth factor*), TGF β (*tumor growth factor* β), bFGF (*basic fibroblast growth factor*)] (Xiong *et al.*, 2001; Brooks, 1996; Seow, 2002). Esta regulação da atividade “de dentro para fora” protege o hospedeiro da adesão patológica mediada pela integrina. Tanto a sinalização “de fora para dentro” quanto a “de dentro para fora” estão associadas a alterações conformacionais distintas no segmento extracelular das integrinas. Estas mudanças variam com o tipo e natureza do ligante e são moduladas por cátions divalentes (Xiong *et al.*, 2001).

A família das integrinas β 3 (CD61) consiste dos receptores: α Ib β 3 (CD41/CD61), encontrado em plaquetas e megacariócitos, e α v β 3 (CD51/CD61), mais amplamente distribuído.

A integrina α Ib β 3 possui afinidade maior pelo fibrinogênio e está envolvida nos mecanismos de hemostasia (Erb *et al.*, 1997; Xue *et al.*, 1997). O bloqueio da agregação plaquetária pelo antagonismo da integrina α Ib β 3 constitui importante estratégia terapêutica (Xue *et al.*, 1997). Além disso, a integrina α Ib β 3 também é expressada em certos tipos de tumores (Haubner, Finsinger, Kessler, 1997).

A integrina α v β 3

Durante o remodelamento vascular e a angiogênese, as células endoteliais aumentam a expressão de vários constituintes da sua superfície que potencializam a invasão e proliferação celular, dentre elas a integrina α v β 3 (Neri, Bicknell, 2005). Além de exercer um papel importante na angiogênese (Brooks, 1996), em diferentes níveis da metástase tumoral (Varner, Cheresch, 1996; Filardo *et al.*, 1995; Connell, 2000), a integrina α v β 3 atua na fagocitose de células em apoptose, no remodelamento ósseo e na falência renal aguda. A integrina α v β 3, também conhecida por receptor de vitronectina, pode ser encontrada na maioria das células originárias do mesênquima (Haubner, Finsinger, Kessler, 1997). Possui afinidade por inúmeras proteínas adesivas como vitronectina, fibronectina, fibrinogênio, laminina, colágeno e fator de von Willebrand, colágeno tipo I e osteopondina (Varner, Cheresch, 1996).

Aquelas integrinas que estão envolvidas na migração celular são altamente expressadas nas células tumorais, como a integrina α v β 3, que é responsável pela ligação das proteínas com a matriz extra-celular (Haubner, Finsinger, Kessler, 1997; Tarabozetti, Margosio, 2001). Em particular, a integrina α v β 3 é frequentemente expressada em

osteossarcomas, neuroblastomas, carcinomas de pulmão, mama, próstata e bexiga, glioblastomas e melanomas invasivos. Evidências clínicas e pré-clínicas indicam que as integrinas vasculares podem ser alvos terapêuticos válidos e que a inibição da função da integrina $\alpha v \beta 3$ suprime eficientemente a angiogênese e inibe a progressão do tumor (Alghisi, Ruegg, 2006).

A estrutura tridimensional do segmento extra-celular da integrina $\alpha v \beta 3$ foi determinada por Xiong e colaboradores (Xiong *et al.*, 2001), que, posteriormente, também determinaram a estrutura do seu complexo com um ligante ciclopeptídico (Xiong *et al.*, 2002). Os segmentos NH_2 -terminais das unidades $\alpha v \beta 3$ formam uma “cabeça” ovóide da qual emergem duas “caudas” quase paralelas (Figuras 2B e 3A). A cabeça consiste de uma hélice β de sete lâminas da sub-unidade αv e dos domínios βA e híbrido tipo imunoglobulina da sub-unidade $\beta 3$. A cauda αv é composta por três domínios *sandwich* de folhas β : um domínio “coxa” e dois domínios muito similares que formam o módulo “perna”. A cauda $\beta 3$ consiste de um domínio PSI (domínio para plexinas, semaforinas e integrinas), quatro domínios EGF (fator de crescimento epidérmico) e um domínio cauda- β (βTD). As caudas α e β dobram-se para trás em um ângulo de 135° , formando uma estrutura em forma de V, com um joelho entre o domínio “coxa” e o módulo “perna” da αv . Dois sítios de ligação com íon metálico são encontra-

dos na hélice β da sub-unidade αv . No domínio βA da sub-unidade $\beta 3$ encontra-se um sítio de adesão dependente de íon metálico (MIDAS), que participa da interação com o ligante.

A interação dos ligantes desencadeia rearranjos nas estruturas terciárias e quaternárias nas integrinas, necessários à sinalização celular. Os ligantes complexam-se na interface principal entre as sub-unidades αv e $\beta 3$ e fazem contatos extensivos com ambas. Os rearranjos terciários ocorrem no βA , o domínio de ligação da sub-unidade $\beta 3$. No complexo, βA adquire dois cátions, um dos quais faz contato direto com o ligante e outro que estabiliza a superfície de ligação com o ligante (Figura 3B). O MIDAS não é ocupado pelo íon metálico na conformação inativa da integrina. Durante a interação com o ligante, o Glu^{220} move-se para fora da região MIDAS, permitindo a coordenação de um cátion divalente nesta posição. Adicionalmente um outro sítio de coordenação de íon metálico é criado a 6 \AA do MIDAS, o sítio de ligação de metal associado ao ligante (LIMBS), que complexa o outro oxigênio carboxílico do Glu^{220} , prevenindo que este resíduo reocupe a posição no MIDAS. Adjacente ao MIDAS existe um outro sítio de ligação a metal (ADMIDAS), que sofre rearranjos conformacionais mínimos durante a interação com o ligante (Meyer *et al.*, 2006). A interação com o ligante induz a pequenas mudanças na orientação relativa entre as sub-unidades αv e $\beta 3$.

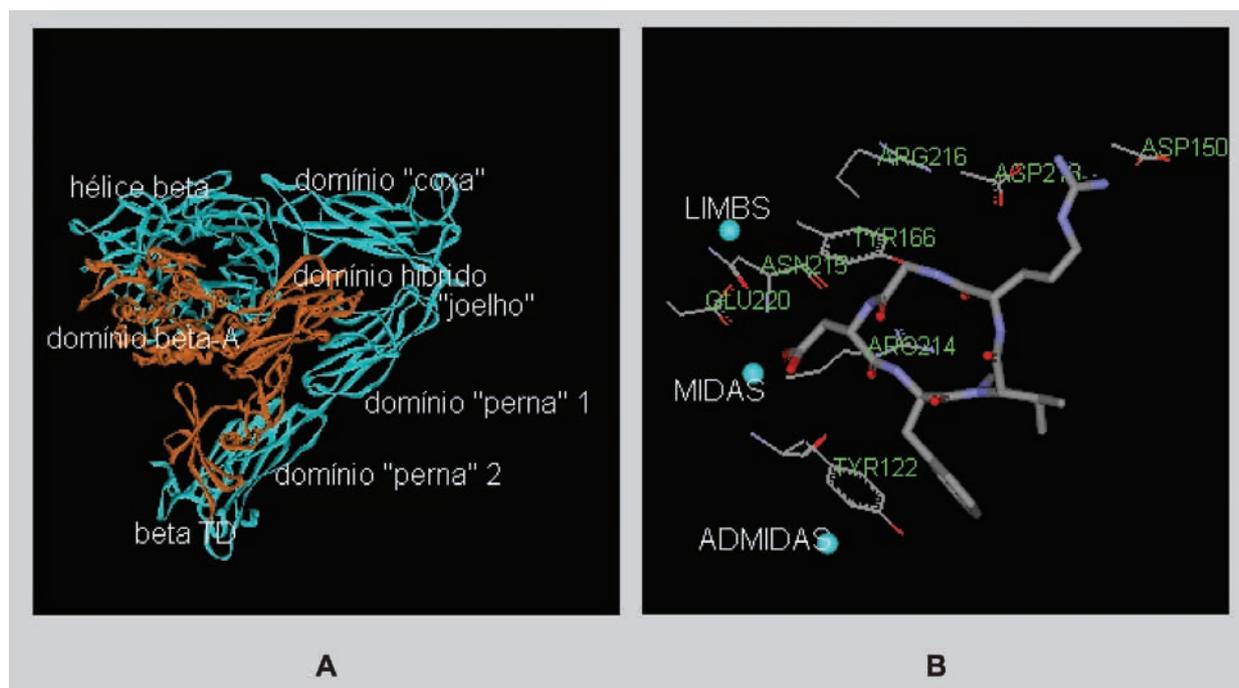


FIGURA 3 - A- Diagrama de fitas da estrutura tridimensional do segmento extra-celular da integrina $\alpha v \beta 3$ (αv mostrada em azul e $\beta 3$ em vermelho). B- Estrutura tridimensional da cilengitida (**8**) complexada à integrina $\alpha v \beta 3$. [Construídos, respectivamente, a partir da estrutura com códigos PDB 1JV2 (Xiong *et al.*, 2001) e 1L5G (Xiong *et al.*, 2002)]

Os mecanismos propostos para ativação das integrinas são ainda controversos, mas parecem envolver duas diferentes conformações do receptor: uma em que os domínios citoplasmático e transmembrânico das subunidades α e β estão alinhados e próximos um ao outro e os segmentos extracelulares estão dobrados em forma de “V” com um “joelho” entre os módulos “coxa” e “perna” (proposta como a conformação inativa) e outra em que os domínios citoplasmático e transmembrânico alinham-se separados um do outro e os segmentos extracelulares assumem uma conformação mais vertical (considerada como a conformação ativa) (Figura 4) (Li *et al.*, 2005; Xiong *et al.*, 2001; Rüegg, Mariotti, 2003). O estado de repouso inativo das integrinas, em que apresentam baixa afinidade por ligantes, é ativado de dentro da célula por meio das regiões citoplasmáticas e transmembrana (sinalização de “dentro para fora”). A ativação pode ser induzida pela ligação da talina à região citoplasmática da sub-unidade β e resulta em uma certa separação dos domínios citoplasmáticos e levantamento e alinhamento das regiões extra-celulares (Figura 4). O movimento das hélices do domínio β A leva ao reposicionamento dos íons metálicos, causando aumento de afinidade pelos ligantes extra-celulares. Após a interação com ligantes extracelulares, ocorrem mudanças na mobilidade lateral das integrinas na membrana plasmática, introduzindo agrupamento de integrinas. Estes agrupamentos parecem ser importantes para desencadear a ativação de diferentes cascatas de sinalização citoplasmáticas (sinalização de “fora para dentro”) (Meyer *et al.*, 2006).

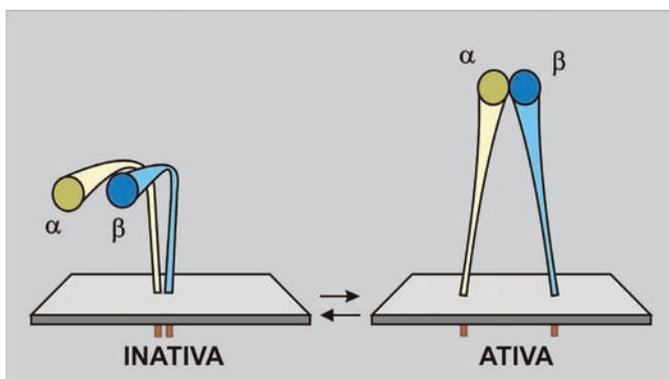


FIGURA 4 - Mecanismo proposto para ativação das integrinas.

As integrinas sinalizam série de eventos, entretanto, não possuem atividade enzimática intrínseca. A transdução do sinal pela interação do ligante depende, portanto, do recrutamento de moléculas sinalizadoras cruciais, em particular, quinases de proteínas, quinases de lipídeos, GTPases e fosfatases. Vários caminhos sinalizadores

ativados por integrinas também são ativados por receptores de fatores de crescimento (Rüegg, Mariotti, 2003).

A SEQUÊNCIA RGD

As proteínas adesivas, embora estruturalmente diferentes, requerem seqüências de reconhecimento aproximadamente semelhantes para se ligarem às integrinas. Essas proteínas possuem em comum um resíduo de ácido aspártico ou de ácido glutâmico exposto, geralmente, em dobras estendidas e flexíveis. Das seqüências de aminoácidos que contêm ácido aspártico capazes de se ligarem às integrinas, a mais freqüente e mais estudada delas é a seqüência *arginina-glicina-ácido aspártico* (*Arg-Gly-Asp* ou *RGD*) (Figura 5), também conhecida como “sítio universal de reconhecimento celular” (Haubner, Finsinger, Kessler, 1997; Arnaout, Goodman, 2002; Xiong *et al.*, 2002).

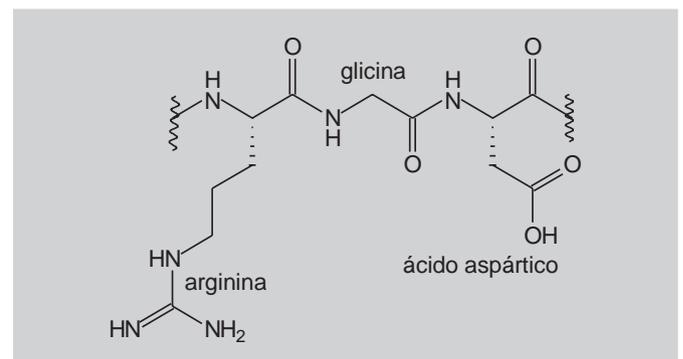


FIGURA 5 - A seqüência tripeptídica RGD.

Várias proteínas adesivas, como laminina, fibronectina, vitronectina, fibrinogênio e colágeno, contêm a seqüência RGD e podem ter sua interação com as integrinas inibida por antagonistas desses ligantes (Haubner, Finsinger, Kessler, 1997; Ruoslahti, Pierschbacher, 1987; Sasaki, Timpl, 2001), denominados genericamente antagonistas da seqüência RGD ou, também, antagonistas de integrinas. A seletividade destas proteínas adesivas às várias integrinas é bastante diversa. Este fato pode ser explicado pela existência de sítios de ligação adicionais e pelas diferentes conformações que a seqüência RGD pode apresentar nas diferentes estruturas protéicas (Haubner, Finsinger, Kessler, 1997; Brooks, 1996).

OS ANTAGONISTAS DE INTEGRINAS

A seqüência RGD é a base para o desenvolvimento de antagonistas de integrinas. Até meados da década de 1990, as buscas por análogos da seqüência RGD foram direcionadas para antagonistas da integrina α I**IIb** β 3 poten-

tes, seletivos e com elevada biodisponibilidade oral. Foram obtidos antagonistas não-peptídicos valiosos, contribuindo para o tratamento de doenças tromboembólicas. Com o progresso dessas pesquisas e as descobertas sobre a importância da angiogênese para o crescimento e a metástase tumoral, grandes esforços passaram a ser feitos também na obtenção de antagonistas seletivos da integrina $\alpha v \beta 3$ (Giannis, Rübsam, 1997). Já foram descritos vários inibidores desta integrina com efeitos diretos na prevenção da metástase, crescimento e angiogênese tumoral. Dois se encontram em triagem clínica para o câncer, o anticorpo monoclonal humanizado para $\alpha v \beta 3$ (VitaxinTM, desenvolvido pelo Scripps Research Institute) (Eskens *et al.*, 2003; Raguse *et al.*, 2003) e o peptidomimético da seqüência RGD sintético, ciclo(L-arginil-glicil-L-aspartil-D-fenilalanil-N-metil-L-valil), (cilengtida, **8**, na Figura 6, desenvolvido pela Merck KGaA). (Tucker, 2002; Liekens, De Clercq, Neyts, 2001; Burke, Denardo, 2001)

Diversos ciclopeptídeos baseados na seqüência RGD foram sintetizados e suas atividades *in vitro* frente às integrinas $\alpha v \beta 3$ e $\alpha IIb \beta 3$ foram avaliadas: **1** (Aumailley *et al.*, 1991; Dechansreiter *et al.*, 1999; Pfaff *et al.*, 1994), **2** e **3** (Peishoff *et al.*, 1992), **4** (Pfaff *et al.*, 1994), **5** e **6** (Bach *et al.*, 1996), **7** (Burgess, Lim, Mousa, 1996), **8** (Dechansreiter *et al.*, 1999), **9** (Casiraghi *et al.*, 2005) e **10** (Belvesi *et al.*, 2006) (Figura 6). A obtenção destes peptídeos cíclicos forneceu grandes contribuições para a investigação da seletividade dos antagonistas de integrinas. A ciclização é uma das formas de se conferir restrições conformacionais e, se a estrutura com conformação restrita é semelhante à conformação bioativa (capaz de interagir com o receptor), ocorre aumento da afinidade e da seletividade (Haubner, Finsinger, Kessler, 1997).

Estudos de relação estrutura-atividade (SAR) levaram à definição do farmacóforo dos antagonistas da seqüência RGD: a carboxila do resíduo de ácido aspártico e a amidina do resíduo de arginina, posicionados a uma distância adequada (Haubner, Finsinger, Kessler, 1997). A distância entre os grupos amidino e carboxilato nestas moléculas foi estimada com o uso de técnicas experimentais, como RMN e difração por raios X, e por modelagem molecular usando, por exemplo, simulações com dinâmica molecular. Nos peptídeos cíclicos, de modo geral, a seqüência RGD assume conformações preferencialmente em dobras mais fechadas nos antagonistas seletivos para a integrina $\alpha v \beta 3$. Os carbonos β dos resíduos de Arg e Asp mostraram-se mais próximos nos antagonistas seletivos para a integrina $\alpha v \beta 3$ do que nos antagonistas da integrina $\alpha IIb \beta 3$, nos quais a seqüência RGD assumiu conformações consideravelmente menos dobradas ou, mesmo, completamente distendidas.

As informações advindas dos estudos conformacionais de peptídeos auxiliaram o planejamento de novos protótipos não-peptídicos. Os oligopeptídeos estão sujeitos à ação enzimática das proteases e, em geral, apresentam baixa biodisponibilidade oral. Na busca pela melhoria de propriedades farmacocinéticas, como a estabilidade *in vivo*, o uso de peptidomiméticos tem sido cada vez mais pesquisado. Mais recentemente, inibidores da integrina $\alpha v \beta 3$ não-peptídicos têm sido descritos. Estas substâncias possuem um grupo suporte central como, por exemplo, anéis aromáticos, heteromáticos e heterociclos, no qual estão ligados apêndices carregando grupos carboxilato e guanidino ou isósteros (Figura 7). Dentre os sistemas cíclicos que têm sido utilizados como suporte destacam-se o 1,4-benzodiazepínico [**11** (Keenan *et al.*, 1997) e **12** (Miller *et al.*, 2000)], o nitrofenílico e o fenílico contendo sulfonamidas na posição α à carboxila [**13** (Nicolaou *et al.*, 1998), **14** (Ishikawa *et al.*, 2006), **15** (Kubota *et al.*, 2006) e **16** (Burnett *et al.*, 2005)], o isoxazolinico [**17** (Pitts *et al.*, 2000)], o indazólico 1,5-dissubstituído [**18** (Batt *et al.*, 2000)], o benzotiofênico [**19** (Marugán *et al.*, 2005)], o benzoxazólico [**20** (Marugán *et al.*, 2005)], o indólico [**21** (Marugán *et al.*, 2005), **22** (Marugán *et al.*, 2005) e **23** (Leonard *et al.*, 2005)], o 4-oxoquinolínico [**24** (Onthank *et al.*, 2005)] e o piperazínico [**25** (Iwama *et al.*, 2004)]. Apesar de os valores de IC_{50} e K_i não serem comparáveis, quando se analisam estes para cada uma das substâncias apresentadas na Figura 7, percebe-se a seletividade para a interação com a integrina $\alpha v \beta 3$ em relação à $\alpha IIb \beta 3$ que, em casos como **11** e **25**, chega a ser da ordem de dez mil vezes maior.

Nos estudos conformacionais realizados por Aumailley e colaboradores (1991), Peishoff e colaboradores (1992), Burgess e colaboradores (1996) e Bach e colaboradores (1996), para os ciclopeptídeos **1**, **3**, **5**, **6** e **7** (Tabela I) foram avaliadas a distância entre os carbonos β dos aminoácidos arginina e ácido aspártico- C β (Arg)-C β (Asp). Para os peptídeos **3** e **5**, antagonistas preferenciais da integrina $\alpha IIb \beta 3$, foram encontradas as distâncias de 9,8 e 8,6 Å, respectivamente, enquanto que para os peptídeos **1**, **6** e **7**, que são antagonistas preferenciais da integrina $\alpha v \beta 3$, os valores apresentados para a mesma distância mostraram-se consideravelmente menores (6,6, 5,8 e 6,4 Å, respectivamente). De acordo com estes estudos supôs-se que a distância entre os grupos farmacofóricos das moléculas seria menor para os antagonistas preferenciais da integrina $\alpha v \beta 3$ do que para aqueles que inibem preferencialmente a integrina $\alpha IIb \beta 3$, considerando que os carbonos β , a partir dos quais foram feitas as medidas, estejam ligados às porções rígidas destes peptídeos (Aumailley *et al.*, 1991; Peishoff *et al.*, 1992; Burgess, Lim, Mousa, 1996; Bach *et al.*, 1996; Katada *et al.*, 1997).

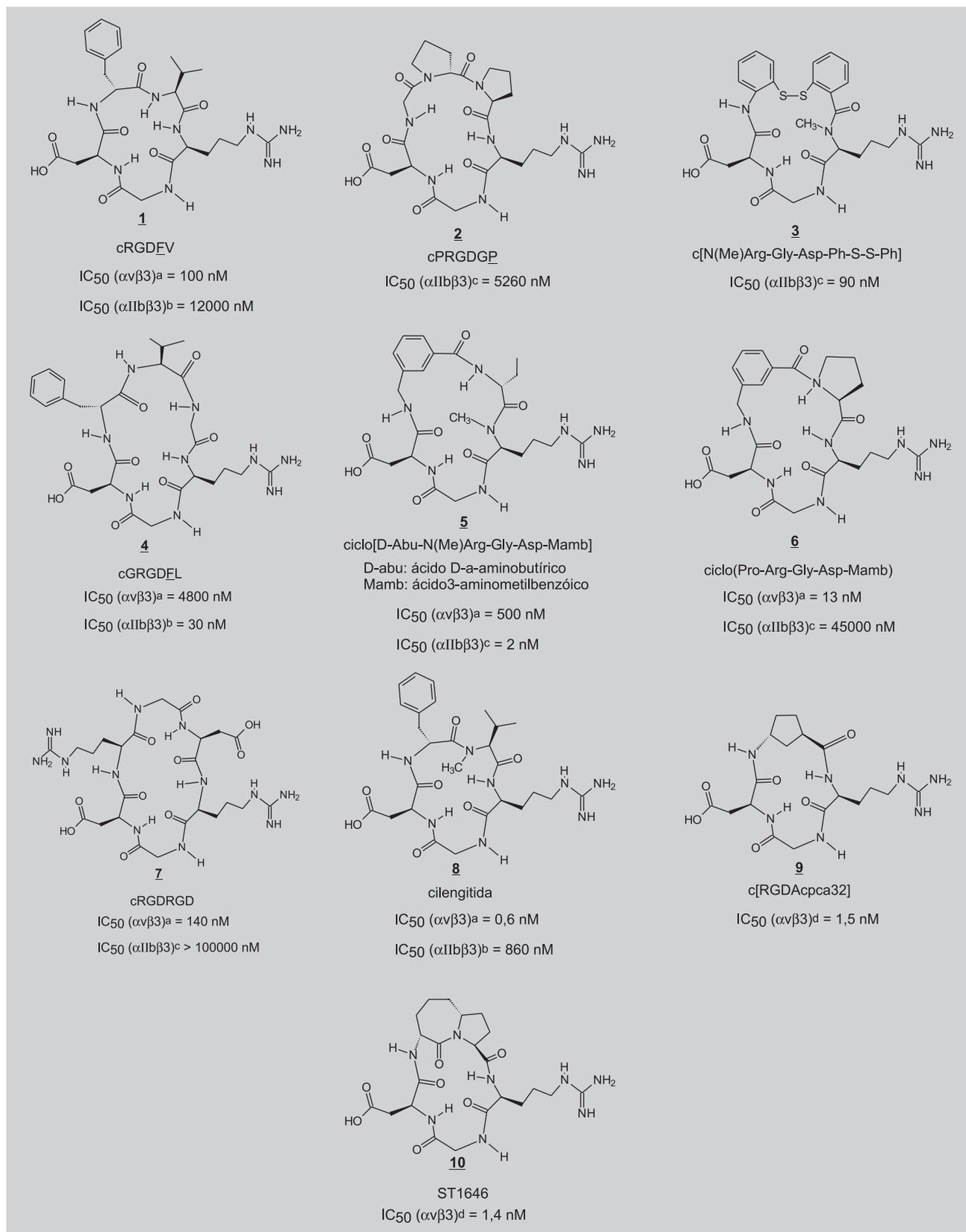


FIGURA 6 - Ciclopeptídeos inibidores das integrinas $\alpha IIb\beta 3$ e $\alpha v\beta 3$ [IC₅₀ = concentração que inibiu 50%: ^a da ligação da vitronectina à integrina $\alpha v\beta 3$; ^b da ligação do fibrinogênio à integrina $\alpha IIb\beta 3$; ^c da ligação do fibrinogênio a plaquetas; ^d da ligação da equistatina à integrina $\alpha v\beta 3$].

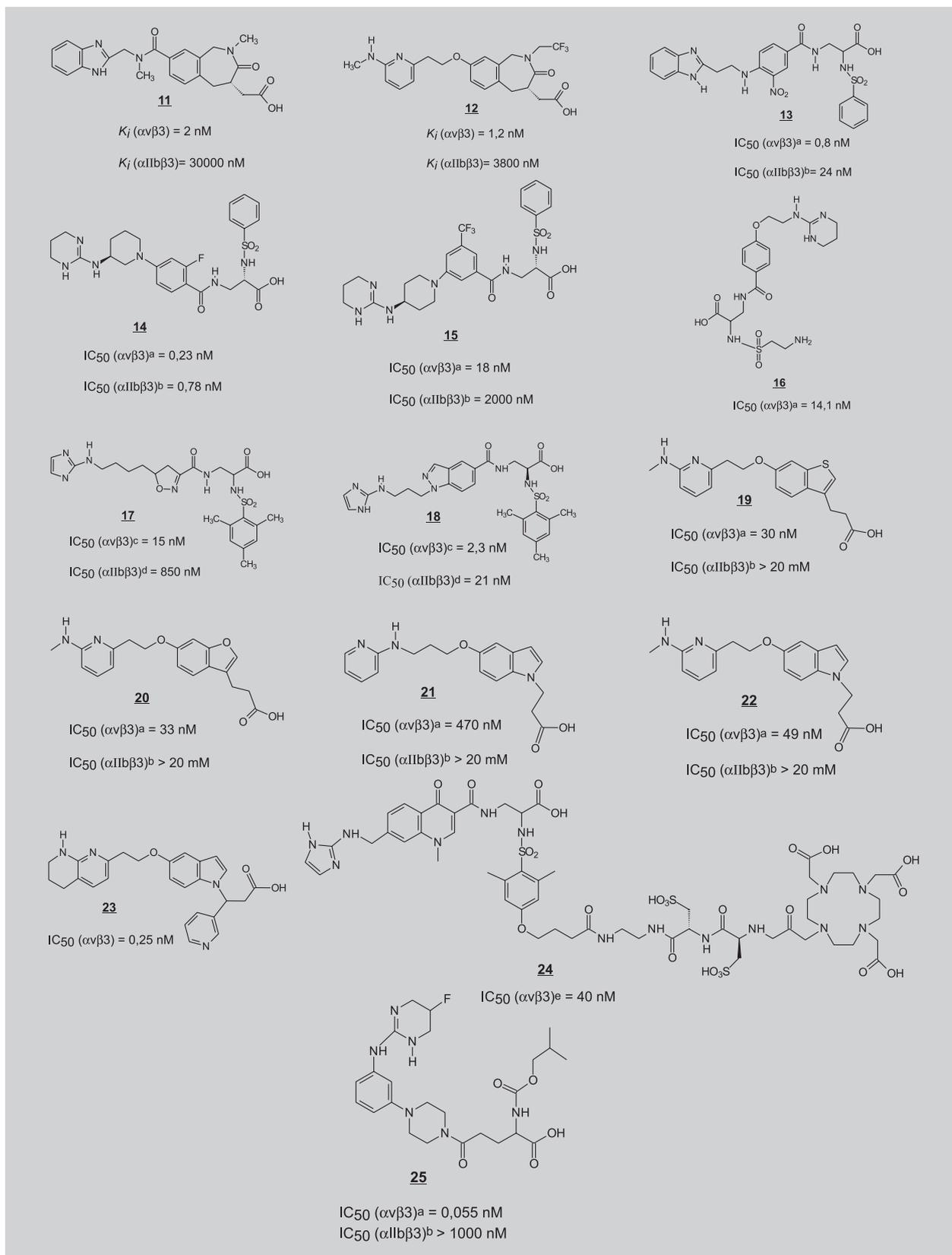
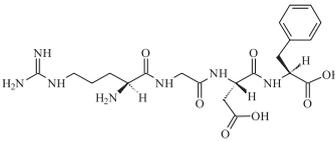
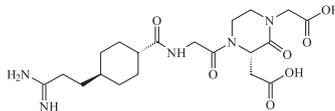
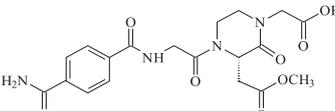
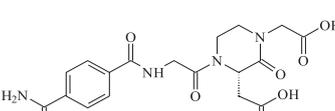


FIGURA 7 - Inibidores da integrinas $\alpha v \beta 3$ não-peptídicos [IC_{50} = concentração que inibiu 50%: ^a da ligação da vitronectina à integrina $\alpha v \beta 3$; ^b da ligação do fibrinogênio à integrina $\alpha IIb \beta 3$; ^c da ligação da vitronectina com células 293b₃; ^d da ligação do fibrinogênio a plaquetas; ^e da ligação da vitronectina com células endoteliais].

Para o peptídeo **26**, antagonista da integrina α IIb β 3, foi relatada a distância estimada entre os carbonos do grupo carboxilato e guanidino entre 12-13 Å (Katada *et al.*, 1997) (Tabela I). Distâncias semelhantes foram relacionadas com a atividade inibitória da agregação plaquetária revelada pelos compostos **27**, **28**, **29** e **30** (Sugihara *et al.*, 1998) (Tabela I).

Na cilengtida (**8**) observou-se, por RMN e por estudos teóricos usando métodos de geometria de distância e de dinâmica molecular, uma conformação menos dobrada, em que a distância entre os carbonos β variou entre 8,0 e 8,5 Å (Dechansreiter *et al.*, 1999). Essa conformação menos dobrada do que havia sido suposto para os inibidores da

TABELA I - Relação entre a atividade frente às integrinas α v β 3 e α IIb β 3 e as distâncias estudadas entre os grupos farmacofóricos

Composto	IC ₅₀ (nM)**		Distância 1*(Å)	Distância 2*(Å)	Referência
	α v β 3	α IIb β 3			
1 cRGDFV	100 ^a	12000 ^b	6,6	-	Amalley <i>et al.</i> , 1991
3 c[N(Me)Arg-Gly-Asp-S-S-Ph]	-	900 ^c	9,8	-	Peishoff <i>et al.</i> , 1992
5 c[DABu-N(Me)Arg-Gly-Asp-Mamb]	500 ^a	2 ^c	9,6	-	Bach <i>et al.</i> , 1996
6 c(L-Pro-Arg-Gly-Asp-Mamb)	13 ^a	45000 ^c	6,4	-	Bach <i>et al.</i> , 1996
7	140 ^a	>100000 ^c	5,8	-	Burgess <i>et al.</i> , 1996
8 Cilengtida	0,6 ^a	800 ^b	8,0-8,5	-	Dechansreiter <i>et al.</i> , 1999
 26 PSRGDW	-	870 ^c	-	12-13	Katada <i>et al.</i> , 1997
 27	-	110 ^c	-	5-13	Sugihara <i>et al.</i> , 1998
 28	-	20 ^c	-	10-13	Sugihara <i>et al.</i> , 1998
 29	-	0,49 ^c	-	11-13	Sugihara <i>et al.</i> , 1998
 30	-	20 ^c	-	5-13	Sugihara <i>et al.</i> , 1998

*Distância 1: distância entre os carbonos β dos aminoácidos arginina e ácido aspártico [C² (Arg)-C² (Asp)]; Distância 2: distância entre os carbonos do grupo carboxilato e guanidino (ou isómero); **concentração que inibiu 50% da(s) integrina(s) no ensaio: ^a da ligação da vitronectina à integrina α v β 3; ^b da ligação do fibrinogênio à integrina α IIb β 3; ^c da ligação do fibrinogênio a plaquetas.

integrina $\alpha v \beta 3$, provavelmente, está mais próxima da conformação ativa e, portanto, justificaria o aumento da atividade. A cilengtida é o ligante presente no complexo com a integrina $\alpha v \beta 3$, cuja estrutura foi determinada por Xiong e colaboradores (2002). Na estrutura cristalográfica do complexo a distância $C\beta$ (Arg)- $C\beta$ (Asp) da cilengtida é de 8,8 Å e entre os carbonos dos grupos carboxilato e guanidino é de 13,7 Å.

MODELOS FARMACOFÓRICOS PARA OS ANTAGONISTAS DA INTEGRINA $\alpha v \beta 3$

Quando a estrutura cristalográfica de um alvo molecular é obtida, um dos estudos importantes é a realização de experimentos de modelagem molecular para obter um modelo de como a proteína e moléculas de interesse interagem. Estes modelos ajudam no reconhecimento das interações com resíduos do alvo molecular e permitem identificar regiões específicas das moléculas ligantes adequadas à modificações que irão permitir melhor ajuste ao sítio ativo. O objetivo principal da modelagem molecular é suprir conhecimento e percepção para o desenvolvimento mais racional e, portanto, mais rápido de fármacos mais potentes e seletivos.

A estrutura tridimensional do complexo entre a integrina $\alpha v \beta 3$ e a cilengtida (8), obtida por difração de raios X, revelou que o ciclopentapeptídeo se insere em uma fenda entre os domínios hélice β da sub-unidade αv e βA da sub-unidade $\beta 3$ (Xiong *et al.*, 2002) (Figuras 3B e 8). A sequência Arg-Gly-Asp, ou RGD, faz o principal contato com a integrina e cada resíduo participa extensivamente da interação, que inclui cerca de 45% da área total do ciclopentapeptídeo. As cadeias laterais da Arg e Asp apontam para direções opostas, interagindo exclusivamente com os domínios hélice β e βA , respectivamente. Os cinco átomos $C\alpha$ do ciclopentapeptídeo formam um pentágono levemente distorcido. O grupo guanidino da cadeia lateral do resíduo Arg do ciclopentapeptídeo está preso por uma ponte salina bidentada com Asp²¹⁸ e por uma ponte salina adicional com Asp¹⁵⁰. Estes contatos levam a maior parte da porção superior da cadeia lateral da Arg a ficar exposta ao solvente. Os contatos entre o Asp do ciclopeptídeo ligante e o subdomínio βA envolvem principalmente o grupo carboxilato da cadeia lateral em uma rede extensiva de interações polares. Um dos oxigênios do carboxilato faz contacto com o íon metálico do MIDAS em βA . O segundo oxigênio forma ligações de hidrogênio com os grupos amida da cadeia principal dos resíduos Tyr¹²² e Asn²¹⁵ e também faz contato com a cadeia lateral de Arg²¹⁴. A porção hidrofóbica da cadeia lateral do Asp faz contatos com o carbono β do Asn²¹⁵. Diferentemente do resíduo Arg, a

cadeia lateral do Asp está completamente envolvida pelo complexo. O resíduo de glicina, que completa a sequência de ligação RGD, estende-se na interface das sub-unidades αv e $\beta 3$. Este resíduo faz vários contatos com ambas as sub-unidades, sendo o principal aquele com o oxigênio carbonílico do Arg²¹⁶. Os dois resíduos restantes do ciclopentapeptídeo ligante estão apontados para fora da interface α - β e não são importantes para a interação do ligante com a integrina (Xiong *et al.*, 2002).

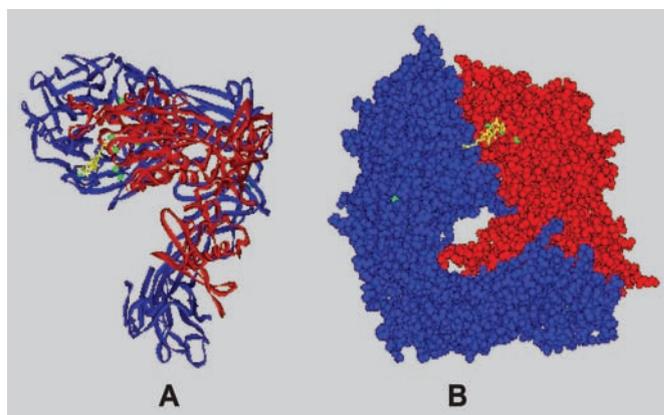


FIGURA 8 - Estrutura da integrina $\alpha v \beta 3$ (A-diagrama de fitas e B-estrutura CPK, αv em azul e $\beta 3$ em vermelho) complexada com o ciclopentapeptídeo cilengtida (amarelo). Em verde, os átomos metálicos. [Construída a partir da estrutura código PDB 1L5G (Xiong *et al.*, 2002)]

Partindo da estrutura cristalina do segmento extracelular da integrina $\alpha v \beta 3$ ligada ao ciclopentapeptídeo cilengtida (8) (Xiong *et al.*, 2002), o grupo de Kessler (Marinelli *et al.*, 2003) gerou modelos estruturais para a interação de ligantes conhecidos por meio de superposições moleculares. Os resultados obtidos permitiram a validação e refinamento de um modelo farmacofórico anteriormente postulado por eles (Marinelli *et al.*, 2003). O modelo de farmacóforo foi calculado como a média entre as distâncias entre os grupos nas conformações bioativas das moléculas estudadas (Figura 9). As seguintes interações foram hipotetizadas para governar o processo de reconhecimento ligante-receptor: (i) coordenação de um íon Ca^{2+} do sítio de ligação de metais a um dos oxigênios do grupo carboxilato do ligante; (ii) uma ponte salina entre (α)-Asp²¹⁸ ou (α)-Asp¹⁵⁰ e o grupo guanidino (ou isómero) do ligante; (iii) uma interação no formato T entre a cadeia lateral do (β)-Tyr¹²² e um anel aromático do ligante; (iv) uma ligação de hidrogênio doada por um H-N do ligante ao oxigênio carbonílico da cadeia principal do (β)-Arg²¹⁶ e (v) uma ligação de hidrogênio entre um grupo carbonila do ligante e o grupo guanidino da (β)-Arg²¹⁴. A importância

dos grupos carboxilato, guanidino ou isósteros e de uma cadeia lateral contendo um anel aromático capaz de interagir por empilhamentos pi-pi, dos inibidores da integrina $\alpha v\beta 3$, também foi considerada por Feuston e colaboradores (2002) em um estudo de superposição molecular por método computacional.

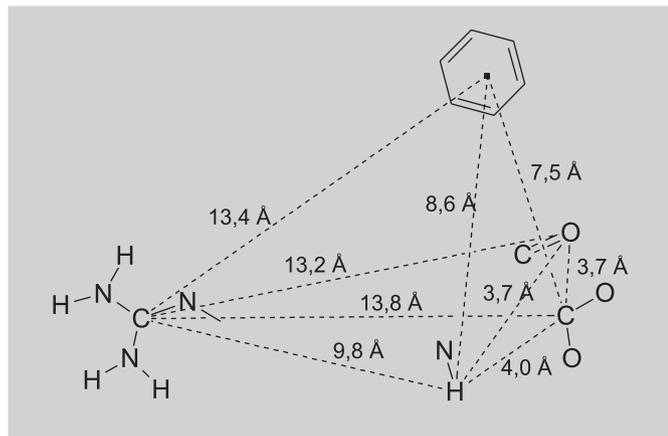


FIGURA 9 - Distâncias entre os pontos farmacofóricos de inibidores da integrina $\alpha v\beta 3$. As distâncias foram calculadas considerando o carbono do grupo carboxilato, o carbono do grupo guanidino (ou equivalente nos isósteros), o centróide do anel aromático, o oxigênio do grupo aceptor de ligação de hidrogênio e o hidrogênio do grupo doador de ligação de hidrogênio (Adaptado de Marinelli *et al.*, 2003).

Uma nova estratégia de definição de farmacóforo e de superposição de ligantes flexíveis a proteínas flexíveis foi desenvolvida a partir de antagonistas seletivos da integrina $\alpha v\beta 3$ por Moitessier e colaboradores (2004). Antagonistas peptídicos, pseudo-peptídicos e não-peptídicos foram utilizados na construção do farmacóforo. Três grupos farmacofóricos foram considerados: um grupo carboxilato, um grupo guanidino ou isósteros e um grupo hidrofóbico. Campos estéricos foram gerados por busca conformacional sistemática para cada grupo farmacofórico. O alinhamento e a superposição das regiões acessíveis para cada grupo levou à determinação dos volumes superpostos (Figura 10), que constituiram o modelo farmacofórico. O modelo farmacofórico foi superposto, manualmente e por busca usando o programa Autodock, à estrutura cristalina da integrina $\alpha v\beta 3$, em três modos de complexação possíveis. Os complexos construídos foram submetidos à simulação por dinâmica molecular (DM). O modelo de complexação obtido foi comparado com a estrutura cristalina da porção extra-celular da integrina $\alpha v\beta 3$. A boa concordância entre ambas estruturas validou o farmacóforo proposto. Para desenvolver o *screening* virtual, as moléculas dos possíveis inibidores devem ser orientadas no sítio ativo segundo o

modelo farmacofórico proposto e os complexos obtidos submetidos à simulação por DM, em que são considerados o efeito do solvente e a flexibilidade do receptor.

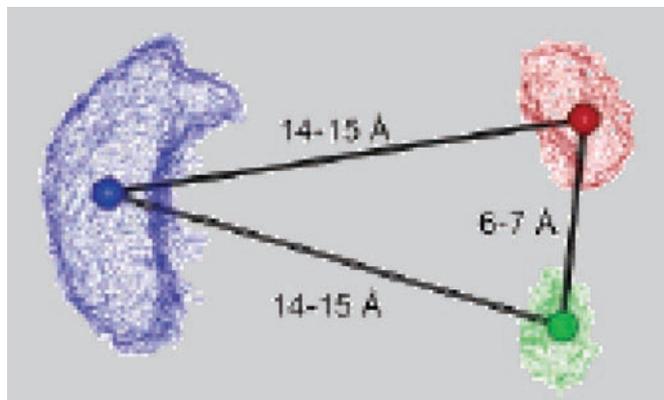


FIGURA 10 - Farmacóforo de três pontos desenvolvido por Moitessier e colaboradores (2004). As regiões azul, vermelha e verde indicam, respectivamente, as áreas onde uma carga positiva, uma carga negativa e um grupo hidrofóbico são esperados.

Ishikawa e colaboradores (Ishikawa *et al.*, 2006) sintetizaram e testaram série de antagonistas duais das integrinas $\alpha v\beta 3/\alpha IIb\beta 3$, dentre os quais o mais ativo foi o composto **14** (Figura 7). Com os dados obtidos estabeleceu-se uma série de relações estrutura-atividade. Para confirmação destes estudos de relação estrutura-atividade foram realizadas simulações por superposição molecular com a estrutura cristalográfica da integrina $\alpha v\beta 3$, baseados na estrutura do receptor complexado com a cilengitida. Para tal, cada ligante foi posicionado manualmente no sítio ativo e minimizado. As principais interações encontradas foram uma ligação de hidrogênio do NH amino terminal do ligante com o Asp²¹⁸ da cadeia αv , a coordenação do grupo carboxila com o metal do MIDAS, uma ligação de hidrogênio do NH da sulfonamida com o grupo carbonila da cadeia principal da Tyr¹²² da cadeia $\beta 3$, o empilhamento dos anéis aromáticos da sulfonamida e da Tyr¹²² da cadeia $\beta 3$ e uma ligação de hidrogênio da carbonila da amida central com a Arg²¹⁴ da cadeia $\beta 3$. Os dados obtidos com a superposição molecular permitiram confirmar a importância da acidez da sulfonamida para a atividade, porque a acidez está relacionada com a polarização do NH da sulfonamida, que é um fator importante para a formação de uma ligação de hidrogênio com o receptor.

Belvesi e colaboradores (2006), usando como protótipos o cRGDFV (**1**) e a cilengitida (**8**), sintetizaram série de ciclopeptídeos, que foram submetidos a ensaios de ligação com as integrinas $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$ e $\alpha 5\beta 1$ e de agregação plaquetária. Nos compostos sintetizados os aminoácidos

D-Phe-Val dos protótipos foram substituídos por 5,6 e 5,7-biciclolactamas estereoisoméricas de forma a restringir a seqüência RGD em diferentes conformações e, possivelmente, conduzir a aumento da atividade e seletividade para o antagonismo da integrina $\alpha\beta3$. A determinação estrutural dos ciclopeptídeos, realizada por combinação de espectroscopia de RMN e cálculos de dinâmica molecular e mecânica molecular, revelou forte dependência entre a conformação e o tamanho do anel lactâmico. Na coleção de compostos sintetizados, o ciclopeptídeo **10** mostrou a maior afinidade no ensaio de inibição da ligação da equistatina, um potente antagonista peptídico, à integrina $\alpha\beta3$, com um IC_{50} de $3,8 \pm 0,9$ nM, o que é quase 50 e 5 vezes maior que, respectivamente, a dos protótipos cRGDFV (**1**) e da cilengitida (**8**), usados como referência. O composto **10** apresentou a geometria da seqüência RGD levemente dobrada ou quase estendida. O anel 5,7-*trans*-3*R*-lactâmico parece forçar o ciclopeptídeo **10** a assumir conformações preferenciais muito similares à apresentada pela cilengitida (**8**) ligada no complexo integrina $\alpha\beta3$. Para os confômeros encontrados na simulação de dinâmica molecular, a distância média dos C β (Arg)-C β (Asp) foi de 8,5 Å, semelhante à distância apresentada pela cilengitida (8,9 Å). Ao contrário do que havia sido postulado anteriormente (Haubner, Finsinger, Kessler, 1997), a inibição da integrina $\alpha\beta3$ não requer uma dobra muito forte da seqüência RGD.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Desde que o médico Judah Folkman postulou, no início da década de 1970, que substâncias inibidoras de angiogênese teriam uma utilização potencial na terapia do câncer (Giannis, Rübsam, 1997), muito progresso tem sido verificado nesta área (Alghishi, Ruegg, 2006; Akalu, Cretu, Brooks, 2005; Meyer *et al.*, 2006). As integrinas foram reconhecidas como mediadores e reguladoras da angiogênese induzida por tumores. Várias rotas sinalizadoras dependentes de integrinas, que contribuem para angiogênese, foram decifradas e antagonistas de integrina com propriedades antiangiogênicas foram obtidos. A eficácia potencial de antagonistas de integrinas para suprimir a angiogênese em tumores e a progressão de câncer tem sido verificada em testes clínicos. A determinação da estrutura cristalina do segmento extracelular da integrina $\alpha\beta3$ ligada ao ciclopentapeptídeo cilengitida (Xiong *et al.*, 2002) foi um marco importante para o estudo, por modelagem molecular, de antagonistas da integrina $\alpha\beta3$, permitindo o planejamento racional de novas moléculas com alta afinidade. Apesar deste progresso, várias questões ainda se mantêm em aberto e novas estão surgindo. Será de grande importân-

cia elucidar o mecanismo exato pelo qual os inibidores da integrina $\alpha\beta3$ inibem a angiogênese e obter informações sobre qual é a melhor forma de usar estes inibidores na clínica. Outros usos terapêuticos para os inibidores da integrina $\alpha\beta3$ devem ser mais bem investigados, visto que a angiogênese tem também sua função desregulada em outras doenças como a artrite reumatóide e a retinoplastia diabética.

ABSTRACT

Angiogenesis inhibitors antitumor agents - pharmacophore models to $\alpha\beta3$ antagonists

Cancer is one of the leading causes of death. Angiogenesis, the growth of new blood vessels, is essential for tumor development and spreading. Integrins are a family of surface receptors that are involved in angiogenesis. The $\alpha\beta3$ integrin plays an important role in tumor angiogenesis. $\alpha\beta3$ inhibitors have direct effects to prevent tumor metastases, growth and angiogenesis. In vitro screening of cyclic peptide libraries led to highly active and $\alpha\beta3$ -selective compounds. Non-peptidic $\alpha\beta3$ antagonists were also designed and synthesized. The crystal structure of the $\alpha\beta3$ integrin in complex with RGD ligant allowed structure-based rational design of ligands and validation of pharmacophore model to $\alpha\beta3$ antagonists.

UNITERMS: Angiogenesis. Cancer therapy. $\alpha\beta3$ integrin antagonists. Integrins.

REFERÊNCIAS

- AKALU, A.; CRETU, A.; BROOKS, P. C. Targeting integrins for control of tumour angiogenesis. *Expert Opin. Invest. Drugs.*, v. 14, n. 12, p. 1475-1486.
- ALGHISI, G. C.; RUEGG, C. Vascular integrins in tumor angiogenesis: mediators and therapeutic targets. *Endothelium-J. Endothelial Cell Res.*, v. 13, n.2, p. 113-135, 2006.
- ARNAOUT, M. A.; GOODMAN, S. L.; XIONG, J.-P. Coming to grips with integrin binding to ligands. *Curr. Opin. Cell Biol.*, v. 14, n. 5, p. 641-652, 2002.
- AUMAILLEY, M.; GURRATH, M.; MÜLLER, G.; CALVETE, J.; TIMPL, R.; KESSLER, H. Arg-Gly-Asp constrained within cyclic pentapeptides. *FEBS*, v. 291, n. 1, p. 50-54, 1991.

- BACH, A. C.; ESPINA, J. R.; JACKSON, S. A.; STOUTEN, P. F. W.; DUKE, J. L.; MOUSA, S. A.; DEGRADO, W. F. Type II' to type I' β -turn swap changes specificity for integrins. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 118, p. 293-294, 1996.
- BATT, D. G.; PETRAITS, J. J.; HOUGHTOIN, G. C.; MODI, D. P.; CAIN, G. A.; CORJAY, M. H.; MOUSA, S. A.; BOUCHARD, P. J.; FORSYTHE, M. S.; HARLOW, P.P.; BARBERA, F. A.; SPITZ, S. M.; WEXLER, R. R.; JADHAV, P. K. Disubstituted indazoles as potent antagonists of the integrin $\alpha v \beta 3$. *J. Med. Chem.*, v. 43, p. 41-58, 2000.
- BELVESI, L.; BERNADI, A.; COLOMBO, M.; MANZONI, L.; POTENZA, D.; SCOLASTICO, C.; GIANNINI, G.; MARCELLINI, M.; RICCIONI, T.; CASTORINA, M.; LOGIUDICE, P.; PISANO, C.. Targeting integrins: insights into structure and activity of cyclic RGD pentapeptide mimics containing azabicycloalkane amino acids. *Bioorg. Med. Chem.*, v. 14, p. 169-180, 2006.
- BERGERS, G.; JAVAHERIAN, K.; LO, K.; FOLKMAN, J.; HANAHAN, D. Effects of angiogenesis inhibitors on multistage carcinogenesis in mice. *Science*, v. 284, p. 808-812, 1999.
- BRASSARD, D. L.; MAXWELL, E.; MALKOWSKI, M.; NAGABHUSHAN, T. L.; KUMAR, C. C.; ARMSTRONG, L. Integrin $\alpha v \beta 3$ - mediated activation of apoptosis. *Exp. Cell Res.*, v. 251, p. 33-45, 1999.
- BRASILEIRO FILHO, G.; GUIMARÃES, R. C.; BOGLIOLO, L. Distúrbios do crescimento e da diferenciação celular. In: BRASILEIRO FILHO, G. (Ed.) *Bogliolo patologia*. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 149-193.
- BROOKS, P. C. Role of integrins in angiogenesis. *Eur. J. Cancer*, v. 32A, p. 2423-2429, 1996.
- BURGESS, K.; LIM, D.; MOUSA, S. A. Synthesis and solution conformation of cyclo[RGDRGD]: a cyclic peptide with selectivity for the $\alpha v \beta 3$ receptor. *J. Med. Chem.*, v. 39, p. 4520-4526, 1996.
- BURKE, P. A. DENARDO, S. J. Antiangiogenic agents and their promising potential in combined therapy. *Cri. Rev. Oncology/Hematology*, v. 39, p. 155-171, 2001.
- BURNETT, C. A.; XIE, J.; QUIJANO, J.; SHEN, Z.; HUNTER, F.; BUR, M.; LI, K. C. P.; DANTHI, S. N. Synthesis, in vitro, and in vivo characterization of an integrin $\alpha v \beta 3$ -targeted molecular probe for optical imaging of tumor. *Bioorg. Med. Chem.*, v. 13, p. 3763-3771, 2005.
- CASIRAGHI, G.; RASSU, G.; AUZZAS, L.; BURREDDU, P.; GAETANI, E.; BATTISTINI, L.; ZANARDI, F.; CURTI, C.; NICASTRO, G.; BELVESI, L.; MOTTO, I.; CASTORINA, M.; GIANNINI, G.; PISANO, C. Grafting aminocyclopentane carboxylic acids onto RGD tripeptide sequence generates low nanomolar $\alpha v \beta 3 / \alpha v \beta 5$ integrin dual binders. *J. Med. Chem.*, v. 45, p. 7675-7687, 2005.
- CHERESH, D. A. Death to a blood vessel, death to a tumor. *Nat. Med.*, v. 4, p. 395-396, 1998.
- CLARK, E. A.; BRUGGE, J. S. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science*, v. 268, p. 233-239, 1995.
- CONNELL, R. D. Cancer chemotherapeutics- angiogenesis agents: 1999-march 2000. *Expert Opin. Ther. Pat.*, v. 10, p. 767-786, 2000.
- DECHANTSREITER, M. A.; PLANKER, E.; MATHÄ, B.; LOHOF, E.; HÖLZEMANN, G.; JONCZYK, A.; GOODMAN, S. L.; KESSLER, H. N-Methylated cyclic RGD peptides as highly active and selective $\alpha v \beta 3$ integrin antagonists. *J. Med. Chem.*, v. 42, n. 16, p. 3033-3040, 1999.
- ELICEIRI, B. P.; CHERESH, D. A. Adhesion events in angiogenesis. *Curr. Opin. Cell Biol.*, v. 13, n. 5, p. 563-568, 2001.
- ERB, E.-M.; TANGEMANN, K.; BOHRMANN, B.; MULLER, B.; ENGEL, J. Integrin $\alpha IIb \beta 3$ reconstituted into lipid bilayers is nonclustered in its activated state but clusters after fibrinogen binding. *Biochemistry*, v. 36, n. 24, p. 7395-7402, 1997.
- ESKENS, F. A. L. M.; DUMEZ, H.; HOEKSTRA, R.; PERSCHL, A.; BRINDLEY, C.; BÖTTCHER, S.; WYNENDAELE, W.; DREVS, J.; VERWEIJ, J.; VAN OOSTEROM, A. T. Phase I and pharmacokinetic study of continuous twice weekly intravenous administration of Cilengitide (EMD 121974), a novel inhibitor of the integrins $\alpha v \beta 3$ and $\alpha v \beta 5$ in patients with advanced solid tumours. *Eur. J. Cancer*, v. 39, n. 7, p. 917-926, 2003.

- FEUSTON, B. P.; CULBERSON, J. C.; DUGGAN, M. E.; HARTMAN, G. D.; LEU, C.; RODAN, S. B. Binding model for nonpeptide antagonists of $\alpha v\beta 3$ integrin. *J. Med. Chem.*, v. 45, p. 5640-5648, 2002.
- FIDLER, I. J.; ELLIS, L. M. The implications of angiogenesis for biology and therapy of cancer metastasis. *Cell*, v. 79, p. 185-188, 1994.
- FILARDO, E. J.; BROOKS, P. C.; DEMING, S. L.; DAMSKY, C.; CHERESH, D. A. Requirement of the NPXY motif in the integrin $\beta 3$ subunit cytoplasmic tail for melanoma cell migration in vitro and in vivo. *J. Cell Biol.*, v. 130, n. 2, p. 441-450, 1995.
- GIANNIS, A.; RÜBSAM, F. Integrin antagonists and other low molecular weight compounds as inhibitors of angiogenesis: new drugs in cancer therapy. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, v. 36, n. 6, p. 588-590, 1997.
- HAUBNER, R.; FINSINGER, D.; KESSLER, H. Stereoisomeric peptide libraries and peptidomimetics for designing selective inhibitors of the $\alpha v\beta 3$ integrin for a new cancer therapy. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, v. 36, p. 1374-1389, 1997.
- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Estimativas - Brasil (consolidado). Disponível em: http://www.inca.org.br/estimativas/2003/tbregioes_consolidado.asp?ID=1. Acesso em: 07 abril 2003.
- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Estimativa 2006- Incidência de câncer no Brasil. Disponível em: http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=1793. Acesso em: 09 maio 2006.
- ISHIKAWA, M.; HIRAIWA, Y.; KUBOTA, D.; TSUSHIMA, M.; WATANABE, T.; MURAKAMI, S.; OUCHI, S.; AJITO, K. Tricyclic pharmacophore-based molecules as novel integrin $\alpha v\beta 3$ antagonists. Part III: synthesis of potent antagonists with $\alpha v\beta 3/\alpha IIb\beta 3$ dual activity and improved water solubility. *Bioorg. Med. Chem.* v. 14, p. 2131-2150, 2006.
- IWAMA, S.; KITANO, T.; FUKUYA, F.; HONDA, Y.; SATO, Y.; NOTAKE, M.; MORIE, T. Discovery of a potent and selective $\alpha v\beta 3$ integrin antagonist with strong inhibitory activity against neointima formation in rat balloon injury model. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, v. 14, p. 2567-2570, 2004.
- KATADA, J.; HAYASHI, Y.; SATO, Y.; MURAMATSU, M.; TAKIGUCHI, Y.; HARADA, T.; FUJIOSHI, T.; UNO, I. A novel peptide motif for platelet fibrinogen receptor recognition. *J. Biol. Chem.*, v. 272, n. 12, p. 7720-7726, 1997.
- KEENAN, R. M.; MILLER, W. H.; KWON, C.; ALI, F. E.; CALLAHAN, J. F.; CALVO, R. R.; HWANG, S.; KOPPLE, J. D.; PEISHOFF, C. E.; SAMANEN, J. M.; WONG, A. S.; YUAN, C.; HUFFMAN, W. F. Discovery of potent nonpeptide vitronectin receptor ($\alpha v\beta 3$) antagonists. *J. Med. Chem.*, v. 40, n. 15, p. 2289-2292, 1997.
- KUBOTA, D.; ISHIKAWA, M.; ISHIKAWA, M.; YAHATA, N.; MURAKAMI, S.; FUJISHIMA, K.; KITAKASE, M.; AJITO, K. Tricyclic pharmacophore-based molecules as novel integrin $\alpha v\beta 3$ antagonists. Part IV: Preliminary control of $\alpha v\beta 3$ selectivity by meta-oriented substitution. *Bioorg. Med. Chem.*, v. 14, p. 4158-4181, 2006.
- LEONARD, K.; PAN, W.; ANACLERIO, B.; GUSHUE, J. M.; GUO, Z.; DESJAARLAIS, R. L.; CHAIKIN, M. A.; LANTTANZE, J.; CRYSLER, C.; MANTHEY, C. L.; TOMCZUCK, B. E.; MARUGÁN, J. Non-peptidic $\alpha v\beta 3$ antagonists containing indol-1-yl propionic acids. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, v. 15, p. 2679-2684, 2005.
- LI, R.; MITRA, N.; GRATKOWSKI, H.; VILAIRE, G.; LITVINOV, R.; NAGASAMI, C.; WEISEL, J. W.; LEAR, J. D.; DEGRADO, W. F.; BENNETT, J. S. Activation of integrin $\alpha IIb\beta 3$ by modulation of transmembrane helix associations. *Science*, v. 300, n. 5620, p. 795-798, 2003.
- LIEKENS, S.; DE CLERCQ, E.; NEYTS, J. Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochem. Pharmacol.*, v. 61, n. 3, p. 253-270, 2001.
- LIOTTA, L. A.; STEEG, P. S.; STELLER-STEVENSON, W. G. Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell*, v. 64, p. 327-336, 1991.
- MARINELLI, L.; LAVECCHIA, A.; GOTTSCHALK, K.; NOVLLINO, E.; KESSLER, H. Docking studies on $\alpha v\beta 3$ integrin ligands: pharmacophore refinement and implications for drug design. *J. Med. Chem.*, v. 46, p. 4393-4404, 2003.

- MARUGÁN, J. J.; MANTHEY, C.; ANACLERIO, B.; LAFRANCE, L.; LU, T.; MARKOTAN, T.; LEONARD, K. A.; CRYSLER, C.; EISENNAGEL, S.; DASGUPTA, M.; TOMCZUK, B. Design, synthesis, and biological evaluation of novel potent and selective $\alpha v\beta 3/\alpha v\beta 5$ integrin dual inhibitors with improved bioavailability. Selection of molecular core. *J. Med. Chem.*, v. 48, p. 926-934, 2005.
- MEYER, A.; AUERNHEIMER, J.; MODLINGER, A.; KESSLER, H. Targeting RGD recognizing integrins: drug development, biomaterial research, tumor imaging and targeting. *Curr. Pharm. Des.*, v. 12, p. 2723-2747, 2006.
- MILLER, W. H.; ALBERTS, D. P.; BHATNAGAR, P. K.; BONDINELL, W. E.; CALLAHAN, J. F.; CALVO, R. R.; COUSINS, R. D.; ERHARD, K. F.; HEERDING, D. A.; KEENAN, R. M.; KWON, C.; MANLEY, P. J.; NEWLANDER, K. A.; ROSS, S. T.; SAMANEN, J. M.; UZINSKAS, I. N.; VENSLAVSKY, J. W.; YUAN, C. C.-K.; HALTIWANGER, R. C.; GOWEN, M.; HWANG, S.-M.; JAMES, I. E.; LARK, M. W.; RIEMAN, D. J.; STROUP, G. B.; AZZARANO, L. M.; SALYERS, K. L.; SMITH, B. R.; WARD, K. W.; JOHANSON, K. O.; HUFFMAN, W. F. Discovery of orally active nonpeptide vitronectin receptor antagonists based on a 2-benzazepine Gly-Asp mimetic. *J. Med. Chem.*, v. 43, n. 1, p. 22-26, 2000.
- MOITTESSIER, N.; HENRY, C.; MAIGRET, B.; CHAPLEUR, Y. Combining pharmacophore search, automated docking, and molecular dynamics simulations as a novel strategy for flexible docking. Proof of concept: docking arginine-glycine-aspartic acid compounds into $\alpha v\beta 3$ binding site. *J. Med. Chem.*, v. 47, p. 4178-4187, 2004.
- MOUSA, S. A.; MOHAMED, S.; WEXLER, E. J.; KERR, J. S. Antiangiogenesis and anticancer efficacy of TA138, a novel alpha v beta 3 antagonist. *Anticancer Research*, v. 25, n.1A, p. 197-206, 2005.
- NERI, D.; BICKNELL, R. Tumour vascular targeting. *Nat. Rev. Cancer.*, v. 5, p.436-446, 2005.
- NICOLAOU, K. C.; TRUJILLO, J. I.; JANDELEIT, B.; CHIBALE, K.; ROSENFELD, M.; DIEFENBACH, B.; CHERESH, D. A.; GOODMAN, S. L. Design, synthesis and biological evaluation of nonpeptide integrin antagonists. *Bioorg. Med. Chem.*, v. 6, n. 8, p. 1185-1208, 1998.
- ONTHANK, D. C.; LIU, S.; SILVA, P. J.; BARRETT, J. A.; HARRIS, T. D.; ROBINSON, S. P.; EDWARDS, D. S. ^{90}Y and ^{111}In Complexes of a DOTA-conjugated integrin $\alpha v\beta 3$ receptor antagonist: different but biologically equivalent. *Bioconjugate Chem.* v. 15, p. 235-241, 2004.
- PFUFF, M.; TANGEMANN, K.; MÜLLER, B.; GURRATH, M.; MÜLLER, G.; KESSLER, H.; TIMPL, R.; ENGEL, J. Selective recognition of cyclic RGD peptides of NMR defined conformation by $\alpha \text{IIb}\beta 3$, $\alpha v\beta 3$, and $\alpha v\beta 1$ integrins. *J. Biol. Chem.*, v. 269, n. 32, p. 20233-20238, 1994.
- PITTS, W. J.; WITYAK, J.; SMALLHEER, J. M.; TOBIN, A. E.; JETTER, J. W.; BUYNITSKY, J. S.; HARLOW, P. P.; SOLOMON, K. A.; CORJAY, M. H.; MOUSA, S. A.; WEXLER, R. R.; JADHAV, P. K. *J. Isoxazolines* as potent antagonists of the integrin $\alpha v\beta 3$. *J. Med. Chem.*, v. 43, n. 1, p. 27-40, 2000.
- PEISHOFF, C. E.; ALI, F. E.; BEAN, J. W.; CALVO, R.; D'AMBROSIO, C. A.; EGGLESTON, D. S.; HWANG, S. M.; KLINE, T. P.; KOSTER, P. F.; NICHOLS, A.; POWERAS, D.; ROMOFF, T.; SAMANEN, J. M.; STADEL, J.; VASKO, J. A.; KOPPLE, K. D. Investigation of conformational specificity at GPIIb/IIIa: evaluation of conformationally constrained RGD peptides. *J. Med. Chem.*, v. 35, n. 21, p. 3962-3969, 1992.
- RAGUSE, J. D.; GATH, H. J.; BIER, J.; REISS, H.; OETTLE, H. Cilengitide (EMD 121974) arrests the growth of a heavily pretreated highly vascularised head and neck tumour. *Oral oncology*, v. 40, 228-230, 2003.
- RÜEGG, C.; MARIOTTI, A. Vascular integrins: pleiotropic adhesion and signaling molecules in vascular homeostasis and angiogenesis. *Cell. Mol. Life Sci.*, v. 60, p. 1135-1157, 2003.
- RUOSLAHTI, E.; PIERSCHBACHER, M. D. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science*, v. 238, p. 491-497, 1987.
- SALMON, S. E.; SARTORELLI, A. C. Quimioterapia do câncer. In: KATZUNG, B. G. (Ed.) *Farmacologia básica e clínica*. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2003. cap. 55, p. 803-832.
- SASAKI, T.; TIMPL, R. Domain IVa of laminin ± 5 chain is cell-adhesive and binds $\beta 1$ and $\alpha v\beta 3$ -integrins through Arg-Gly-Asp. *FEBS Lett.*, v. 509, n. 2, p. 181-185, 2001.

- SUGIHARA, H.; FUKUSHI, H.; MIYAWAKI, T.; IMAI, Y.; TERASHITA, Z.-I.; KAWAMURA, M.; FUJISAWA, Y.; KITA, S. Novel non-peptide fibrinogen receptor antagonists. 1. Synthesis and glycoprotein IIb-IIIa antagonistic activities of 1,3,4-trisubstituted 2-oxopiperazine derivatives incorporating side-chain functions of the RGDF peptide. *J. Med. Chem.*, v. 41, n. 4, p. 489-502, 1998.
- TARABOLETTI, G.; MARGOSIO, B. Antiangiogenic and vascular therapy for cancer. *Curr. Opin. Pharmacol.*, v. 1, n. 4, p. 378-384, 2001.
- TUCKER, G. C. Inhibitors of integrins. *Curr. Opin. Pharmacol.*, v. 2, n. 4, p. 394-402, 2002.
- VARNER, J. A.; CHERESH, D. A. Integrins and cancer. *Curr. Opin. Cell Biol.*, v. 8, n. 6, p. 724-730, 1996.
- XIONG, J. P.; STEHLE, T.; DIEFENBACHH, B.; DUNKER, R.; SCOTT, D. L.; JOACHIMIACK, A.; GOODMAN, S. L.; ARNAOUT, M. A. Crystal structure of the extracellular segment of integrin $\alpha\text{v}\beta\text{3}$. *Science*, v. 294, n. 5541, p. 339-345, 2001.
- XIONG, J. P.; STEHLE, T.; ZHANG, R.; JOACHIMIACK, A.; FRECH, M.; GOODMAN, S. L.; ARNAOUT, M. A. Crystal structure of the extracellular segment of integrin $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ in complex with an Arg-Gly-Asp ligand. *Science*, v. 296, n. 5565, p. 151-155, 2002.
- XUE, C.-B., RODERICK, J.; JACKSON, S.; RAFALSKI, M.; ROCKWELL, A.; MOUSA, S.; OLSON, R. E.; DEGRADO, W. F. Design, synthesis and in vitro activities of benzamide-core Glycoprotein IIb/IIIa antagonists: 2,3-diaminopropionic acid derivatives as surrogates of aspartic acid. *Bioorg. Med. Chem.*, v. 5, n. 4, p. 693-705, 1997.

Recebido para publicação em 01 de setembro de 2006.

Aceito para publicação em 01 de março de 2007.