

O ANDROGRAPHOLIDE SE LIGA A BOLSA DE LIGAÇÃO DE ATP DE VEGFR2 PARA IMPEDIR A ANGIOGÊNESE TUMORAL MEDIADA POR VEGFA

Kirti Kajal¹, Abir K. Panda¹, Jyotsna Bhat², Dwaipayan Chakraborty¹, Sayantan Bose¹, Pushpak Bhattacharjee¹, Tania Sarkar¹, Subhrangsu Chatterjee², Santosh K. Car³ & Gaurishankar Sa¹

SCIENTIFIC RE^PORTS

¹Divisão de Medicina Molecular, Instituto Bose, P-1/12, Calcutá Improvement Trust Scheme VII M, Calcutá, 700054, Índia. ²Departamento de Biofísica, Instituto Bose, P-1/12, Calcutá Improvement Trust Scheme VII M, Calcutá, 700054, Índia. ³Escola de Biotecnologia, Universidade KIIT, Bhubaneswar, 751024, Índia. Correspondência e solicitações de materiais devem ser endereçadas a G.S. (e-mail: gauri@jcbose.ac.in)

A vasculogênese e a angiogênese são processos de formação de vasos sanguíneos. Os vasos sanguíneos são desenvolvidos para distribuir nutrientes e oxigênio a órgãos distantes. Estes vasos são cruciais para o crescimento e reparação de tecidos feridos. Durante o estado do tumor, ocorre um desequilíbrio no crescimento dos vasos sanguíneos o que leva à neo-angiogênese.

A neo-angiogênese é o principal responsável pelo estabelecimento do tumor. As células tumorais segregam o fator pró-angiogénico VEGFA que se liga ao VEGFR2 presente na superfície das células endoteliais e desencadeia a formação de novos vasos sanguíneos. Para inibir a angiogênese tumoral, é necessário um inibidor de pequenas moléculas fisiologicamente seguro que pode potencialmente interagir com o domínio quinase do VEGFR2 e inibir a sua atividade.

O módulo de acoplamento molecular e a análise bioquímica identificou a andrographolide como uma das melhores moléculas de acoplamento que se liga à bolsa de ligação ao ATP do VEGFR2 e inibe a sua atividade de cinase. Assim, para uma abordagem mais radical no sentido de um inibidor seguro do VEGFR2 a andrographolide foi redireccionada para inibir a angiogénese tumoral e reduzir a carga tumoral.

Após uma era de intensa investigação, o cancro continua a ser uma área de grande preocupação. Tem a capacidade de sobreviver em todas as condições e paralisar o sistema hospedeiro¹. A formação de novos vasos sanguíneos ou angiogénese no microambiente tumoral é conhecida como tumor-angiogénese/neo-angiogénese, que é uma das principais características do cancro². Judah Folkman cunhou pela primeira vez o termo “angiogénese tumoral”³. A angiogénese é uma série de acontecimentos controlados que envolvem a formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes, causando neovascularização⁴.

Em condições normais, a angiogénese normal, a angiogénese ocorre durante o desenvolvimento, a remodelação vascular, a cicatrização de feridas, a gravidez e o ciclo menstrual patológica ocorre durante o crescimento de tumores malignos^{4,5}. Existe sempre um equilíbrio entre os sinais pró e sinais anti-angiogénicos, e este equilíbrio é perturbado em condições tumorais. Quando o tamanho do tumor excede para além de um tamanho definido; a falta de fornecimento de sangue e oxigénio e o défice de nutrientes provocam uma mudança angiogénica da quiescência vascular⁶.

Este sinal angiogénico leva à libertação do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFA), bFGF, EGF, citocinas e quimiocinas. O VEGF liga-se ao receptor do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR) presente na superfície das células endoteliais e inicia a neo-angiogénese. Entre os receptores de proteínas tirosina-quinases - VEGFR1 (FLT1), VEGFR2 (Flk-1/KDR) e VEGFR3, é o VEGFR2 que desempenha um papel importante na neo-angiogénese.

A estrutura do VEGFR2 compreende um domínio extracelular (sete segmentos semelhantes a imunoglobulinas), uma região membranar curta, uma região justamembranar, um domínio citosólico da tirosina-quinase e uma cauda carboxi terminal. A ligação do VEGF ao VEGFR2 conduz à ativação da proteína tirosina quinase, o que leva à ativação de moléculas de sinalização a jusante que medeiam a migração, a proliferação, a sobrevivência e a permeabilidade vascular das células endoteliais^{7,8}.

Assim, para combater a angiogénese tumoral, é necessário inibir a ativação do VEGFR2. Os inibidores da tirosina quinase, nomeadamente o sunitinib, o sorafenib, o pazopanib, o bevacizumab, o axitinib e o tivozanib, são utilizados na clínica para inibir o VEGFR2. São inespecíficos, causam fadiga, astenia, diarreia, estomatite, toxicidades cutâneas e várias doenças cardiovasculares⁹. Nesta altura, é extremamente necessário procurar fármacos específicos de alta afinidade para o VEGFR2, inibidor que não é tóxico e tem alta

biodisponibilidade. Uma pesquisa preliminar indica que a pequena molécula bem conhecida, andrographolide, se liga especificamente ao domínio quinase do VEGFR2 e inibe sua atividade quinase.

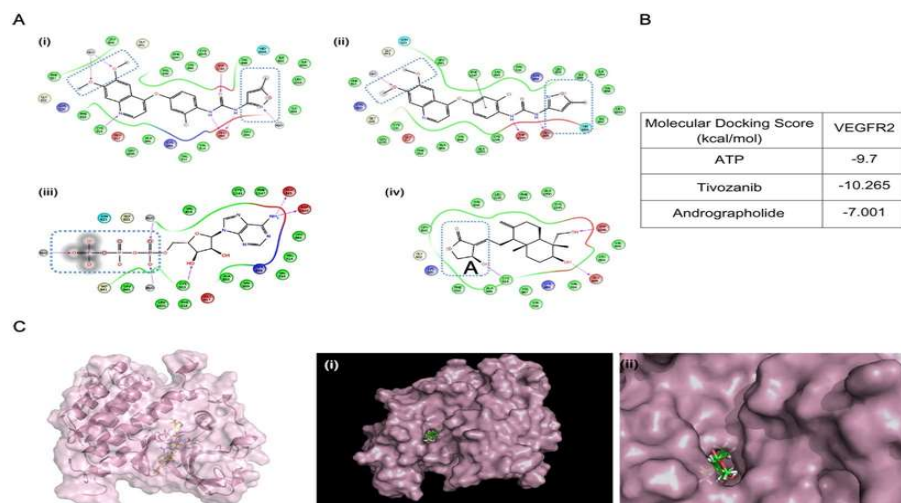


Figura 1. O andrographolide e o tivozanibe interagem com aminoácidos comuns na bolsa de ligação ao ATP do VEGFR2. **(A)** poses de ligação 2D de ligantes (i) conformação co cristalina de tivozanibe com VEGFR2 (PDB ID: 4ASE), (ii) conformação ancorada de tivozanibe no domínio quinase de VEGFR2, (iii) conformação ancorada de ATP no domínio quinase de VEGFR2 e (iv) conformação ancorada de andrographolide no domínio quinase de VEGFR2. Todos os ligantes compartilham aminoácidos comuns de interação Asp-1045 e Glu-885. **(B)** Pontuação de docking molecular de ATP, tivozanibe e andrographolide no domínio ATP quinase de VEGFR2. **(C)** O modelo de superfície mostra o andrographolide no domínio quinase do VEGFR2, (i e ii) o andrographolide está enterrado dentro do bolso de ligação ao ATP, a proteína é representada na forma de superfície e o andrographolide é representado na forma de bastão.

(iii) O bolso de encadernação é ampliado para maior compreensão.

A erva *Andrographis paniculata*, fonte de andrographolide, é obtida no subcontinente indiano¹⁰. Atenua a inflamação inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias mediadas por NF κ B ¹¹. Recentemente, observou-se que o andrographolide previne a perda óssea suprimindo a sinalização NF κ B mediada por RANKL e ERK que levam à diferenciação de osteoclastos induzida por câncer de mama humano¹². Shen *e col.* relataram que o androrólido tem a capacidade de inibir a angiogênese¹³. Algumas perguntas ainda precisam ser respondidas, (i) Modo de ação por trás da inativação de VEGFR2 mediada por andrographolide. Mais importante, se o andrographolide não tóxico pode suprimir a neoangiogênese mediada por VEGFA? Finalmente, é eficiente o suficiente para regredir a carga tumoral em modelo de tumor de camundongos? Para desvendar esse mistério, o estudo foi projetado para redirecionar esse medicamento anti-inflamatório e hepatoprotetor¹⁰ para anular a angiogênese tumoral e diminuir a carga tumoral no hospedeiro.

➤ RESULTADOS

1. O Andrographolide e o Tivozanibe, um conhecido inibidor do VEGFR2, interagem com o aminoácido comum na bolsa de ligação ao ATP do VEGFR2.

O VEGFA secretado pelas células tumorais liga-se ao VEGFR2 e promove a neovascularização. Assim, para inibir a neoangiogênese, procuramos um inibidor de pequena molécula que possa potencialmente interagir com o domínio da quinase VEGFR2 e inibir sua atividade. As estruturas do VEGFR2 junto com a molécula de ligante de cocristal foram obtidas do banco de dados PDB (4ASE) [14](#). A conformação de ligação de co-cristais 2D de VEGFR2-tivozanib foi mostrada em (Fig. [1A\(i\)](#)).

Para o estudo de referência, o tivozanibe foi acoplado na bolsa de ligação de ATP do VEGFR2 usando o módulo de acoplamento de ligante baseado em grade com energia (GLIDE) do Maestro e obteve uma conformação ancorada semelhante à conformação de ligação de co-cristais (Fig. [1A\(ii\)](#)). A consolidação acoplada de ATP ligado a VEGFR2 também foi mostrada em (Fig. [1A \(iii\)](#)). Usando os mesmos algoritmos, uma pequena biblioteca de moléculas foi rastreada no traje de Schrödinger. Pose encaixada (Fig. [1A\(iv\)](#)) e escore de encaixe Fig. [1B](#) previu que o andrographolide tem afinidade de ligação significativa com VEGFR2 em comparação com ATP.

É uma questão de grande importância que tivozanibe, ATP e andrographolide compartilhem aminoácidos comuns de interação, ou seja, Glu-885 e Asp-1046 no domínio quinase do VEGFR2. A partir da conformação do co-cristal e do tivozanibe, vê-se que as moléculas de água estão transmitindo interações-chave, conforme destacado pelas linhas pontilhadas azuis (Fig. [1A\(i\),\(ii\)](#)). Assim, essas moléculas de água foram mantidas intactas na geração Grid. A mesma grade foi aplicada ao ATP encaixado (Fig. [1A\(iii\)](#)) e andrographolide (Fig. [1A\(iv\)](#)) no domínio quinase do VEGFR2. Além disso, as moléculas de água estão presentes em a vizinhança de todos os ligantes (conforme destacado nas linhas pontilhadas azuis). O modelo de fita e preenchimento de superfície do VEGFR2 mostrou que o andrographolide (forma de bastão) se encaixa muito bem no bolso de quinase do VEGFR2 (Fig. [1C](#)).

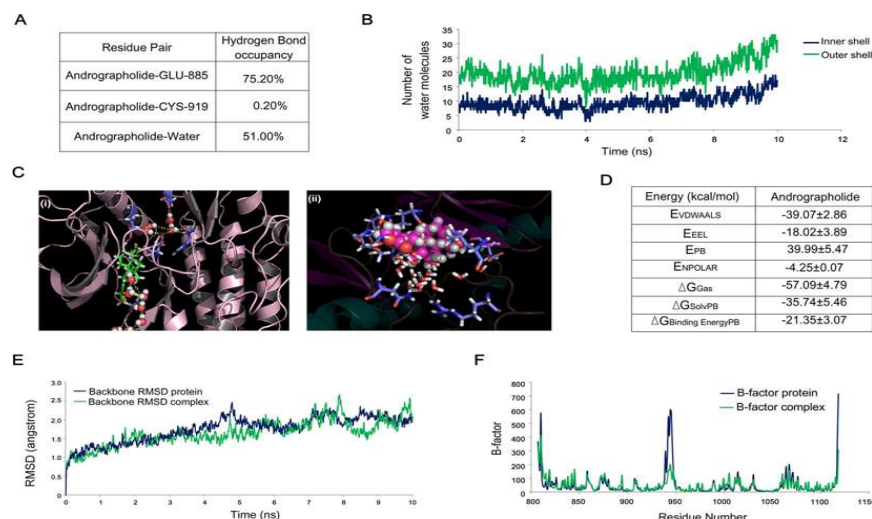


Figura 2. A simulação dinâmica molecular e o estudo de docking confirmam que a associação VEGFR2-andrographolide é estável em condições fisiológicas. (A) Ocupação da ligação de hidrogênio do andrographolide com os aminoácidos Glu-885 e Cys-919 presentes no domínio da quinase VEGFR2. A interação do andrographolide com o hidrogênio das moléculas de água circundantes também foi representada aqui. (B) O gráfico representa a camada interna das moléculas de água que está a uma distância de 3,4Å e a segunda camada de solvatação está a uma distância de 5Å do ligante. (C). Modelo de fita de VEGFR2, forma de bastão é andrographolide e modelos de esfera são moléculas de água. As moléculas de água cristalina foram mantidas intactas durante o acoplamento molecular do andrographolide, a conformação ancorada sugere que as interações mediadas pela água estão auxiliando na ligação do andrographolide. (D) Componente de energia livre de ligação do andrographolide com VEGFR2 com base nos cálculos do MMPBSA. As abreviações mencionadas acima denotam o seguinte: EVDWAALS: Non-Bonded van der Waals Energy. EEEL: Energia eletrostática não ligada. EPB: Energia de solvatação polar (PB). ENPOLAR: Energia de solvatação apolar de interações repulsivas soluto-solvente (PB). ΔG_{Gas} : $E_{VDWAALS} + EEEL$ + Energia Interna. ΔG_{Solv} : Energia de solvatação polar + energia de solvatação não polar. $\Delta G_{Binding Energy}$: Energia Livre de Ligação ($\Delta G_{Gas} + \Delta G_{Solv}$). (E) Deslocamento quadrático médio (RMSD) de VEGFR2 (proteína) e VEGFR2-andrographolide. (F) A análise do fator B sugere que a flexibilidade da proteína diminui após a interação com o andrographolide.

2. A simulação Dinâmica Molecular e o estudo de Docking confirmam que a associação VEGFR2-andrographolide é estável em condições fisiológicas.

A análise da ligação de hidrogênio sugere que o andrógrafo-olido está formando ligações de hidrogênio principalmente com Glu-885 com alto valor de ocupação e o andrographolide é principalmente suportado por interações polares com moléculas de água (Fig. 2A). Esses resultados se correlacionam com a análise da casca de água (Fig. 2B), o número de moléculas de água ao redor da molécula do ligante está aumentando com o progresso da simulação.

A camada interna indica a distância de 3,4Å do ligante e a segunda camada de solvatação é a distância de 5Å do ligante. O acoplamento molecular representa que sete moléculas de água da frente e cinco moléculas de água da parte de trás ajudam o andrographolide a se encaixar no bolso do domínio da quinase do VEGFR2 (Fig. 2C (i, ii)). As energias livres de ligação do andrographolide foram estimadas usando a

abordagem de Área de Superfície de Poisson-Boltzmann da Mecânica Molecular (MMPBSA), nos últimos 2 quadros de simulação ns com todos os parâmetros padrão do módulo MMPBSA do Amber (Fig. 2D).

O resultado sugere que a estabilidade conformacional do VEGFR2-andrographolide é energeticamente favorável devido à interação eletrostática e de Van der Waals. Para obter ainda mais os insights mecanicistas do comportamento de ligação do andrographolide com o VEGFR2, um estudo de simulação de dinâmica molecular de todos os átomos foi conduzido sobre o complexo ancorado. A trajetória simulada foi analisada mais detalhadamente. A análise do deslocamento quadrático médio (RMSD) e do fator B determina a flexibilidade e a estabilidade do sistema. Como visto em (Fig. 2E), o RMSD da espinha dorsal do complexo VEGFR2-andrographolide e do VEGFR2 não ligado é muito baixo ($\sim 1,5\text{--}2\text{\AA}$), isso infere que durante a execução da simulação a estrutura geral não está variando muito daquela da conformação inicial e o sistema é estável ao longo da simulação. A análise do fator B sugere que a flexibilidade da estrutura geral é reduzida após a ligação

SN.NÃO	S	MW	QPlogPo/w	QPlogS	QPPCaco	PHOA	QPlogBB
Andrographolide	0	350.454	1.459	-2,942	RO5 -1,343	76.719	0

Tabela 1. Propriedades ADME do andrographolide. Propriedades ADME do andrographolide. Os coeficientes ADME são - S (STARS) = Número de valores de propriedade/descriptor que estão fora do intervalo de 95% de valores semelhantes para medicamentos conhecidos. Valor recomendado de 0 a 5. MW = Peso molecular. QPlogPo/w = Coeficiente de partição octanol/água previsto. Valores recomendados - 2,0-6,5. QPlogS = Solubilidade aquosa prevista, log S. Valores recomendados - 6,5-0,5. QPPCaco = Permeabilidade aparente prevista das células Caco-2 em nm/seg. Valores recomendados <25 pobres, >500 ótimos. QPlogBB = Coeficiente de partição cérebro/sangue previsto. Valores recomendados - 3,0-1,2. PHOA = Absorção oral humana prevista na escala de 0 a 100%. Valores recomendados >80% é alto < 25% é ruim. RO5 = Regra de Cinco, As regras são: mol MW <500, QPlogPo/w <5, doador HB ≤5 e conta HB ≤10. de andrographolide (Fig. 2F). Além disso, para confirmar a atividade semelhante à do medicamento do andrographolide, a propriedade de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME) foi estudada usando o módulo QikProp do Maestro¹⁵ Os resultados sugerem que o andrographolide é biodisponível, pois possui coeficientes de ADME semelhantes a medicamentos (Tabela 1).

3. O Andrographolide inibe a Neoangiogênese.

O estudo in-silico revelou que o andrographolide se encaixa muito bem no bolso da quinase do VEGFR2. É, portanto, hipotetizado que o andrographolide se liga ao domínio da quinase e inibe a ativação do VEGFR2 e a neoangiogênese no microambiente tumoral. Assim, ensaios de neoangiogênese foram realizados para validar o efeito antiangiogênico do andrographolide.

As células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs) embutidas em matrigel foram tratadas com andrographolide (20 μ M) na presença ou ausência de VEGFA (10 ng/ml). O número de brotos formados (Fig. [3A](#)) e as células endoteliais migradas na área da ferida foram quantificadas pelo software Image-J (Fig. [3B](#)). Observou-se que o andrographolide inibe significativamente a formação de brotos induzida por VEGFA e a migração celular (Fig. [3A, B](#)).

Em apoio aos resultados anteriores, o ensaio de membrana corio-alantóide (CAM) foi realizado para estudar o *efeito ex-vivo* do andrographolide na formação de novos vasos sanguíneos induzidos por VEGFA. O ovo fertilizado com três dias de idade foi tratado com presença de VEGFA e ausência de andrographolide (Fig. [3C](#) *painéis esquerdo e médio*) e permitiu o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos. A análise de imagem angioquanta mostrou que o andrographolide regride significativamente a neoangiogênese induzida por VEGFA em embriões de galinha (Fig. [Painel direito 3C](#))[16](#). Todos esses resultados certamente significam que o andrographolide inibe efetivamente a neoangiogênese.

4. O Andrographolide inibe a Ativação de Moléculas de Sinalização a Jusante.

Dados in-silico indicaram que o andrographolide compete com o ATP pela ligação ao domínio VEGFR2 quinase, o que nos levou a supor que a fosforilação do VEGFR2 e a ativação das moléculas de sinalização a jusante serão abortadas. Para verificar nossa suposição, as células endoteliais foram pré-tratadas com andrographolide seguido de ativação com VEGFA. O estado de fosforilação de VEGFR2, quinase regulada por sinal extracelular (ERK) e AKT foi estudado por microscopia confocal (Fig. [4](#), *à esquerda*) e representados graficamente (Fig. [4](#), *à direita*). Os resultados mostraram que o andrographolide perturbou significativamente a sinalização VEGFA-downstream.

5. O Andrographolide inibe a Neoangiogênese no Local do Tumor.

Dados in vitro indicam que o andrographolide inibe eficientemente a neoangiogênese. Para validar sua eficácia na condição *tumoral in vivo*, várias doses de andrographolide foram administradas por via oral a camundongos BALB / c implantados com tumor de mama (4T1). O volume tumoral foi medido na 4ª semana de inoculação do tumor. A redução máxima da carga tumoral foi observada com o tratamento com andrographolide na dose de 10 mg / kg de peso corporal com redução concomitante da expressão de CD31 (marcador de células endoteliais), que se correlacionou ainda mais com a diminuição da formação de novos vasos sanguíneos.

A expressão de CD31 foi quantificada usando o software Image J e o gráfico foi plotado (Fig. [5A, B](#)). Em conjuntos paralelos, células S180 resistentes a múltiplas drogas foram injetadas na coxa direita de camundongos albinos suíços para estudar o efeito do andrographolide neste sistema. Semelhante ao modelo de tumor de mama, esse tumor, que é difícil de tratar, também mostrou uma redução significativa no volume do tumor (Fig. [5C](#)); e número de vasos sanguíneos como resultado do tratamento com andrographolide. A expressão de CD31 foi quantificada usando o software Image J e o gráfico foi plotado (Fig. [5C, direita](#) e Fig. [5D](#)). Para confirmar que 10 mg/kg de peso corporal de andrographolide não são tóxicos, cortes de tecido renal e hepático de camundongos BALB/c foram corados com hematoxilina e eosina. A morfologia do tecido que é interrompida durante a condição do tumor mantém sua arquitetura original após o tratamento com andrographolide (Fig. [5E](#)).

Todos esses dados certamente significam que o andrographolide reduz eficientemente a carga tumoral, a formação de novos vasos sanguíneos e o volume do tumor e pode ser usado como agente antiangiogênico.

➤ DISCUSSÕES

A angiogênese é uma série controlada de eventos que envolve a formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes⁴. Quando o tamanho do tumor excede além de um tamanho definido; A falta de suprimento de sangue e oxigênio e a condição de déficit de nutrientes levam à mudança angiogênica da quiescência vascular⁶. Este sinal angiogênico leva à liberação de VEGFA. A interação VEGFA-VEGFR2 causa a ativação do receptor levando à ativação da tirosina quinase e ativação de moléculas de sinalização a jusante que medeiam a migração das células endoteliais, proliferação, sobrevivência e permeabilidade vascular^{7,8}.

As tirosina quinases são as principais proteínas através das quais as células tumorais manifestam seu propósito de sobrevivência celular, proliferação, angiogênese e metástase. Portanto, essas quinases são um alvo potencial para o design de medicamentos baseados em computador para tratar o câncer. Estudos auxiliados por computador fornecem informações em nível molecular e atômico que são impossíveis de alcançar por meio de experimentos de laboratório úmido¹⁷.

Portanto, a modelagem molecular e o perfil de simulação são usados para o desenvolvimento de novos medicamentos contra o câncer. Ligprep, GLIDE e módulo Prime do Maestro geraram modelos que foram posteriormente verificados quanto à

afinidade de ligação com

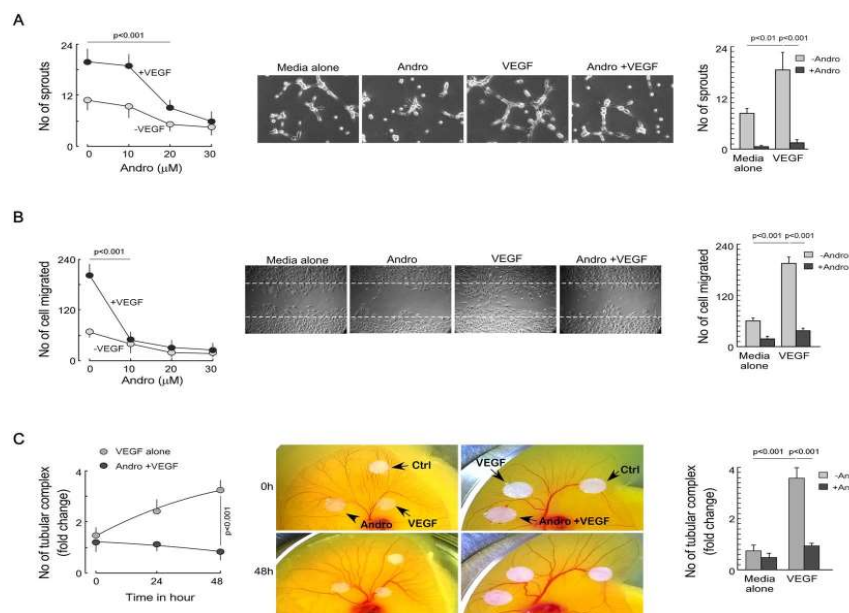


Figura 3. O andrographolide inibe a neoangiogênese. (A) Células endoteliais embebidas em matrigel pré-tratadas com diferentes doses de andrographolide foram estimuladas com 10 ng / ml de VEGF. O número de brotos formados foi quantificado e o gráfico foi plotado (*à esquerda*). As células endoteliais embebidas em matrigel foram pré-tratadas com andrographolide 20 μM e estimuladas com ou sem 10 ng/ml de VEGF. As imagens foram tiradas após 4–6 h (*meio*).

O número de brotos formados foi plotado graficamente (*à direita*). (B) As células endoteliais pré-tratadas com andrographolide foram tratadas com VEGF e o número de células migradas foi quantificado e plotado graficamente (*esquerda*). O ensaio de cicatrização de feridas foi realizado com presença de VEGF de 20 μM de andrographolide (*médio*). O número de células migradas na área da ferida foi contado e plotado graficamente (*à direita*). (C) O embrião de pintinho foi tratado com 20 μg de andrographolide por diferentes intervalos de tempo e o número de complexos tubulares formados na presença e ausência de VEGF foi testado pelo software Angioquant (*esquerda*). O ensaio CAM foi realizado na presença ou ausência de VEGF (*médio*). O número de complexos tubulares foi quantificado usando o software Angioquant e plotado graficamente (*à direita*). Os valores são médios ± SEM de três experimentos independentes em cada caso ou representativos de um experimento típico.

VEGFR2 tirosina quinase A estrutura cristalina do tivozanibe no domínio da quinase VEGFR2 foi retirada do banco de dados de proteínas. Tanto o tivozanibe quanto o andrographolide (*composto escolhido in-silico*) foram acoplados usando o módulo GLIDE e o escore de encaixe foi calculado. O docking molecular ofereceu prováveis conformações de ligação de moléculas de ligantes com o sítio de ligação de ATP de VEGFR2. Tanto o tivozanibe quanto o andrographolide estão imitando o padrão de ligação do ATP. Assim, como o tivozanibe, o andrographolide também pode atuar como um inibidor competitivo de ATP para VEGFR2.

Aqui, todas as três moléculas (ATP, tivozanibe, andrographolide) estão nas proximidades da bolsa de adenina (Glu-917 e Cys-919) e da bolsa hidrofóbica posterior (Glu-885 e Asp-1046), esses são os principais resíduos preferencialmente direcionados no projeto de medicamento em questão¹⁸. A pontuação de acoplamento negativa indica que a ligação do ligante é energeticamente favorável, os ligantes conhecidos ATP e

tivozanibe estão mostrando energias de acoplamento mais baixas do que as do andrographolide, isso pode ser devido à falta de interações aromáticas encontradas no tivozanibe-Phe-1047. No entanto, o andrographolide está interagindo com os principais resíduos Cys-919, Glu-885 e Asp-1046, portanto, podemos estimar que a ligação do andrographolide com o VEGFR2 é viável.

A aplicação de simulação molecular envolve processos dinâmicos em que a molécula é representada como uma coleção de átomos. A energia potencial do sistema é baseada em um conjunto de equações e parâmetros, que são conhecidos coletivamente como campo de *força*. O resultado do experimento de simulação molecular é gerado como um conjunto de velocidades e coordenadas de partículas que geralmente são denominadas trajetórias. Essas trajetórias fornecem informações sobre a presença de ligações de hidrogênio, distância entre átomos, etc.[17](#).

Em nossos experimentos de simulação, o campo de força Amber14 foi usado. A análise das ligações de hidrogênio sugeriu que as ligações de hidrogênio presentes nas moléculas de água fornecem ancoragem ao andrographolide no domínio da quinase. A análise da ligação de hidrogênio, a energia livre de ligação, o RMSD e o resultado do fator B deduzem simultaneamente que a associação entre VEGFR2 e andrographolide é fisiologicamente estável.

O andrographolide é altamente biodisponível (Tabela [1](#)) e não tem efeitos colaterais (Fig. [5E](#)). O andrographolide tem sido amplamente utilizado como anti-inflamatório e hepatoprotetor[10](#) há séculos. Juntamente com *os estudos in-silico*,

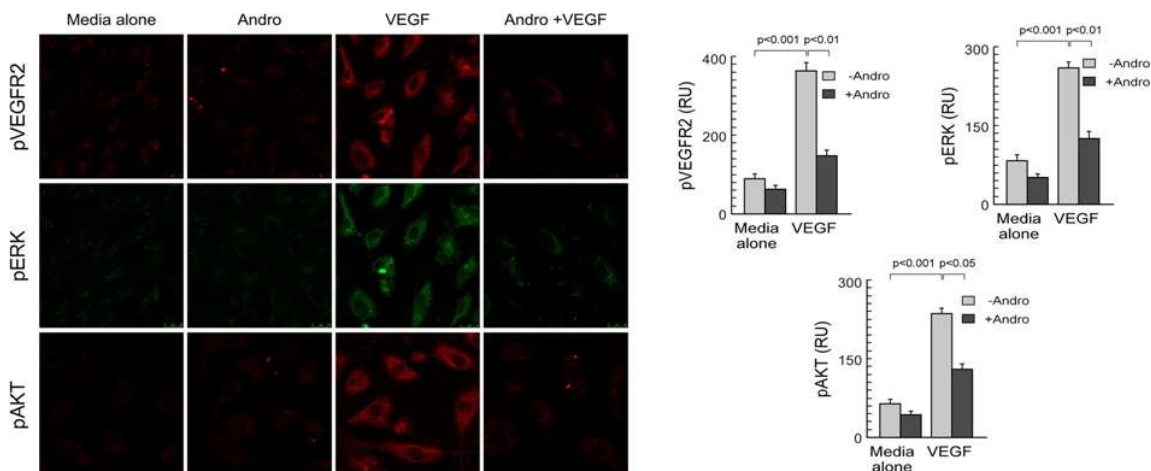


Figura 4. O andrographolide inibe a ativação de moléculas de sinalização a jusante. O estudo microscópico confocal mostra que o andrographolide de 20 μ M inibe a fosforilação de VEGFR2/ERK/AKT induzida por VEGFA (*painel esquerdo*). Ampliação da imagem: 60x; barra de escala: 10 μ m. A intensidade média de fluorescência foi quantificada usando o software Image-J e representada graficamente (*painéis à direita*). Os valores são \pm SEM médios de três experimentos independentes em cada caso ou representativos de um experimento típico, estes foram experimentos de laboratório úmido para validar a eficácia do andrographolide

como composto antiangiogênico. Vários experimentos foram projetados para estudar o efeito do andrographolide sobre a neovascularização induzida por VEGFA.

A formação de brotos, o ensaio de cicatrização de feridas em células endoteliais e o ensaio CAM são *ensaios in vitro e ex-vivo bem estabelecidos* para estudar a neoangiogênese. O andrographolide impede a formação de brotos induzida por VEGFA, a migração celular nas células endoteliais e retarda o crescimento de novos vasos sanguíneos no embrião de galinha.

Durante a neoangiogênese, o VEGFA secretado se liga ao VEGFR2 na superfície da célula endotelial. Este evento leva à fosforilação do VEGFR2 e à ativação de moléculas de sinalização a jusante, como ERK e AKT, que desencadeiam a proliferação e migração de células endoteliais. De acordo com nossa *descoberta in-silico*, o andrographolide compete com o ATP pelo domínio da quinase no VEGFR2, portanto, não permite a atividade da tirosina quinase que bloqueia a fosforilação e a ativação de moléculas de sinalização a jusante como ERK e AKT. Para fins translacionais, usamos dois modelos diferentes de camundongos, por exemplo, (i) tumor de mama singênico e (ii) modelos de camundongos com sarcoma multirresistente.

Experimentos in vivo mostraram que o andrographolide inibe a neoangiogênese mediada por VEGFA. O andrographolide em dose não tóxica suprime a angiogênese tumoral. Tanto o tumor de mama sensível à quimioterapia quanto o modelo de sarcoma resistente à quimioterapia confirmaram que o andrographolide é eficaz, independentemente do tipo de tumor.

➤ MÉTODOS

1. Cultura Celular.

As células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs) foram adquiridas da HiMedia (Proforma Inv. No: 000075), Índia. As células HUVEC foram cultivadas em meio suplementado com crescimento HUVEC (HiMedia). O meio foi ainda suplementado com 5% de FBS inativado pelo calor (Lonza, EUA), penicilina, estreptomicina, anfotericina B. As células foram mantidas em uma atmosfera umidificada de 5% de CO₂ a 37 ° C.

2. Ensaio de Viabilidade Celular.

As células foram cultivadas até a confluência em uma placa de 24 poços revestida com gelatina. As células carentes de soro foram pré-tratadas (90 min) com ou sem andrographolide. O andrographolide foi lavado e, em seguida, as células foram tratadas com VEGF (10 ng / ml) por 18 h. As células viáveis foram contadas usando o teste de

exclusão do corante azul de tripano por hemocítômetro ao microscópio, aumento de 10x.

As células viáveis eram incolores, enquanto as células mortas eram azuis. As células viáveis foram plotadas como porcentagem de controle.

3. Purificação de Andrographolide das Partes Aéreas de *Andrographis*

Paniculata.

A planta *Andrographis paniculata* cultivada *organicamente* foi obtida da Jeevaniya Society, Lucknow, Índia e identificada pelo CSIR-NISCAIR Herbarium and Museum, Nova Delhi. As partes aéreas da planta foram removidas, lavadas com água destilada e secas em estufa a 60 °C durante a noite e convertidas em pó por pulverização. 100 g do pó foram extraídos com 1 litro de etanol: água (1:1 v: v) a 40 °C em um agitador em banho-maria durante a noite. O extrato foi filtrado e o filtrado claro foi evaporado em um evaporador rotativo a pressão reduzida para 100 ml de chorume. 20 ml desta pasta foram carregados em uma coluna de gel de sílica (Merck, Índia, 60-120 mesh) (20 cm × 2,5 cm) usando hexano e eluídos sequencialmente com 200 ml de hexano cada, seguidos de acetato de etila de grau analítico, acetona e, finalmente, com metanol. Cada fração de solvente foi evaporada e a matéria residual foi examinada por TLC comparando com andrographolide autêntico (Sigma Aldrich-EUA).

O material presente na fração de acetona foi cristalizado a partir de metanol para dar cristais amarelos que foram identificados como andrographolide com base em seu perfil de cromatografia em camada fina (TLC), ponto de fusão e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e perfis de RMN de ¹H e comparado com andrographolide autêntico (Sigma Aldrich-EUA).

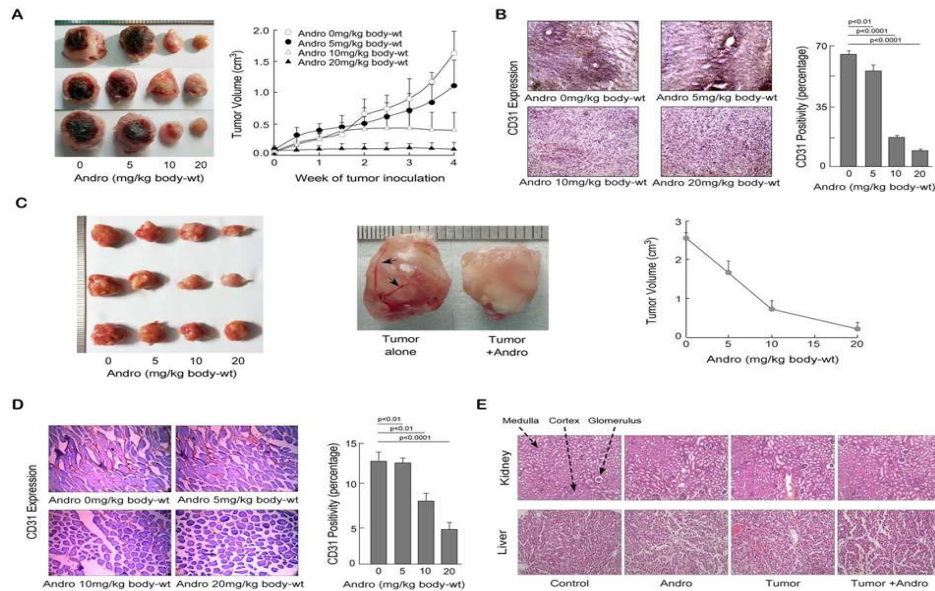


Figura 5. O andrographolide inibe a neoangiogênese no local do tumor. **(A)** Tumor de mama de camundongo isogênico (células 4T1) foi implantado na almofada mamária de camundongos BALB / c. Várias doses de andrographolide reduziram a formação de vasos sanguíneos, o tamanho do tumor (*esquerda*) (ii) O volume do tumor em camundongos implantados 4T1 foi medido e plotado graficamente (*direita*). **(B)** Imagens imuno-histológicas mostrando o nível de expressão de células CD31-positivas em tecido tumoral da mama de camundongos. A área de secção do tumor expressando CD31 foi analisada usando o software Image-J, representada graficamente. **(C)** O andrographolide inibe o tamanho e o volume do tumor em tumores implantados com S-180 resistentes a múltiplas drogas em camundongos albinos suíços (*esquerda e meio*). Ponta de seta mostrando o novo vaso sanguíneo no local do tumor (*meio*). O volume do tumor em camundongos implantados com S-180 foi medido e plotado graficamente (*direita*). **(D)** O nível de expressão de células CD31-positivas em tumor implantado com S-180 tratado com andrographolide. A área de secção do tumor expressando CD31 foi analisada usando o software Image-J e representada graficamente. **(E)** Cortes de rim e fígado (camundongos injetados com 4T1) foram corados com hematoxilina e eosina. Os valores são médios \pm SEM de cinco experimentos independentes em cada caso ou representativos de um experimento típico.

4. Modelo Animal.

Para deduzir a dose antiangiogênica eficaz e não tóxica de andrographolide BALB/c e camundongos albinos suíços foram usados. Camundongos (NCLAS, Hyderabad, Índia) pesando 20–25 g foram mantidos em uma sala com temperatura controlada com ciclo claro-escuro. Todos os experimentos com animais foram realizados seguindo os Princípios de cuidados com animais de laboratório (publicação do NIH nº 85–23, revisada em 1985), bem como as leis indianas sobre 'Proteção de Animais' sob a provisão do Comitê de Ética do Instituto Bose para fins de controle e supervisão de experimentos em animais (Reg. No. 95/99/CPCSEA; Nº de aprovação: IAEC/BI/24/2015). 2×10^6 células 4T1 (ATCC) foram inoculadas na almofada de gordura mamária de camundongos BALB/c. $1,5 \times 10^6$ células S180 multirresistentes (ATCC) foram inoculadas na coxa de camundongos albinos suíços.

Os camundongos portadores de tumor foram divididos em 4 grupos com 5 camundongos em cada conjunto; i) controle, ii) 5 mg/kg de peso vivo, iii) 10 mg/kg de

peso vivo e iv) 20 mg/kg de andrógrafo-olido de peso vivo. Após sete dias de inoculação do tumor, o andrographolide foi fornecido por via oral aos camundongos em dias alternados. Os camundongos foram observados até 28 dias. O volume tumoral foi medido em dias alternados. Os camundongos foram sacrificados após 28 dias e as imagens foram tiradas antes e depois do sacrifício. O peso e o volume do tumor foram medidos após o sacrifício dos camundongos. O tecido tumoral foi fixado em solução de Bouin para estudo imuno-histoquímico.

5. Ensaio de Cicatrização de Feridas.

A migração de HUVEC humano foi determinada usando ensaio de cicatrização de feridas. As células foram cultivadas até a confluência em placas de 12 poços revestidas com gelatina. Microtip estéril foi usado para criar uma ferida em uma monocamada de células carentes de soro pré-tratadas (90 min) com ou sem andrographolide. Em seguida, as células foram tratadas com VEGF recombinante (10 ng/ml). As células monocamada HUVEC foram incubadas por 18 h e as imagens foram capturadas ferida foi calculado pelo software Image-J^{19,20}.

6. Ensaio de Formação de Brotos.

A formação espontânea de estruturas semelhantes a vasos por células endoteliais foi realizada em uma preparação de matriz de membrana basal (Matrigel, BD Biosciences e EUA). As placas foram revestidas com Matrigel (20 mg/ml) e a superfície foi polimerizada a 37 °C por 1 h. Os HUVECs foram semeados sobre poços revestidos com Matrigel, incubados por 1 h a 37 °C. Outras células foram tratadas de acordo, e as imagens foram capturadas após 4-6 horas por microscópio de contraste de fase invertido, e o tubo formando a rede intacta foi contado²⁰.

7. Ensaio de Membrana Corioalantóide (CAM).

O ensaio CAM é o ensaio *ex-vivo mais amplamente utilizado* para estudar a neoangiogênese. O óvulo fertilizado de três dias foi quebrado para manter o embrião intacto. O tratamento foi feito de acordo com a exigência experimental. O ovo foi monitorado em intervalos regulares e as imagens foram tiradas. As imagens foram quantificadas usando o software Angioquant, uma ferramenta automatizada para quantificar a angiogênese (<http://www.cs.tut.fi/sgn/csb/angioquant/>)¹⁶.

8. Microscopia Confocal.

HUVEC (semeado sobre lamínula) foi fixado, permeabilizado e bloqueado com 3% de BSA. O anticorpo primário (1:100) foi diluído em 1% de BSA em PBS e incubado por noite a 4 °C. As células foram contracoradas com anticorpos pVEGFR2

(Tyr-1175, Sigma USA), pAKT (Ser-473, Cell Signaling, EUA) e/ou pERK (Tyr-204, Santa Cruz Biotechnology, EUA) marcados com fluorescência. As células foram montadas com DPX e fotografadas com microscópio confocal invertido Olympus usando objetivas de 63x/100x. As intensidades do laser e os ganhos do detector foram mantidos no mesmo nível durante todas as sessões de imagem para cada experimento. A análise de imagens entre pixels de diferentes canais foi feita usando o software Image-J²¹.

9. Imuno-Histoquímica.

Os tecidos foram dissecados; fixados no fixador de Bouin durante a noite, seções crioprotégidas e seriadas foram cortadas em um criostato (CM1850; Leica) com 4–5 µm de espessura. Os cortes de tecido foram lavados com PBS, a recuperação do antígeno foi feita com o método de recuperação enzimática usando solução de tripsina-CaCl₂. Os cortes foram bloqueados com 1% de BSA a 37 °C. Os cortes foram incubados durante a noite a 25 °C em atmosfera úmida com anticorpos primários contra CD31 (1:100; Santa Cruz Biotechnology, Inc.). Os cortes foram incubados com IgG anti-camundongo biotinizada seguida de conjugado de peroxidase extra-avidina (Sigma-Aldrich; 1:100) por 60 minutos e 3,3'-diaminobenzidina foi usada como cromogênio (Sigma-Aldrich AEC101-1KT; 1:100) para visualizar o produto da reação e contracorada com hematoxilina (1:1; Himedia, Índia). Por fim, os cortes foram lavados em água destilada e montados em gelatina de glicerol. As seções de rim e fígado foram cortadas em um criostato com espessura de 4 a 5 µm. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina. As imagens foram adquiridas com um microscópio de campo claro (Leica) com aumento de 10x.

10. Biologia Estrutural.

A estrutura 3D de andrographolide e ATP foi construída em Maestro²² e outras conformações plausíveis de ligantes foram geradas usando LigPrep²³ módulo do Maestro. Estrutura do receptor de VEGFR2 (4ASE)¹⁴ foram obtidos do banco de dados PDB. Os receptores foram preparados para posterior análise de docking molecular dos ligantes em estudo usando o assistente de preparação de proteínas²⁴ de Maestro. Grades foram geradas sobre os locais de ligação de ligantes de co-cristal com o tamanho da caixa interna de 10Å e tamanho da caixa externa de 30Å. A grelha do VEGFR2 foi validada por acoplamento de ligante de co-cristal, *ou seja*., tivozanibe, o padrão de interação co-cristalina do ligante foi conservado na conformação ancorada.

O tivozanib já é considerado um inibidor do VEGFR2¹⁴. Os ligantes foram

acoplados usando o acoplamento de ligante baseado em grade, ou seja, o módulo GLIDE do Maestro com modo de precisão padrão²⁵. Aqui, várias conformações ancoradas previstas de ATP e andrographolide com domínio de ligação de ATP de VEGFR2 estão se sobrepondo à pose mais encaixada (com base na pontuação de encaixe), o que indica que a pose mais encaixada pode representar a conformação bioativa viável.

O complexo acoplado com melhor pontuação de encaixe de andrographolide-VEGFR2 foi considerado para posterior análise de simulação de dinâmica molecular. Também o estado não ligado do VEGFR2 foi tomado como um sistema de controle. Os resíduos ausentes na estrutura PDB do VEGFR2 (VAL990, ALA991, PRO992, GLU993, ASP994 e LEU995) foram construídos e refinados usando o módulo PRIME do Maestro²⁶.

A análise de simulação foi realizada com AMBER14²⁷. A função harmônica simples utilizada pelo General Amber Force Field (GAFF) e pelo método de carga AM1-BCC foi utilizada para parametrização do sistema andrographolide e proteína com campos de força ff99SB e ff99SBildn de AMBER14^{28,29}. Os **sistemas** foram neutralizados com contra-íons e posteriormente solvatados com caixa de água 8Å do modelo de água TIP3P. O **protocolo padrão** de simulação AMBER foi seguido de minimização em duas etapas, (i) aquecimento por 50 ps e (ii) fase de equilíbrio por 1 ns. Sistemas equilibrados foram usados para uma produção adicional de 10 ns em um conjunto NPT a uma temperatura de 300 K e pressão de 1 atm, com um tamanho de passo de 2 fs. Foram utilizados termostato de Langevin, barostato e aplicado o algoritmo SHAKE^{30,31}.

O método de Ewald de malha de partículas foi aplicado para interações eletrostáticas de longo alcance com espaço de grade de 0,1 nm de grade de transformada rápida de Fourier, e o corte não ligado foi mantido em 12Å³². As **coordenadas** são registradas na trajetória a cada intervalo de tempo de 10 ps. O **módulo** Ptraj de AMBER, PyMol e VMD são usados para fins de análise e visualização^{33–35}. As **energias** livres de ligação do andrographolide foram estimadas usando a abordagem de Mecânica Molecular Poisson-Boltzmann Surface Area (MMPBSA) nos últimos 2 ns quadros de simulação com todos os parâmetros padrão do módulo MMPBSA de âmbar^{36–39}.

11. Análises Estatísticas.

Os valores são mostrados como o erro padrão da média (SEM), exceto quando indicado de outra forma. A comparação de vários grupos experimentais foi realizada pelo teste I-way ANOVA seguido pelo teste post-hoc de Bonferroni. Os dados foram analisados e, quando apropriado, a significância das diferenças entre os valores médios foi determinada por um teste t de Student. Os resultados foram considerados significativos com $p < 0,05$.

➤ DISPONIBILIDADE DE DADOS

Materiais, dados e protocolos associados estarão disponíveis mediante solicitação.

➤ REFERÊNCIAS

1. <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/> **pesquisa / fatos e estatísticas sobre câncer / fatos e números anuais sobre o câncer / 2017 /Fatos e números sobre câncer-pdf.2017.**
2. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. **As características do câncer.** *Célula.* **100**, 57–70 (2000).
3. Zetter, B. R. **As contribuições científicas de M. Judah Folkman para a pesquisa do câncer.** *Nat Rev Câncer.* **8**, 647–654 (2008).
4. Hillen, F. & Griffioen, A. W. **Vascularização tumoral: angiogênese germinada e além.** *Metástase de câncer Rev.* **26**, 489–502 (2007).
5. Bielenberg, D. R. & Zetter, B. R. **A contribuição da angiogênese para o processo de metástase.** *Câncer J.* **21**, 267–273 (2015).
6. Bergers, G. & Benjamin, L. E. **Tumorigênese e o interruptor angiogênico.** *Nat Rev Câncer.* **3**, 401–410 (2003).
7. Neufeld, G., Cohen, T., Gengrinovitch, S. & Poltorak, Z. **Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e seus receptores.** *FASEB J.* **13**, 9–22 (1999).
8. Koch S & Claesson-Welsh L. **Transdução de sinal por receptores do fator de crescimento endotelial vascular.** *Cold Spring Harb Perspect Med* **2** (2012).

9. Schmidinger, M. **Compreendendo e gerenciando toxicidades de inibidores do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF).** *EJC Suppl.* **11**, 172–191 (2013).
10. Hossain M. S., Urbi Z, Sule A & Hafizur Rahman K. M. **Andrographis paniculata (Burm. f.) Parede.** ex Nees: uma revisão de etnobotânica, fitoquímica e farmacologia. *Jornal Mundial Científico.* **274905** (2014).
11. Wang, L. J. *et al.* **O andrographolide inibe a carcinogênese oral de células escamosas por meio da inativação de NF- κ B.** *J Dent Res.* **90**, 1246–1252 (2011).
12. Zhai, Z. *et al.* **O andrographolide previne a perda óssea osteoclástica induzida por câncer de mama humano por meio da sinalização RANKL atenuada.** *Tratamento de câncer de mama.* **144**, 33–45 (2014).
13. Shen, K. *et al.* **O andrographolide inibe a angiogênese tumoral por meio do bloqueio da cascata de sinalização VEGFA / VEGFR2-MAPKs.** *Interação química biol.* **218**, 99–106 (2014).
14. McTigue, M. *et al.* **Conformações moleculares, interações e propriedades associadas à eficiência do medicamento e desempenho clínico entre inibidores de VEGFR TK.** *PNAS.* **109**, 18281–18289 (2012).
15. Small-Molecule Drug Discovery Suite 2013 **QikProp, versão 3.8**, Schrödinger, LLC, Nova York, NY, (2013).
16. Rema, R. B., Rajendran, K. & Rangunathan, M. **Eficácia angiogênica da heparina na membrana corioalantóide de pintinhos.** *Célula Vasc.* **4**, 8 (2012).
17. Friedman, R., Boye, K. & Flatmark, K. **Modelagem molecular e simulações na pesquisa do câncer.** *Biochim Biophys Acta.* **1836**, 1–14 (2013).
18. Sanphanya, K., Wattanapitayakul, S. K., Phowichit, S., Fokin, V. V. & Vajragupta, O. **Novos inibidores da quinase VEGFR-2 identificados pela abordagem de trás para frente.** *Bioorg Med Chem Lett.* **23**, 2962–2967 (2013).
19. Sa, G., Murugesan, G., Jaye, M., Ivashchenko, Y. & Fox, P. L. **Ativação da fosfolipase citosólica A2 pelo fator de crescimento básico de fibroblastos através de uma via de fosforilação dependente de proteína quinase ativada por mitógeno p42 em células endoteliais.** *J BiolChem.* **270**, 2360–2366 (1995).
20. Chakraborty, S. *et al.* **A ativação induzida pela capsaicina da alça autorreguladora, p53-SMAR1 regula negativamente o VEGF no câncer de pulmão de células não pequenas para conter a angiogênese.** *PLoS Um.* **9**, e99743 (2014).
21. Saha, T. *et al.* **G-actina guia o transporte nuclear de p53: contribuição potencial da actina monomérica na localização alterada do mutante, p53.** *Sci Rep.* **6**, 32626

(2016).

22.Schrödinger Maestro, **versão 9.6, Schrödinger, LLC**, Nova York. (2013).

23.Schrödinger LigPrep, **versão 2.8, Schrödinger, LLC**, Nova York. (2013).

24.Assistente de preparação de proteínas Schrödinger; Epik versão 2, Schrödinger, LLC, Nova York. (2013).

25.Schrödinger Glide, **versão 6.1, Schrödinger, LLC**, Nova York. (2013).

26.Schrödinger Prime, **versão 3.2, Schrödinger, LLC**, Nova York. (2013).

27.Caso, D. A. *et al.* AMBER versão 14: **Os programas de simulação biomolecular Amber**. Universidade da Califórnia, São Francisco. (2014).

28.Wang, J., Wang, W., Kollman, P. A. & Case, D. A. **Percepção automática do tipo de átomo e do tipo de ligação em cálculos de mecânica molecular**. *J Mol Modelo de gráfico*. **25**, 247–260 (2006).

29.Wang, J., Wolf, R. M., Caldwell, J. W., Kollman, P. A. & Case, D. A. **Desenvolvimento e teste de um campo de força AMBER geral**. *J Comput Chem*. **25**, 1157–1174 (2004).

30.K Vincent, K., Wilfred, G. V. F. & Hünenberger, P. H. **Um algoritmo SHAKE rápido para resolver equações de restrição de distância para pequenas moléculas em simulações de dinâmica molecular**. *J Comp Chem*. **22**, 501–508 (2001).

31.Schneider, T. & Stoll, E. **Estudo de dinâmica molecular de um modelo tridimensional de um componente para transições de fase distorcidas**. *Phys Rev B*. **17**, 1302 (1978).

32.Darden, T., York, D. & Pedersen, L. **Malha de partículas Ewald: Um N. Log, Método para Calcular Somas de Ewald**. *J Chem Phys*. **98**, 10089–10092 (1993).

33.Roe, D. R. & Cheatham, T. E. 3° PTRAJ e CPPTRAJ: **Software para Processamento e Análise de Dados de Trajetória de Dinâmica Molecular**. *J Teoria Química Comput*. **9**, 3084–3095 (2013).

34.De Lano, W. L. **O Sistema de Gráficos Moleculares PyMOL**. Delano Científico, San Carlos. (2002).

35.Humphrey, W., Dalke, A. & Schulten, K. **VMD: dinâmica molecular visual**. *Gráficos J Mol*. **14**, 3–38 (1996).

36.Cheatham, T. E. 3rd, Srinivasan, J., Case, D. A. & Kollman, P. A. **Dinâmica molecular e estudos contínuos de solvente da estabilidade de duplexes de DNA poliG-poliC e poliA-polyT em solução**. *J Biomol Struct Dyn*. **16**, 265–280 (1998).

37.Kuhn, B. & Kollman, P. A. **Ligação de um conjunto diversificado de ligantes à**

avidina e à estreptavidina: uma previsão quantitativa precisa de suas afinidades relativas por uma combinação de mecânica molecular e modelos de solvente contínuo. *J Med Chem.* **43**, 3786–3791 (2000).

38.Honig, B. & Nicholls, A. **Eletrostática clássica em biologia e química.** *Ciência.* **268**, 1144–1149 (1995).

39.Onufriev, A., Bashford, D. & Case, D. A. **Explorando estados nativos de proteínas e mudanças conformacionais em larga escala com um modelo nascido generalizado modificado.** *Proteínas.* **55**, 383–394 (2004).

AGRADECIMENTOS

Os autores são gratos ao Dr. K. Jana por fornecer acesso às instalações de camundongos no Bose Institute. Os autores também agradecem ao Sr. A.K. Poddar por fornecer suporte técnico em imagens confocais. Este trabalho foi apoiado por uma bolsa de pesquisa do Departamento de Ciência e Tecnologia do Governo da Índia.

CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES

G.S., conceituou o projeto, projetou os experimentos, analisou os dados, editou o manuscrito; K.K., formulou o projeto, desenhou e executou os experimentos, analisou os dados e escreveu o manuscrito; A.K.P., forneceu suporte na realização de experimentos in vivo, preparação de manuscritos e deu sugestões críticas; J.B., realizou experimentos de docking molecular e analisou dados; D.C., realizou imuno-histoquímica; S.B., prestou assistência na realização de experimentos CAM; P.B., forneceu suporte na realização do experimento CAM e padronização da dose de andrographolide em células endoteliais; T.S., prestou assistência técnica; S.C., projetou docking molecular e outros experimentos biofísicos; S.K.K. forneceu andrographolide purificado, deu sugestões críticas e editou o manuscrito.

INFORMAÇÕES ADICIONAIS

Interesses Conflitantes: Os autores declaram não haver interesses conflitantes.

Nota do Editor: A Springer Nature permanece neutra em relação a reivindicações jurisdicionais em mapas publicados e afiliações institucionais.

Acesso Aberto: Este artigo está licenciado sob uma Licença Creative Commons Atribuição 4.0 Internacional, que permite o uso, compartilhamento, adaptação, distribuição e reprodução em qualquer

meio ou formato, desde que você dê o devido crédito ao(s) autor(es) original(is) e à fonte, forneça um link para a licença Creative Commons e indique se foram feitas alterações. As imagens ou outro material de terceiros neste artigo estão incluídos na licença Creative Commons do artigo, salvo indicação em contrário em uma linha de crédito do material. Se o material não estiver incluído na licença Creative Commons do artigo e seu uso pretendido não for permitido por regulamentação legal ou exceder o uso permitido, você precisará obter permissão diretamente do detentor dos direitos autorais. Para ver uma cópia desta licença, visite <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© O(s) autor(es) 2019