

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

LARISSA PEREIRA DAMASCENO

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE VIAS ANGIOGÊNICAS NO
GLIOBLASTOMA E INVESTIGAÇÃO POR DOCKING MOLECULAR
DE FLAVONOÍDEOS COMO POTENCIAIS INIBIDORES**

ALFENAS-MG

2025

LARISSA PEREIRA DAMASCENO

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE VIAS ANGIOGÊNICAS NO
GLIOBLASTOMA E INVESTIGAÇÃO POR DOCKING MOLECULAR DE
FLAVONOIDES COMO POTENCIAIS INIBIDORES**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como parte dos requisitos
para obtenção do título de Bacharel em
Biotecnologia pela Universidade Federal
de Alfenas.

Orientador: Prof. Dr. Nelson José
Freitas da Silveira

ALFENAS-MG

2025

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

Damasceno, Larissa Pereira .

Análise da expressão gênica de vias angiogênicas no glioblastoma e investigação por docking molecular de flavonoides como potenciais inibidores / Larissa Pereira Damasceno. - Alfenas, MG, 2025.

48 f. -

Orientador(a): Nelson José Freitas da Silveira.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia) -
Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2025.

Bibliografia.

1. Angiogênese. 2. Glioblastoma. 3. Flavonoides. I. Silveira, Nelson José Freitas da, orient. II. Título.

LARISSA PEREIRA DAMASCENO


**ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE VIAS ANGIOGÊNICAS NO
GLIOBLASTOMA E INVESTIGAÇÃO POR DOCKING MOLECULAR DE
FLAVONOIDES COMO POTENCIAIS INIBIDORES**

O Presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação do Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia pela Universidade Federal de Alfenas.

Aprovada em: 15 de dezembro de 2025


Prof. Dr. Marcos Vinícios Salles Dias
Universidade Federal de Alfenas

Assinatura:

Documento assinado digitalmente
 **MARCOS VINÍCIOS SALLES DIAS**
Data: 16/12/2025 08:56:02-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Doutorando Caio Pacífico Mariano
Universidade Federal de Alfenas

Assinatura:

Documento assinado digitalmente
 **CAIO PACIFICO MARIANO**
Data: 16/12/2025 05:41:53-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr . Nelson José Freitas da Silveira
Universidade Federal de Alfenas

Assinatura:

Documento assinado digitalmente
 **NELSON JOSE FREITAS DA SILVEIRA**
Data: 16/12/2025 12:43:35-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.”

(EINSTEIN, 1949)

Resumo

A angiogênese desempenha um papel crucial no desenvolvimento de tumores sólidos. Nesse contexto, o glioblastoma (GB), o tumor cerebral mais agressivo e vascularizado, e sua evolução dependem intensamente da formação de novos vasos sanguíneos. Considerando as limitações encontradas nas terapias atuais, como a resistência terapêutica e a impermeabilidade à barreira hematoencefálica, este estudo investigou genes angiogênicos superexpressos no GB. Além disso, visto o potencial de flavonóides no tratamento de diversas doenças, como no controle de mecanismos vasculares, o estudo também investiga o seu papel como moduladores antiangiogênicos por meio de análises *in silico*. Para isso, foram selecionados 270 genes pertencentes às vias VEGF, PI3K-Akt, HIF-1 e MAPK pela plataforma KEGG, e analisados os dados de expressão do dataset GSE4290. A análise diferencial identificou 217 genes expressos de forma significativa, revelando ativação simultânea de múltiplos programas pró-angiogênicos no GB. A partir dos genes superexpressos, foram selecionados dentre os 10 mais expressos os genes que impactaram em mais vias selecionando o VEGFA e ANGPT2. Com base na escolha dos genes foi selecionados os alvos proteicos VEGFR2 e TIE2, pois ambos atuam como receptores mediadores da sinalização induzidas pelos genes, para estudos de docking molecular com 20 flavonoides previamente descritos na literatura. A triagem virtual possibilitou a identificação de compostos com afinidade de ligação e potenciais interações inibitórias apenas para VEGFR2. Além disso, a análise de permeabilidade cerebral (BBB) destacou flavonoides com maior probabilidade de atravessar a barreira hematoencefálica, reforçando seu potencial terapêutico. Em conjunto, os resultados apontam flavonoides promissores como candidatos para estratégias antiangiogênicas no GB, integrando bioinformática, análise de expressão e modelagem molecular para a desenho racional de novos compostos.

Palavras-chave: Angiogênese Tumoral; Glioblastoma; Flavonoides.

ABSTRACT

Angiogenesis plays a crucial role in the development of solid tumors. In this context, glioblastoma (GB), the most aggressive and highly vascularized brain tumor, strongly depends on the formation of new blood vessels for its progression. Considering the limitations of current therapies, such as therapeutic resistance and the restricted permeability imposed by the blood–brain barrier, this study investigated angiogenic genes that are overexpressed in GB. Additionally, given the potential of flavonoids in the treatment of various diseases, particularly in the modulation of vascular mechanisms, this study also explored their role as antiangiogenic modulators through *in silico* analyses. For this purpose, 270 genes belonging to the VEGF, PI3K–Akt, HIF-1, and MAPK pathways were selected using the KEGG platform, and gene expression data from the GSE4290 dataset were analyzed. Differential expression analysis identified 217 significantly expressed genes, revealing the simultaneous activation of multiple pro-angiogenic programs in GB. Among the overexpressed genes, VEGFA and ANGPT2 were selected from the top ten most highly expressed genes based on their involvement in multiple pathways. Based on these genes, the protein targets VEGFR2 and TIE2 were selected, as both act as receptor mediators of gene-induced signaling, for molecular docking studies with 20 flavonoids previously described in the literature. Virtual screening enabled the identification of compounds with binding affinity and potential inhibitory interactions exclusively for VEGFR2. Furthermore, blood–brain barrier (BBB) permeability analysis highlighted flavonoids with a higher probability of crossing the BBB, reinforcing their therapeutic potential. Taken together, the results indicate promising flavonoids as candidates for antiangiogenic strategies in GB, integrating bioinformatics, gene expression analysis, and molecular modeling for the rational design of new compounds.

Keywords: Tumor angiogenesis; Glioblastoma; Flavonoids.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Número de genes associados às vias angiogênicas selecionadas no KEGG.....	22
Tabela 2 – Valores de afinidade de ligação dos ligantes selecionados.....	27

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Heatmap dos genes diferencialmente expressos.....	23
Figura 2 – Genes com maior e menor expressão diferencial (Log2FC).....	24
Figura 3 – Rede de interação destacando Genes e Vias	25
Figura 4 – Análise Boiled-Egg da permeabilidade dos flavonoides.....	28

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	OBJETIVOS	17
1.1.1	Objetivos Gerais	17
1.1.2	Objetivos Específicos	17
2	METODOLOGIA	18
	SELEÇÃO DE GENES E OBTENÇÃO DE DADOS DE EXPRESSÃO	18
2.1	EXPRESSÃO	18
2.2	ANÁLISE DE EXPRESSÃO DIFERENCIAL	18
	SELEÇÃO DE ALVOS PROTEICOS E PREPARAÇÃO PARA DOCKING MOLECULAR	19
2.3	DOCKING MOLECULAR	19
2.4	SELEÇÃO E PREPARAÇÃO DE LIGANTES	20
2.5	VALIDAÇÃO DO REDOCKING E TRIAGEM VIRTUAL	20
2.6	AFINIDADE COM A BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA	21
3	RESULTADOS	21
3.1	SELEÇÃO DOS GENES ANGIOGÊNICOS	21
	IDENTIFICAÇÃO DOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS NO DATASET GSE4290	22
3.2	EXPRESSOS NO DATASET GSE4290	22
3.3	ORDENAÇÃO DOS GENES MAIS E MENOS EXPRESSOS	23
	CONSTRUÇÃO DA REDE DE INTERAÇÃO E SELEÇÃO DE GENES-CHAVE	25
3.4	GENES-CHAVE	25
	SELEÇÃO DE ALVOS PARA DOCKING MOLECULAR E LIGANTES TESTE	26
3.5	LIGANTES TESTE	26
3.6	RESULTADOS DO DOCKING MOLECULAR	26
	PREDIÇÃO DE PERMEABILIDADE PELO MODELO BOILED-EGG	28
3.7	BOILED-EGG	28
4	DISCUSSÃO	29
5	CONCLUSÃO	31
	REFERÊNCIAS	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

UNIFAL-MG – Universidade Federal de Alfenas

BHE – Barreira Hematoencefálica

CID – Compound ID (PubChem)

DEG – Differentially Expressed Genes (Genes Diferencialmente Expressos)

FDR – False Discovery Rate

GB – Glioblastoma

MTE – Microambiente Tumoral

GEO – Gene Expression Omnibus

HIF-1 – Hypoxia-Inducible Factor 1

KEGG – Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

Log2FC – Log2 Fold Change

MAPK – Mitogen-Activated Protein Kinase

MEC – Matriz Extracelular

PCA – Principal Component Analysis (Análise de Componentes Principais)

PDB – Protein Data Bank

TMZ – Temozolomida

VEGFR2 – Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2

1. INTRODUÇÃO

O câncer consiste no crescimento desordenado e contínuo de células anormais, configurando um grupo heterogêneo composto por mais de 100 doenças. Atualmente, representa uma das principais causas de mortalidade no mundo e um dos maiores desafios para a saúde pública global (INCA, 2022). Seu desenvolvimento está associado a alterações genéticas e epigenéticas que afetam os mecanismos de regulação, favorecendo a transformação maligna, a progressão tumoral e a aquisição de fenótipos agressivos (Santos *et al.*, 2023; Bukowski; Kciuk; Kontek, 2020). Além disso, os tumores apresentam uma heterogeneidade celular significativa, formando estruturas complexas que compõem um microambiente tumoral (MTE) dinâmico, onde essa diversidade celular contribui para a proliferação, invasão e resistência ao tratamento (Santos *et al.*, 2023; Brown *et al.*, 2023).

Entre os processos biológicos que sustentam a progressão dos tumores sólidos, destaca-se a angiogênese, um mecanismo essencial para o crescimento e a manutenção tumoral, resultando de um desequilíbrio entre fatores dentro do MTE (Huinen *et al.*, 2021). Esse processo corresponde à formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes e é fundamental em condições fisiológicas, como cicatrização, regeneração tecidual e desenvolvimento embrionário (Bhat, *et al.* 2021). No entanto, quando em contexto tumoral, esse processo encontra-se desregulado, favorecendo o suprimento de nutrientes e oxigênio, o que promove um ambiente propício ao crescimento e à sobrevivência das células neoplásicas (Al-Ostoot *et al.*, 2021).

Na ausência de vascularização, os tumores sólidos apresentam crescimento limitado a aproximadamente 1–2 mm, entrando em um estado de dormência. Contudo, com a ativação das vias angiogênicas, ocorre a formação de novos vasos, permitindo o aumento do volume tumoral e da malignidade (Hida; Maishi; Matsuda, 2024). Em condições de hipóxia tumoral, ocorre a hiperexpressão de VEGF, estimulando a migração e proliferação endotelial e favorecendo a progressão tumoral. (Kim; Ji; Lee, 2022). Desse modo a angiogênese não apenas facilita a expansão tumoral local, mas também cria rotas para disseminação sistêmica, tornando-se um alvo terapêutico estratégico.

A angiogênese tumoral é altamente regulada por vias que atuam de maneira integrada no microambiente neoplásico. Tal ambiente é rico de células infiltrantes e estromais, vasos sanguíneos, moléculas secretadas, matriz extracelular (MEC), além de pequenas populações de células tumorais que se comportam como células-tronco porém cancerígenas de forma que a sincronia de todos corroboram para o desenvolvimento do câncer (D'amico *et al*, 2021; Nasrolahi *et al*, 2023; Obrador *et al*, 2024). Os estímulos gerados impactam diretamente na expressão de mediadores pró-angiogênicos e, conseqüentemente, no comportamento das células endoteliais, determinando a dinâmica de remodelação dos vasos (Kim; Ji; Lee, 2022). Nesse contexto, a formação de vasos resulta da integração coordenada de diversas vias de sinalização, com destaque para MAPK, PI3K-AKT, VEGF e HIF-1, que atuam de forma interdependente, sustentando processos essenciais do crescimento tumoral, incluindo proliferação celular, adaptação à hipóxia e indução da angiogênese, além de contribuírem para maior agressividade tumoral e resistência terapêutica (Liu *et al*, 2023).

Esse cenário é particularmente evidente no glioblastoma (GB), um dos tumores sólidos mais angiogênicos e dependentes da formação de novos vasos para sustentar seu rápido crescimento e seu alto grau de infiltração nos tecidos cerebrais adjacentes (Obrador *et al*, 2024). Essa neoplasia é classificada como grau IV pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 2021) sendo o tumor primário cerebral mais letal. Ademais, o diagnóstico desse tipo de glioma além de difícil, é mais recorrente com o aumento da idade, enquanto a sobrevida mediana permanece baixa, apesar dos avanços médicos. Contudo, ainda é difícil determinar fatores ambientais que influenciam o seu desenvolvimento (Mosteiro *et al*, 2022; Grochans *et al*, 2022). Além de suas características como crescimento rápido, sua natureza altamente vascularizada e MTE muito heterogêneo, colaboram para o seu mau prognóstico e sobrevida em média de 15 meses após o diagnóstico (Dymova; Kuligina; Richter, 2021; Schaff; Mellinghoff, 2023; Thanh *et al*, 2024).

Nas últimas duas décadas, o tratamento padrão multimodal para GB permaneceu praticamente inalterado, com ressecção cirúrgica, radioterapia e quimioterapia com o uso de Temozolomida (TMZ) (Schaff; Mellinghoff, 2023). Apesar da sua relevância, sua eficácia é limitada pela rápida adaptação tumoral,

pela resistência intrínseca ou adquirida e pela elevada taxa de recidiva (Thanh *et al*, 2024; Yalamarty *et al*, 2023).

Nesse contexto, outras alternativas de tratamentos vêm ganhando destaque, como é o caso do uso de terapias antiangiogênicas como o bevacizumab ou sorafenib combinado com TMZ. Segundo o estudo de Liu, *et al* (2023), o uso de terapias anti terapias anti-angiogênicas surgiu nas décadas de 1990, com a descoberta do papel central da angiogênese no crescimento e metastização tumoral e em 2004, o bevacizumabe, um anticorpo monoclonal que inibe o VEGF, tornou-se o primeiro medicamento antiangiogênico aprovado, sendo o estopim para criação de novos medicamentos e terapias focando na inibição da angiogênese para o tratamento do câncer. Seguindo esse preceito, algumas estratégias têm sido investigadas a fim de tentar contornar esse mau prognóstico, como a tentativa de combinar mais de uma terapia e controlar o desenvolvimento, porém uma grande limitação para esse tipo de tumor é a incapacidade das moléculas de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) ressaltando a importância do descobrimento de moléculas nessa área (Lu *et al*, 2024; Mitusova *et al*, 2022).

No contexto da descoberta de novos alvos terapêuticos específicos, a análise da expressão gênica constitui uma ferramenta importante para a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na progressão tumoral (Li *et al*, 2022). Essa abordagem possibilita a identificação de genes diferencialmente expressos e de vias de sinalização associadas à angiogênese tumoral, permitindo o direcionamento de alvos moleculares relevantes (Liu; Guo; Wang, 2024). Outra estratégia que se destaca nesse contexto é o uso de abordagens computacionais *in silico*, como o docking molecular, atuando de forma complementar na avaliação de potenciais interações entre pequenas moléculas e alvos proteicos específicos (Shaker *et al*, 2021). Essa técnica permite estimar a afinidade de ligação entre ligantes e proteínas envolvidas na angiogênese tumoral, auxiliando na priorização inicial de compostos com maior potencial terapêutico (Forli *et al*, 2016). Contudo, por não reproduzir integralmente a complexidade do ambiente biológico, o docking molecular deve ser interpretado como uma ferramenta auxiliar às análises experimentais (Sahu *et al*, 2024).

Além disso outra estratégia é buscar por novos compostos bioativos, especialmente derivados de produtos naturais, têm ganhado destaque no desenvolvimento de terapia antitumoral (Asma *et al*, 2022). Entre tais compostos, os flavonóides se destacam por sua ampla presença em vegetais e plantas medicinais e por apresentarem atividades antioxidantes, antiinflamatórias e antitumorais (Al-Khayri *et al*, 2022). Além disso, alguns estudos mostram que esses metabólitos são capazes de modular vias de sinalização relacionadas à mecanismos de desenvolvimento do tumor, reduzindo a expressão de fatores pró-angiogênicos e com baixa toxicidade em comparação a muitos fármacos sintéticos. Dessa forma, os flavonoides despontam como candidatos promissores para estratégias terapêuticas voltadas ao controle da angiogênese tumoral (Wei; Zhang, 2024; Subbaraj; Kumar; Kulanthaivel, 2021).

Os Flavonoides compreendem uma classe de produtos naturais muito buscadas para o tratamento de diversos tipos de doenças devido seus potenciais efeitos terapêuticos (Panche; Diwan; Chandra, 2016; Chae *et al*, 2019). Alguns deles são mencionados no contexto de suas atividades anticâncer como baicalein, apigenin, luteolin, quercetin, kaempferol, fisetin, myricetin e genistein. Dentre alguns mais citados tem-se hesperetin e luteolin, com efeito redutor de migração e metástase no câncer gástrico, enquanto quercetin, genistein e myricetin são discutidos no contexto do câncer pancreático (Ding; Yu, 2025).

Ademais, tais compostos naturais exercem um impacto profundo e amplamente documentado na inibição da angiogênese, atuando como moduladores-chave de vias moleculares essenciais para a formação de novos vasos sanguíneos. Segundo o estudo de Khater, Greco E Osborn (2020), os flavonoides bloqueiam principalmente o eixo VEGF/VEGFR, reduzem a estabilização do HIF-1 α , suprimem enzimas pró-invasivas como MMP-2 e MMP-9, e interrompem vias sinalizadoras cruciais como PI3K/Akt, MAPK/ERK e NF- κ B, todas responsáveis pela proliferação, migração e sobrevivência de células endoteliais. Além disso, ressaltam flavonas, flavonóis e isoflavonas como os compostos mais potentes, demonstrando em modelos experimentais ser capazes de reduzir a neovascularização entre 60–80%. Portanto, os flavonoides atuam como agentes antiangiogênicos naturais altamente eficazes, combinando múltiplos mecanismos moleculares para bloquear

seletivamente a formação de novos vasos em condições de câncer, inflamação ou estímulos pró-angiogênicos.

Diante do papel central da angiogênese na progressão do GB e das limitações das terapias atualmente disponíveis, torna-se necessária a busca por novas abordagens terapêuticas mais eficazes e seguras. Nesse contexto, a associação entre análise de expressão gênica e prospecção de compostos naturais se apresenta como uma estratégia promissora. Assim, o presente estudo tem como objetivo analisar a expressão gênica de genes envolvidos nas principais vias angiogênicas no GB, com ênfase nas vias MAPK, PI3K-AKT, VEGF e HIF-1, visando à identificação de genes superexpressos que possam atuar como potenciais alvos terapêuticos. A partir desses dados, realizou-se a prospecção de 20 flavonoides previamente descritos na literatura com potencial ação antiangiogênica, buscando contribuir para a identificação de novas alternativas no controle da angiogênese no GB.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivos Gerais

Identificar genes angiogênicos superexpressos no GB e avaliar o potencial de flavonoides como inibidores desses alvos por meio de análises in silico.

1.1.2 Objetivos Específicos

- a. Identificar genes angiogênicos das vias VEGF, PI3K-Akt, HIF-1 e MAPK.
- b. Determinar genes superexpressos no GB por análise de expressão gênica.
- c. Definir proteínas-alvo a partir dos genes mais relevantes.
- d. Selecionar flavonoides com potencial antiangiogênico.
- e. Avaliar a afinidade entre proteínas-alvo e flavonoides.
- f. Identificar os compostos com maior afinidade e avaliar sua permeabilidade na BHE.

2. METODOLOGIA

2.1. Seleção de genes e obtenção de dados de expressão

Para investigar a angiogênese em gliomas, foram selecionadas quatro vias clássicas de sinalização: VEGF, PI3K-AKT, HIF-1 e MAPK, utilizando o banco de dados KEGG, complementado por consultas ao GeneCards e à literatura especializada. Foram considerados apenas genes humanos com função comprovada na regulação da angiogênese tumoral. Os dados de expressão gênica foram obtidos do dataset GSE4290, disponível no Gene Expression Omnibus (GEO) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>), contendo 81 amostras de gliomas e 23 tecidos cerebrais normais. O pré-processamento inclui download dos dados brutos em formato CEL (microarray), normalização utilizando os pacotes limma para microarray, transformação logarítmica (\log_2) e ajuste entre amostras. Além disso, foi realizada análise de componentes principais (PCA) para identificação de outliers e verificação da qualidade dos dados.

2.2. Análise de expressão diferencial

A análise de expressão diferencial entre gliomas e tecido normal foi realizada para identificar genes superexpressos pertencentes às vias selecionadas, para isso as amostras foram selecionadas do dataset (GSE4290). Utilizou-se o modelo linear do pacote limma (Smyth, 2005; Tong, 2021) para microarrays, calculando o \log_2 fold change (\log_2FC) de cada gene. Os valores de p foram ajustados pelo método de Benjamini-Hochberg (FDR) (Chen; Sarkar, 2020), considerando $FDR < 0,05$ como critério de significância. Para filtrar os genes diferencialmente expressos, os valores de Log2 Fold Change (\log_2FC) foram ordenados de forma crescente, permitindo distinguir aqueles superexpressos no tumor ($\log_2FC > 1$) dos superexpressos no tecido normal ($\log_2FC < -1$) e gerou-se uma tabela (APÊNDICE1). Com base nessa

organização, foi gerado um gráfico de barra que destacou apenas os 10 genes mais superexpressos no GB e os 10 mais superexpressos no tecido normal, permitindo identificar de forma clara os alvos de maior relevância biológica. Esses gráficos possibilitam uma visualização comparativa entre os dois grupos, facilitando a interpretação e a seleção de genes potencialmente associados à angiogênese.

Com base nos genes diferencialmente superexpressos, foi construída uma rede de interação molecular utilizando o software Cytoscape 3.10.4. A rede permitiu visualizar a organização funcional dos genes e identificar elementos que atuam como hubs regulatórios nas vias angiogênicas VEGF, HIF-1, MAPK e PI3K-AKT. As conexões entre os genes evidenciaram os pontos de convergência do programa angiogênico, e destacam potenciais alvos para análises subsequentes de triagem *in silico*.

2.3. Seleção de alvos proteicos e preparação para docking molecular

Os alvos proteicos selecionados para os estudos de docking molecular foram os receptores VEGFR2 (KDR) e TIE2 (TEK), por serem os mediadores diretos da sinalização induzida por VEGFA e ANGPT2, respectivamente. Considerando que VEGFA e ANGPT2 atuam como ligantes solúveis, a escolha dos receptores permitiu a utilização de estruturas com domínios catalíticos bem definidos e adequados para a interação com pequenas moléculas. As estruturas cristalográficas foram obtidas no Protein Data Bank (PDB, <https://www.rcsb.org/>), priorizando proteínas humanas, com presença de ligante co-cristalizado e alta resolução estrutural ($\leq 2,5$ Å). Para o receptor VEGFR2, foi utilizada a estrutura do domínio quinase humano em complexo com um análogo do inibidor AZD3229 (PDB ID: 6GQO), determinada por difração de raios X com resolução de 1,87 Å. Para o receptor TIE2, foi empregada a estrutura cristalográfica humana em complexo com o inibidor DP1919 (PDB ID: 6MWE), obtida por difração de raios X com resolução de 2,05 Å. As grades de docking foram configuradas com base nos ligantes co-cristalizados, com os seguintes parâmetros em AutoDock Vina: VEGFR2 (6GQO) – center_x = 18.83, center_y = 0.546, center_z = 9.937; size_x = 28.5, size_y = 20.25, size_z = 16.5; TIE2 (6MWE) – center_x =

-10.92, center_y = 34.075, center_z = 115.95; size_x = 16.5, size_y = 15.0, size_z = 24.0. Ambas as estruturas foram utilizadas para a validação do protocolo de docking por redocking e para a realização da triagem virtual dos compostos estudados.

2.4. Seleção e preparação de ligantes

Os ligantes utilizados neste estudo consistiram em flavonoides selecionados com base em referências da literatura, devido às suas propriedades antiangiogênicas e potenciais efeitos antitumorais. A seleção foi baseada em buscas em bases de dados científicas, incluindo o PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>), o Scopus (<https://www.scopus.com>) e o Google Scholar (<https://scholar.google.com>), usando termos como “flavonoid AND angiogenesis”, “flavonoid AND wound healing” e “flavonoid AND anti-angiogenic”, privilegiando estudos com descrições mecanísticas (por ex., inibição do eixo VEGF/VEGFR, redução da estabilização de HIF-1 α , supressão de MMPs) e dados farmacocinéticos iniciais. Os compostos incluíram flavonoides comuns, como Quercetin, Kaempferol, Myricetin, Fisetin, Galangin, Pinocembrin, Naringenin, Hesperetin, Dihydrokaempferol, Taxifolin, Luteolin, Chrysin, Baicalein, Baicalin, Wogonin, Isorhamnetin, Rhamnetin, Morin, Daidzein e Genistein, sendo identificados pelos respectivos CIDs no banco de dados PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) (Kim *et al*, 2025). A preparação das moléculas para docking, incluindo adição de cargas, otimização geométrica e conversão para o formato PDBQT, foi realizada utilizando o AutoDock Tools (Forli *et al*, 2016), e a análise de docking molecular foi conduzida com o AutoDock Vina 1.2.0 (Eberhardt *et al*, 2021).

2.5. Validação do redocking e triagem virtual

O protocolo de molecular docking foi validado por meio do redocking dos ligantes co-cristalizados nas estruturas de 6GQO e 6MWE, utilizando o programa AutoDock Vina. A acurácia do procedimento foi avaliada pela comparação entre as

poses previstas e as conformações cristalográficas, por meio do cálculo do RMSD, considerando-se valores inferiores a 2,0 Å como aceitáveis. O ligante F82 apresentou RMSD de 0,656 Å na estrutura 6GQO, enquanto o ligante 911 apresentou RMSD de 1,695 Å na estrutura 6MWE, confirmando a validação do protocolo. As energias de ligação e as principais interações moleculares foram analisadas e utilizadas como controles de referência para comparações posteriores com o conjunto de ligantes avaliados. Após a validação, a triagem virtual foi realizada com todos os compostos, e os escores de docking obtidos foram organizados em ordem decrescente de afinidade de ligação predita.

2.6. Afinidade com a Barreira Hematoencefálica

A avaliação da permeabilidade dos ligantes à BHE foi realizada utilizando a plataforma SwissADME (Daina *et al*, 2017). Para isso, foi utilizado a estrutura smile dos flavonoides obtidos também pelo PubChem. As moléculas foram submetidas à análise, de absorção gastrointestinal, potencial de ser substrato de P-glicoproteína e capacidade de permeação na barreira hematoencefálica (no SwissADME aparece como BBB) , dentre outras. Os resultados forneceram informações preditivas sobre a biodisponibilidade e a distribuição central desses compostos, auxiliando na seleção de candidatos com maior probabilidade de atingir o sistema nervoso central.

3. RESULTADOS

3.1. Seleção dos genes angiogênicos

Inicialmente, foram selecionadas os genes que atuam na angiogênese pertencentes às VEGF, HIF-1, MAPK e PI3K-AKT a partir do KEGG e de busca na literatura, somando 270 genes associados a essas quatro vias.

Tabela 1 – Número de genes associados às vias angiogênicas selecionadas no KEGG.

Via	Genes
VEGF	30
HIF-1	31
MAPK	38
PI3K-AKT	171

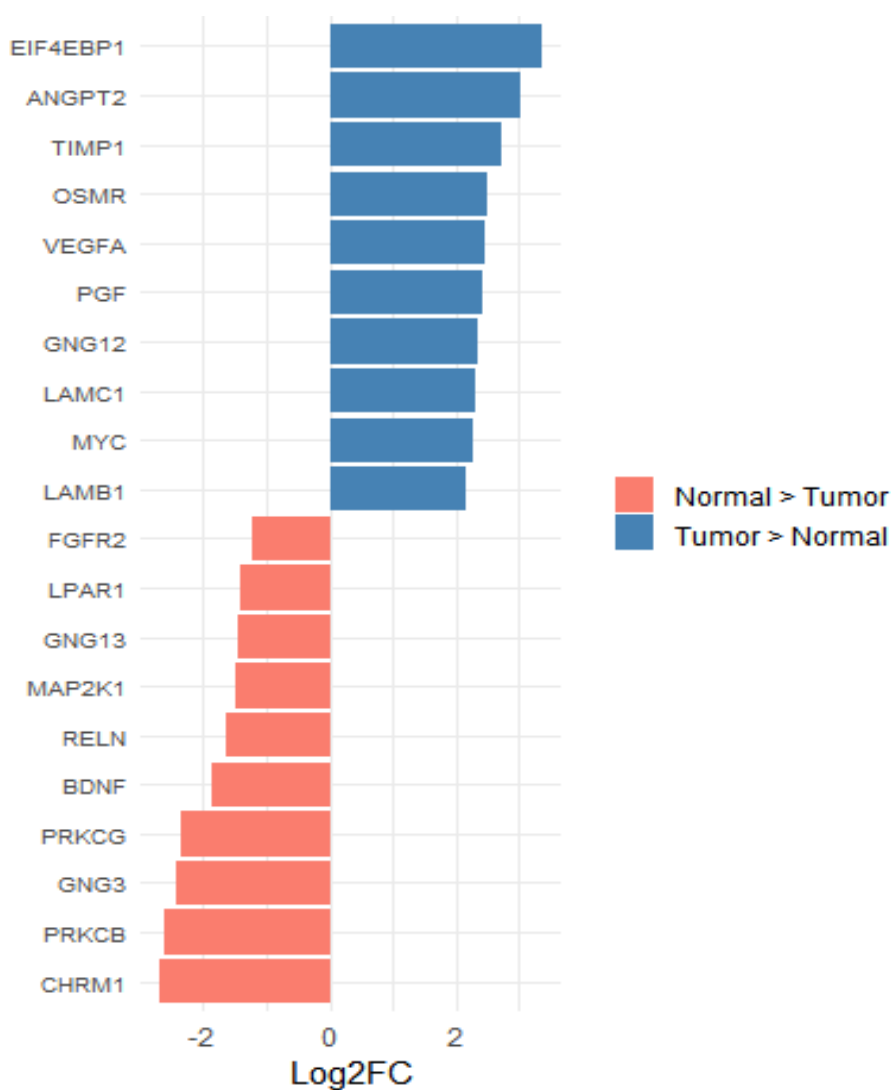
Fonte: Autoria própria (2025).

3.2. Identificação dos genes diferencialmente expressos no dataset GSE4290

A partir da seleção dos genes foi baixado o dataset GSE4290, que contém e selecionadas as amostras de tecido normal e de GB a fim de identificar quais genes das vias listadas estão superexpressos. Aplicando-se os filtros de significância estatística ($FDR < 0,05$) 217 genes foram identificados como diferencialmente expressos. Para visualização inicial dos padrões de expressão, foi construído um heatmap com os 100 genes mais significativos representado na Figura 1. As colunas representam as amostras normais e de GB, e as linhas correspondem aos genes analisados. A escala de cores indica o z-score de expressão (azul = menor expressão; vermelho = maior expressão). A anotação lateral identifica a via de cada gene. Nota-se um padrão geral de maior expressão nos tumores, sugerindo ativação simultânea de múltiplas vias pró-angiogênicas no GB. A partir desses dados, também foi gerada uma tabela contendo os valores de Log2 Fold Change (Log2FC) de todos os genes identificados, incluindo tanto aqueles superexpressos no tumor ($Log2FC > 0$) quanto os superexpressos no tecido normal ($Log2FC < 0$), que será utilizada nas etapas subsequentes da análise (APÊNDICE 1).

no tumor ($\text{Log}_2\text{FC} > 0$) dos superexpressos no tecido normal ($\text{Log}_2\text{FC} < 0$) conforme Figura 2. A partir dessa organização, foram gerados dois gráficos de barras: o primeiro exibindo todos os genes identificados, fornecendo uma visão global do padrão de expressão diferencial; e o segundo apresentando apenas os 10 genes mais superexpressos no GB e os 10 mais superexpressos no tecido normal, destacando os alvos de maior relevância biológica. Essa abordagem possibilitou uma visualização comparativa clara entre os dois grupos, facilitando a interpretação e a seleção de genes potencialmente associados à angiogênese no GB.

Figura 2. Genes com maior e menor expressão diferencial (Log_2FC)

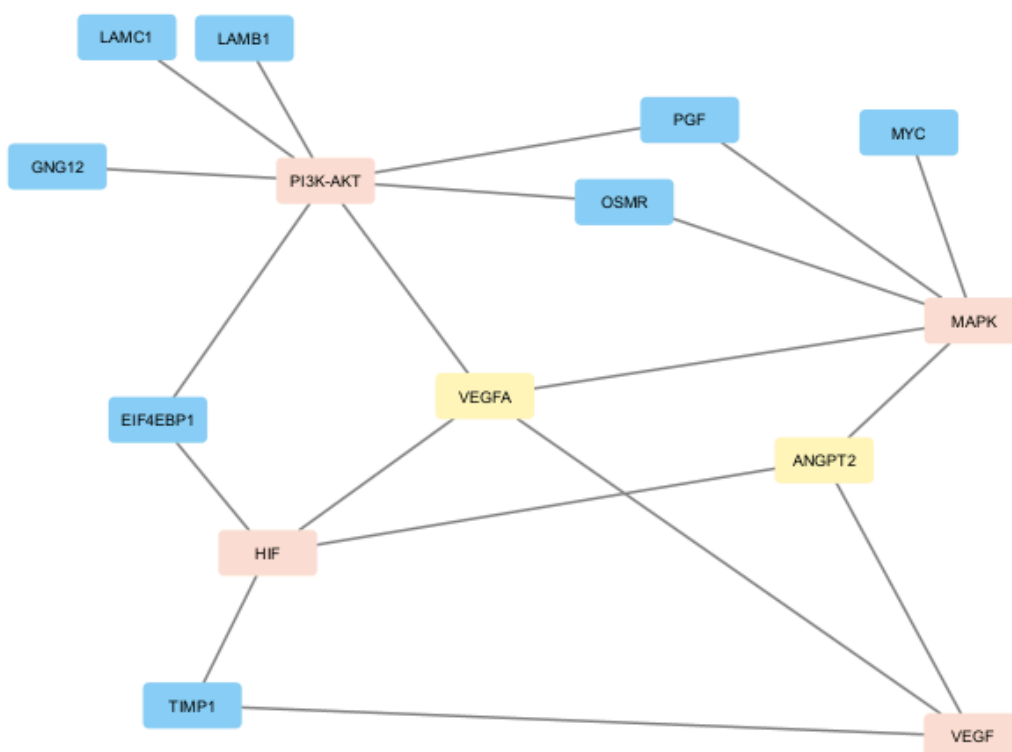


Fonte: Autoria própria (2025).

3.4. Construção da rede de interação e seleção de genes-chave

Com base nos genes diferencialmente superexpressos identificados no gráfico foi construída uma rede de interação no Cytoscape a fim de visualizar como esses genes se organizam funcionalmente e quais elementos atuam como hubs regulatórios. A análise mostrou que PI3K–AKT e MAPK são as vias mais conectadas, integrando sinais de vários genes modulados no GB (Figura 3). Genes estão representados em azul, vias centrais em rosa e genes-chave selecionados (VEGFA e ANGPT2) em amarelo. A rede evidencia a convergência de múltiplas vias pró-angiogênicas sobre esses dois genes no GB, sendo selecionados para as análises subsequentes.

Figura 3 - Rede de interação destacando Genes e Vias



Fonte: Autoria própria (2025). Imagem gerada a partir do Cytoscape.

3.5. Seleção de alvos para docking molecular e ligantes teste

De acordo com esses resultados, selecionamos VEGFA e ANGPT2 como alvos para triagem de potenciais inibidores. Como receptores de docking molecular, foram selecionadas estruturas cristalográficas de alta resolução dos receptores tirosina-quinase associados aos ligantes VEGFA e ANGPT2, uma vez que estes atuam como proteínas solúveis e não apresentam sítios adequados para a ligação de pequenas moléculas. Tais moléculas funcionam em eixos ANGPT2–TIE2 e VEGFA–VEGFR2, Ambas as estruturas apresentam ligantes co-cristalizados, permitindo a validação do protocolo de docking por meio de redocking e assegurando maior confiabilidade às simulações de triagem virtual dos flavonoides selecionados.

A seleção dos ligantes foi realizada com base na busca na literatura, foram selecionados 20 flavonoides previamente descritos por apresentarem atividade relacionada à angiogênese, cicatrização ou inibição da formação vascular. Os compostos incluíram flavonas, flavonóis, flavanonas, flavanonóis, isoflavonas e uma flavona glicosilada. A lista completa dos compostos selecionados foi utilizada para as análises subsequentes de triagem virtual e predição farmacocinética.

3.6. Resultados do docking molecular

Desse modo, foi realizado o docking molecular e, considerando que a margem de erro do AutoDock Vina é de aproximadamente $\pm 2,85$ kcal/mol (Trott; Olson, 2011), os valores de afinidade previstos pelo nosso modelo apresentam uma faixa de incerteza de -14,01 a -8,31 kcal/mol para 6GQO e de -16,39 a -10,69 kcal/mol para 6MWE (Tabela 2). Dessa forma, os valores de afinidade podem ser considerados estatisticamente equivalentes, ou seja, diferenças entre ligantes ou entre modelos dentro dessa faixa não são significativas. Os resultados estão apresentados na Tabela 2, na qual observa-se que a interação com 6GQO foi estatisticamente equivalente ao padrão, enquanto para 6MWE os ligantes apresentaram afinidade inferior ao ligante de referência.

Tabela 2. Valores de afinidade de ligação dos ligantes selecionados.

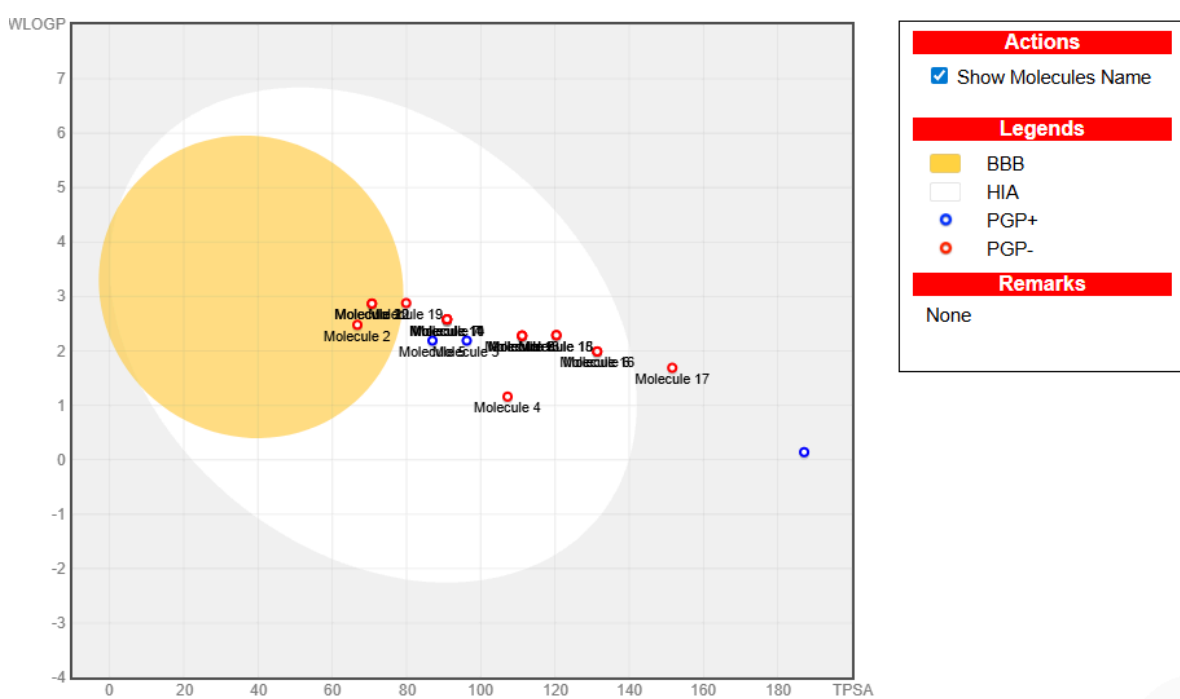
Ligantes	Afinidade 6GQO (kcal/mol)	Afinidade 6MWE (kcal/mol)
CID 64982	-9.617	-9.684
CID 68071	-9.344	-9.275
CID 72281	-9.491	-8.649
CID 122850	-9.103	-9.092
CID 439246	-9.557	-9.009
CID 5280343	-9.456	-9.21
CID 5280443	-10.051	-9.144
CID 5280445	-10.024	-9.054
CID 5280863	-9.616	-9.284
CID 5280961	-8.381	-8.673
CID 5281605	-9.65	-9.343
CID 5281607	-9.685	-9.451
CID 5281614	-9.37	-9.046
CID 5281616	-9.246	-9.23
CID 5281654	-9.545	-8.921
CID 5281670	-9.492	-8.87
CID 5281672	-9.432	-8.969
CID 5281691	-9.419	-8.843
CID 5281703	-8.41	-9.315
CID 5281708	-8.951	-8.63
modelo	-11.113	-13.543

Fonte: A autoria própria (2025).

3.7. Predição de permeabilidade pelo modelo Boiled-Egg

Com o objetivo de identificar um alvo mais específico para o receptor 6QGC, foi realizada uma análise utilizando a plataforma SwissADME, a fim de prever a capacidade dos flavonoides de atravessar a BHE (Figura 4). Nesse processo 20 flavonoides foram investigados quanto à absorção intestinal e penetração cerebral, numerados como: molécula 1 (Baicalin), 2 (Pinocembrin), 3 (Hesperetin), 4 (Dihydrokaempferol), 5 (Naringenin), 6 (Quercetin), 7 (Apigenin), 8 (Luteolin), 9 (Kaempferol), 10 (Genistein), 11 (Baicalein), 12 (Chrysin), 13 (Fisetin), 14 (Galangin), 15 (Isorhamnetin), 16 (Morin), 17 (Myricetin), 18 (Robinetin), 19 (Wogonin), 20 (Daidzein). Os compostos localizados na região correspondente à BHE indicam maior potencial de penetração no sistema nervoso central, enquanto os posicionados na área de absorção intestinal apresentam maior biodisponibilidade oral. A partir dessa avaliação, observou-se que Pinocembrin (Flavanone, CID 68071), Chrysin (Flavone, CID 5281607) e Daidzein (Isoflavone, CID 5281708) apresentam potencial para permeabilidade da BHE.

Figura 4 – Análise Boiled-Egg da permeabilidade dos flavonoides



Fonte: Autoria própria (2025).

DISCUSSÃO

A angiogênese desempenha papel central no desenvolvimento do GB, sendo essencial para a sustentação do rápido crescimento tumoral, fornecimento de oxigênio, nutrientes e coordenação de fatores (D'amico *et al*). Os resultados obtidos neste estudo corroboram esse papel ao demonstrarem a superexpressão de diversos genes pertencentes às principais vias pró-angiogênicas (PI3K-AKT, VEGF, MAPK e HIF-1) no dataset GSE4290, evidenciando a ativação simultânea desses eixos moleculares no GB. Entre os genes mais superexpressos identificados, destacam-se EIF4EBP1, ANGPT2, TIMP1, OSMR, VEGFA e PGF, GNG12, LAMC1, MYC e LAMB1 todos diretamente relacionados à progressão da angiogênese tumoral, remodelamento da matriz extracelular e impactando na sobrevivência celular.

Seguindo com o estudo, a análise da rede de interação molecular no Cytoscape identificou VEGFA e ANGPT2 como hubs regulatórios centrais que reforça sua importância como alvos estratégicos para intervenções terapêuticas, justificando sua escolha para as análises de docking molecular. Nesse contexto, a elevada expressão de VEGFA e seu impacto nas quatro vias, confirma achados já abordados na literatura que apontam esse fator como um dos principais responsáveis pela intensa vascularização no GB (Obrador *et al*, 2024). Além disso, a superexpressão de ANGPT2 e seu impacto nas vias VEGF, HIF-1 e MAPK, reforça a participação do eixo ANGPT2–TIE2 na plasticidade vascular do tumor, acarretando na desestabilização dos vasos existentes e favorecendo a formação de uma rede vascular desordenada, característica desse tipo de tumor (Ho; Ho, 2021).

A validação do protocolo de docking por meio do redocking apresentou valores de RMSD inferiores a 2,0 Å tanto para o complexo com VEGFR2 quanto para TIE2, indicando confiabilidade nas predições conformacionais. Quando realizada a triagem virtual dos 20 flavonoides revelou-se valores de afinidade de ligação estatisticamente equivalentes ao ligante de referência para o receptor VEGFR2 (6GQO), enquanto para o receptor TIE2 (6MWE) todos os compostos apresentaram score inferior ao padrão. Tais resultados sugerem que os flavonoides

avaliados possuem maior potencial para interferir no eixo VEGFA–VEGFR2 quando comparado ao eixo ANGPT2–TIE2, indicando uma possível seletividade funcional.

No entanto, no contexto do GB, não basta apenas a afinidade molecular; permeabilidade na BHE é uma limitação crítica para a eficácia terapêutica. A análise farmacocinética *in silico* demonstrou que apenas Pinocembrin, Chrysin e Daidzein apresentaram potencial de permeabilidade à BHE, tornando-se candidatos mais promissores para aplicações no sistema nervoso central. Esses compostos exibem características físico-químicas compatíveis com a difusão passiva através da BHE, como baixa área de superfície polar (TPSA), peso molecular reduzido e valores adequados de lipofilicidade. Entre os candidatos, a Chrysin e a Daidzein já são descritas na literatura por apresentarem efeitos antiangiogênicos, antiproliferativos e pró-apoptóticos em diferentes tipos de câncer, incluindo tumores do sistema nervoso central (SHAHBAZ *et al*, 2023). Porém o Pinocembrin, além de apresentar potencial de atravessar a BHE, também possui propriedades neuroprotetoras e anti-inflamatórias, o que pode representar outra vantagem em terapias adjuvantes para GB (SILVEIRA *et al*, 2020).

A integração entre os dados de expressão gênica, rede de interação molecular, docking molecular e predição farmacocinética permitiu a priorização racional de alvos e compostos com maior potencial translacional. Esse tipo de abordagem integrada se mostra especialmente relevante no GB, cuja alta heterogeneidade molecular e resistência terapêutica exigem estratégias de análises mais integrativas. Os flavonoides identificados neste estudo podem atuar não apenas inibindo a angiogênese, mas também modulando vias relacionadas à proliferação, inflamação e estresse oxidativo, ampliando seu potencial terapêutico.

Apesar dos resultados serem promissores, é importante destacar que as análises realizadas são de natureza *in silico*, o que representa uma limitação inerente ao estudo. Tanto as predições de afinidade, quanto de permeabilidade cerebral necessitam de validação experimental por meio de ensaios *in vitro* e *in vivo*, incluindo testes de citotoxicidade em células de GB, ensaios de migração e formação de tubos endoteliais, além de modelos animais para avaliação farmacocinética e eficácia terapêutica. Ainda assim, os achados deste trabalho fornecem uma base molecular consistente para a seleção de novos candidatos

antiangiogênicos derivados de produtos naturais, fortalecendo o papel dos flavonoides como moléculas promissoras no desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais seguras e eficazes para o tratamento do GB.

CONCLUSÃO

Os resultados encontrados neste estudo evidenciam que os objetivos propostos foram bem atendidos, permitindo uma análise abrangente dos mecanismos e implicações biológicas relacionados ao glioblastoma. A abordagem integrada adotada possibilitou a identificação de alvos angiogênicos centrais e a seleção de flavonoides com potencial terapêutico, destacando-se Pinocembrin, Chrysin e Daidzein, sendo a Pinocembrina particularmente relevante por apresentar potencial de permeabilidade à barreira hematoencefálica e propriedades neuroprotetoras ainda pouco exploradas no contexto de tumores cerebrais. As ferramentas metodológicas empregadas demonstraram-se adequadas, fornecendo dados consistentes; contudo, limitações como o número restrito de amostras e a ausência de validações *in vitro* e *in vivo* devem ser consideradas. Ainda assim, os achados contribuem de forma significativa para o entendimento da angiogênese no GB e apontam perspectivas promissoras para aplicações biotecnológicas e biomédicas futuras.

REFERÊNCIAS

1. AL-OSTOOT, F. H. *et al.* Tumor angiogenesis: Current challenges and therapeutic opportunities. *Cancer Treatment and Research Communications*, v. 28, p. 100422, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ctarc.2021.100422>. Acesso em: 27 nov. 2025.
2. ASMA, S. T. *et al.* Natural Products/Bioactive Compounds as a Source of Anticancer Drugs. *Cancers*, v. 14, n. 24, p. 6203, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cancers14246203>. Acesso em: 27 nov. 2025.
3. BHAT, S. M.; *et al.* 3D tumor angiogenesis models: recent advances and challenges. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, v. 147, p. 3477–3494, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00432-021-03701-4>. Acesso em: 27 nov. 2025.
4. BROWN, J. S. *et al.* Updating the Definition of Cancer. *Molecular Cancer Research*. 2023. Vol. 21, n. 11, p. 1142–1147. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-23-0411>. Acesso em: 27 nov. 2025.
5. BUKOWSKI, K.; KCIUK, M.; KONTEK, R. Mechanisms of multidrug resistance in cancer chemotherapy. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 9, p. 3233, 2020. DOI: 10.3390/ijms21093233. Acesso em: 27 nov. 2025.
6. BURLEY, S. K. *et al.* Updated resources for exploring experimentally-determined PDB structures and computed structure models at the RCSB Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, v. 53, p. 563-565, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkae1091>. Acesso em: 27 nov. 2025.
7. CHAE, H. S.; *et al.* Molecular targets of genistein and its related flavonoids to exert anticancer effects. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 20, n. 10, p. 2420, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms20102420>. Acesso em: 27 nov. 2025.
8. CHEN, X.; SARKAR, S. K. On Benjamini–Hochberg procedure applied to mid-values. *Journal of Statistical Planning and Inference*, v. 205, p. 34–45, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jspi.2019.06.001>. Acesso em:

- 15 dez. 2025.
9. D'AMICO, A. G.; *et al.* Multimodal Role of PACAP in Glioblastoma. *Brain Sciences*, v. 11, n. 8, p. 994, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/brainsci11080994>. Acesso em: 27 nov. 2025.
 10. DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific Reports*, v. 7, p. 42717, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/srep42717>. Acesso em: 1 dez. 2025.
 11. DING, Y.; YU, Y. Therapeutic potential of flavonoids in gastrointestinal cancer: focus on signaling pathways and improvement strategies (Review). *Molecular Medicine Reports*, v. 31, n. 4, art. 109, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.3892/mmr.2025.13474>. Acesso em: 27 nov. 2025.
 12. DYMOVA, M. A.; KULIGINA, E. V.; RICHTER, V. A. Molecular mechanisms of drug resistance in glioblastoma. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 12, p. 6385, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms22126385>. Acesso em: 27 nov. 2025.
 13. EBERHARDT, J. *et al.* AutoDock Vina 1.2.0: new docking methods, expanded force field, and python bindings. *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 61, p. 3891–3898, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.1c00203>. Acesso em: 15 dez. 2025.
 14. EINSTEIN, Albert. In: CALAP, Frank. *The Universe and Dr. Einstein*. New York: Viking Press, 1949. Acesso em: 27 nov. 2025.
 15. FORLI, S. *et al.* Computational protein-ligand docking and virtual drug screening with the AutoDock suite. *Nature Protocols*, v. 11, p. 905–916, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.051>. Acesso em: 15 dez. 2025.
 16. GROCHANS, S.; *et al.* Epidemiology of Glioblastoma Multiforme—Literature Review. *Cancers*, v. 14, n. 10, p. 2412, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cancers14102412>. Acesso em: 27 nov. 2025.
 17. HO, R. L. Y.; HO, I. A. W. *et al.* Recent advances in glioma therapy: combining vascular normalization and immune checkpoint blockade. *Cancers*, v. 13, n. 15, p. 3686, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cancers13153686>.

- Acesso em: 1 dez. 2025.
18. HUIINEN, Z. R.; *et al.* Anti-angiogenic agents — overcoming tumour endothelial cell anergy and improving immunotherapy outcomes. *Nature Reviews Clinical Oncology*, v. 18, p. 527–540, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41571-021-00496-y>. Acesso em: 27 nov. 2025.
 19. INCA. Estimativa 2023 : incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer; 2022. 160 p. Acesso em: 27 nov. 2025.
 20. KHATER, M.; GRECO, F.; OSBORN, H. M. I. Antiangiogenic activity of flavonoids: a systematic review and meta-analysis. *Molecules*, v. 25, n. 20, p. 4712, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules25204712>. Acesso em: 27 nov. 2025.
 21. KIM, H. J.; JI, Y. R.; LEE, Y. M. Crosstalk between angiogenesis and immune regulation in the tumor microenvironment. *Archives of Pharmacal Research*, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12272-022-01389-z>. Acesso em: 27 nov. 2025.
 22. KIM, S. *et al.* PubChem 2025 update. *Nucleic Acids Research*, v. 53, p. 1516–1520, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkae1059>. Acesso em: 15 dez. 2025.
 23. LI, X. *et al.* Association of Angiogenesis Gene Expression With Cancer Prognosis and Immunotherapy Efficacy. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, v. 10, p. 805507, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.805507>. Acesso em: 1 dez. 2025.
 24. LIU, H.; GUO, Z.; WANG, P. Genetic expression in cancer research: Challenges and complexity. *Gene Reports*, v. 37, p. 102042, dez. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2024.102042>. Acesso em: 27 nov. 2025.
 25. LIU, Z. L.; *et al.* Angiogenic signaling pathways and anti-angiogenic therapy for cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01460-1>. Acesso em: 27 nov. 2025..
 26. LU, Y.; *et al.* Clinical activity and safety of sintilimab, bevacizumab, and TMZ in patients with recurrent glioblastoma. *BMC Cancer*, v. 24, art. 133, 2024.

- Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12885-024-11653-5>. Acesso em: 27 nov. 2025.
27. MITUSOVA, K.; *et al.* Overcoming the blood–brain barrier for the therapy of malignant brain tumor: current status and prospects of drug delivery approaches. *Journal of Nanobiotechnology*, v. 20, art. 412, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12951-022-01597-7>. Acesso em: 27 nov. 2025.
28. MOSTEIRO, A.; *et al.* The Vascular Microenvironment in Glioblastoma: A Comprehensive Review. *Biomedicines*, v. 10, n. 6, p. 1285, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/biomedicines10061285>. Acesso em: 27 nov. 2025.
29. NASROLAHI, A.; *et al.* Signaling pathways governing glioma cancer stem cells behavior. *Cellular Signalling*, v. 101, p. 110493, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2022.110493>. Acesso em: 27 nov. 2025.
30. OBRADOR, E.; *et al.* Glioblastoma Therapy: Past, Present and Future. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 25, n. 5, p. 2529, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms25052529>. Acesso em: 27 nov. 2025.
31. PANCHE, A. N.; DIWAN, A. D.; CHANDRA, S. R. Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*, v. 5, e47, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>. Acesso em: 27 nov. 2025.
32. SAHU, M. K. *et al.* Exploring recent updates on molecular docking: types, method, application, limitation & future prospects. *International Journal of Pharmaceutical Research and Allied Sciences*, v. 13, n. 2, p. 24–40, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.51847/Une9jqjUCI>. Acesso em: 15 dez. 2025.
33. SANTOS, M. O. *et al.* Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil, 2023-2025. *Revista Brasileira de Cancerologia*, Rio de Janeiro, v. 69, n. 1, e-213700, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.32635/2176-9745.RBC.2023v69n1.3700>. Acesso em: 26 set. 2025.
34. SCHAFF, L. R.; MELLINGHOFF, I. K. Glioblastoma and Other Primary Brain Malignancies in Adults: A Review. *JAMA*, v. 329, n. 7, p. 574–587, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1001/jama.2023.0023>. Acesso em: 27 nov.

- 2025.
35. SHAHBAZ, M. *et al.* Chrysin a promising anticancer agent: recent perspectives. *International Journal of Food Properties*, v. 26, n. 1, p. 2294–2337, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10942912.2023.2246678>. Acesso em: 1 dez. 2025.
 36. SHAKER, B. *et al.* In silico methods and tools for drug discovery. *Computers in Biology and Medicine*, v. 137, p. 104851, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.compbimed.2021.104851>. Acesso em: 15 dez. 2025.
 37. SILVEIRA, C. C. S. M. *et al.* Propolis: A useful agent on psychiatric and neurological disorders? A focus on CAPE and pinocembrin components. *Medicinal Research Reviews*, v. 41, n. 2, p. 1195–1215, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/med.21757>. Acesso em: 1 dez. 2025.
 38. SMYTH, G. K. limma: Linear Models for Microarray Data. In: GENTLEMAN, R.; CAREY, V. J.; HUBER, W.; IRIZARRY, R. A.; DUDOIT, S. (eds.). *Bioinformatics and Computational Biology Solutions Using R and Bioconductor*. New York: Springer, 2005. p. 397–420. Disponível em: https://doi.org/10.1007/0-387-29362-0_23. Acesso em: 15 dez. 2025.
 39. SUBBARAJ, G. K.; KUMAR, Y. S.; KULANTHAIVEL, L. Antiangiogenic role of natural flavonoids and their molecular mechanism: an update. *Egyptian Journal of Internal Medicine*, v. 33, p. 29, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s43162-021-00056-x>. Acesso em: 27 nov. 2025.
 40. THANH, H. D.; *et al.* Temozolomide promotes matrix metalloproteinase 9 expression through p38 MAPK and JNK pathways in glioblastoma cells. *Scientific Reports*, v. 14, p. 14341, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-024-72798-5>. Acesso em: 27 nov. 2025.
 41. TONG, Y. The comparison of limma and DESeq2 in gene analysis. *E3S Web Conference*, v. 271, p. 03058, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202127103058>. Acesso em: 15 dez. 2025.
 42. TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, v. 31, n. 2, p. 455–461, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>. Acesso em: 1 dez.

2025.

43. WEI, Q.; ZHANG, Y.-h. Flavonoids with anti-angiogenesis function in cancer. *Molecules*, v. 29, n. 7, p. 1570, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules29071570>. Acesso em: 27 nov. 2025.
44. WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. 5th ed. Lyon: IARC, 2021. Acesso em: 27 nov. 2025.

**APÊNDICE A – TABELA DE EXPRESSÃO GÊNICA EM GLIOBLASTOMA
CALCULADA POR LOG2FC**

Genes	Normal	Glioblastoma	Log2FC
EIF4EBP1	79,69565217	819,6935065	3,362511644
ANGPT2	93,02608696	758,8376623	3,028084036
TIMP1	1549,782609	10312,1039	2,734200939
OSMR	36,80434783	208,9662338	2,505321728
VEGFA	1695,904348	9441,149351	2,4769077
PGF	48,53478261	257,5233766	2,407612463
GNG12	39,2173913	197,9441558	2,335527996
LAMC1	189,6608696	927,7311688	2,290284757
MYC	237,6347826	1156,842857	2,283374981
LAMB1	212,4956522	953,174026	2,165306316
IL7	22,43913043	94,08311688	2,067919087
LAMB2	279,5869565	1168,977922	2,063878721
ITGB4	166,2869565	684,1753247	2,040691064
GNG4	49,39130435	200,7818182	2,023299658
EGFR	174,4173913	689,3428571	1,982677812
GNB4	196,2956522	764,9155844	1,962272323
TLR2	178,3391304	686,4064935	1,944439913
IBSP	74,87826087	274,5818182	1,874617266
SERPINE1	118,3956522	428,4428571	1,855486698
ITGA5	187,0130435	671,4233766	1,844083871
ITGA4	29,50869565	104,1818182	1,819891463
ITGB1	540,4434783	1790,763636	1,72835928

LAMA4	327,3869565	1077,031169	1,717991252
ITGA7	471,1782609	1507,4	1,677717415
HSPB1	1886,052174	5820,454545	1,625762238
DDIT4	1706,213043	5036,754545	1,561696629
IGF2	713,5434783	2089,036364	1,54976436
EPHA2	105,9826087	307,8779221	1,538530871
BRCA1	151,6	419,312987	1,467757761
CSF1	64,10434783	175,8727273	1,456037665
RAC2	33,24347826	88,67272727	1,41541911
SYK	64,26521739	168,6792208	1,392172246
FN1	97,73043478	251,0012987	1,360815014
PDGFC	826,4086957	2106,090909	1,349640372
NGFR	79,81304348	200,6714286	1,330138778
LPAR2	66,70434783	158,4298701	1,247991659
GNG5	2654,256522	6167,684416	1,216421141
IL4R	173,6782609	394,4155844	1,183299373
AREG	15,72173913	35,69480519	1,182953312
STK11	51,22173913	115,4454545	1,172383228
HIF1A	5104,252174	11322,01688	1,149359468
GNGT2	31,35652174	68,16883117	1,120346711
GNB2	1653,5	3539,162338	1,097884893
HGF	128,0304348	273,2831169	1,093909533
PKN2	122,273913	258,7363636	1,081366189
PDGFRB	430,2826087	907,5805195	1,076741113
KIT	1000,7	430,7233766	-1,216176003
FGFR2	3633,56087	1542,592208	-1,236027346

LPAR1	7378,013043	2743,041558	-1,42745586
GNG13	321,1652174	117,5441558	-1,450112844
MAP2K1	7834,191304	2787,007792	-1,491067322
RELN	1550,03913	496,6753247	-1,641929657
BDNF	539,0130435	146,8636364	-1,875842958
PRKCG	185,4782609	36,25194805	-2,355119677
GNG3	6150,417391	1134,241558	-2,438956398
PRKCB	7496,9	1237,227273	-2,599183618
CHRM1	1560,569565	243,0142857	-2,682959638

Fonte: Autoria própria (2025). Tabela gerada a partir da análise de expressão gênica utilizando o R, contendo os valores de contagem média em amostras normais e de glioblastoma, bem como o Log2FC correspondente. Valores positivos indicam genes com expressão aumentada em glioblastoma em relação ao tecido normal, enquanto valores negativos indicam genes com expressão diminuída.

APÊNDICE 2. PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS IN SILICO DOS COMPOSTOS OBTIDOS POR MEIO DA PLATAFORMA SWISSADME.

PubChem	Molécula	MW	LogP	TPSA	HBD	HBA	GL	BBB
CID 64982	1	446,36	1,11	187,12	6	11	Alta	Não
CID 68071	2	256,25	2,88	66,76	2	4	Alta	Não
CID 72281	3	302,28	2,6	96,22	3	6	Alta	Não
CID 122850	4	288,25	1,31	107,22	4	6	Alta	Não
CID 439246	5	272,25	2,52	86,99	3	5	Alta	Não
CID 5280343	6	302,24	1,54	131,36	5	7	Alta	Não

CID 5280443	7	270,24	3,02	90,9	3	5	Alta	Não
CID 5280445	8	286,24	2,53	111,13	4	6	Alta	Não
CID 5280863	9	286,24	1,9	111,13	4	6	Alta	Não
CID 5280961	10	270,24	2,67	90,9	3	5	Alta	Não
CID 5281605	11	270,24	3,16	90,9	3	5	Alta	Não
CID 5281607	12	254,24	3,52	70,67	2	4	Alta	Sim
CID 5281614	13	286,24	1,97	111,13	4	6	Alta	Não
CID 5281616	14	270,24	2,25	90,9	3	5	Alta	Não
CID 5281654	15	316,26	1,87	120,36	4	7	Alta	Não
CID 5281670	16	270,26	1,24	90,9	3	5	Alta	Não
							Baix	
CID 5281672	17	358,31	3,62	129,28	3	7	a	Não
CID 5281691	18	272,25	2,73	86,99	3	5	Alta	Não
CID 5281703	19	254,24	3,01	70,67	2	4	Alta	Não
CID 5281708	20	254,24	3,47	70,67	2	4	Alta	Sim

Fonte: Autoria própria (2025). MW (g/mol) = peso molecular; LogP = coeficiente de partição octanol/água, indicador de lipofilicidade; TPSA (Å²) = área de superfície polar topológica; HBD = número de doadores de ligações de hidrogênio; HBA = número de aceitadores de ligações de hidrogênio; GI = absorção gastrointestinal prevista; BBB = predição de permeabilidade à barreira hematoencefálica. Todos os parâmetros foram obtidos por meio da plataforma SwissADME para avaliação in silico das propriedades farmacocinéticas dos compostos.

APÊNDICE 3. SCRIPT UTILIZADO PARA ANÁLISE DOS DADOS DE EXPRESSÃO GÊNICA

#####

```
## 1) PACOTES
```

```
#####
```

```
library(GEOquery); library(limma); library(dplyr); library(tidyr)
```

```
library(pheatmap); library(matrixStats); library(readr)
```

```
#####
```

```
## 2) BAIXAR GEO E ORGANIZAR MATRIZ
```

```
#####
```

```
gse <- getGEO("GSE4290", GSEMatrix = TRUE)[[1]]
```

```
expr_mat <- exprs(gse)
```

```
annot <- fData(gse)
```

```
sampleInfo <- pData(gse)
```

```
gene_symbols <- sapply(strsplit(as.character(annot$`Gene Symbol`), " /// "), `[`, 1)
```

```
rownames(expr_mat) <- gene_symbols
```

```
expr_mat <- expr_mat[rownames(expr_mat) != "" & !is.na(rownames(expr_mat)), ]
```

```
#####
```

```
## 3) DEFINIR GRUPOS
```

```
#####
```

```
group_simp <- case_when(
```

```
  grepl("non-tumor", sampleInfo$`Histopathological diagnostic:ch1`,  
  ignore.case=TRUE) ~ "Normal",
```

```
  grepl("glioblastoma", sampleInfo$`Histopathological diagnostic:ch1`,  
  ignore.case=TRUE) ~ "Glioblastoma",
```

```
  TRUE ~ NA
```

```

)
keep <- !is.na(group_simp)
expr_mat <- expr_mat[, keep]
group_simp <- factor(group_simp[keep], levels = c("Normal","Glioblastoma"))
names(group_simp) <- colnames(expr_mat)

#####

## 4) LIMMA

#####

design <- model.matrix(~0 + group_simp)
colnames(design) <- levels(group_simp)
fit <- lmFit(expr_mat, design)
contrast <- makeContrasts(Glioblastoma_vs_Normal = Glioblastoma - Normal, levels
= design)
fit2 <- eBayes(contrasts.fit(fit, contrast))
deg <- topTable(fit2, number = Inf, adjust.method = "fdr", sort.by = "P")

#####

## NOVO FILTRO

#####

deg_sig <- deg %>% filter(adj.P.Val < 0.05 & abs(logFC) > 0.5)
if(nrow(deg_sig) < 5){ deg_sig <- deg %>% filter(adj.P.Val < 0.1 & abs(logFC) > 0.4) }

#####

## 5) Selecionar genes das vias

```

```
#####
read_csv("C:/Users/laris/Downloads/VIAS_E_GENES_CEB.csv")
genes_vias_sig <- genes_presentes

#####

## 6) HEATMAP

#####

expr_sub <- expr_mat[genes_vias_sig, , drop=FALSE]
expr_sub <- expr_sub[rowSds(expr_sub) > 0, , drop=FALSE]
expr_z <- t(scale(t(expr_sub)))
ordem <- order(group_simp)
expr_z_ord <- expr_z[, ordem, drop=FALSE]
annotation_col <- data.frame(Group = group_simp[ordem])
rownames(annotation_col) <- colnames(expr_z_ord)

pheatmap(expr_z_ord, cluster_rows=TRUE, cluster_cols=FALSE,
          annotation_col=annotation_col, show_rownames=TRUE,
          show_colnames=FALSE, color=colorRampPalette(c("blue","white","red"))(100),
          main="Heatmap — Genes das Vias Regulados (Filtro suave)")

maxAbs <- max(abs(expr_z_ord), na.rm=TRUE)
breaks_sym <- seq(-maxAbs, maxAbs, length.out=101)
cap_value <- 3
expr_z_clipped <- expr_z_ord
expr_z_clipped[expr_z_clipped > cap_value] <- cap_value
```

```

expr_z_clipped[expr_z_clipped < -cap_value] <- -cap_value
breaks_cap <- seq(-cap_value, cap_value, length.out=101)
pal <- colorRampPalette(c("blue","white","red"))(100)

pheatmap(expr_z_clipped, cluster_rows=TRUE, cluster_cols=FALSE,
          annotation_col=annotation_col, show_rownames=TRUE,
          show_colnames=FALSE, color=pal, breaks=breaks_cap,
          main="Heatmap — Todas as Vias (Z-score, recortado em ±3)")

#####

## Ler arquivo e listas de vias

#####

tabela <- read.csv("C:/Users/laris/Downloads/VIAS_E_GENES_CEB.csv",
                  header=TRUE, sep=";", fill=TRUE, check.names=FALSE)

genes_mapk <- unique(na.omit(tabela$MAPK))
genes_hif <- unique(na.omit(tabela$HIF))
genes_pi3k <- unique(na.omit(tabela$`PI3K-AKT`))
genes_vegf <- unique(na.omit(tabela$VEGF))

vias <- list(MAPK=genes_mapk, HIF=genes_hif, PI3K_AKT=genes_pi3k,
            VEGF=genes_vegf)

length(genes_mapk); length(genes_hif); length(genes_pi3k); length(genes_vegf)

#####

## Selecionar genes presentes e heatmap final

#####

```

```

genes_vias <- unique(unlist(vias))
genes_presentes <- intersect(genes_vias, rownames(expr_mat))
expr_sub <- expr_mat[genes_presentes, ]
ordem_cols <- order(group_simp)
expr_sub <- expr_sub[, ordem_cols]
annotation_col <- data.frame(Grupo = group_simp[ordem_cols])
rownames(annotation_col) <- colnames(expr_sub)
ann_colors <- list(Grupo=c(Normal="salmon", Glioblastoma="cyan"))

via_por_gene <- sapply(genes_presentes, function(g){
  names(Filter(function(v) g %in% v, vias))[1]
})
annotation_row <- data.frame(Via=factor(via_por_gene,
levels=c("VEGF","HIF","MAPK","PI3K_AKT")))
rownames(annotation_row) <- names(via_por_gene)

ann_colors$Via <- c(MAPK="#E64B35FF", HIF="#4DBBD5FF",
  PI3K_AKT="#00A087FF", VEGF="#3C5488FF")
breaks = seq(-3, 3, length.out=200)
color = colorRampPalette(c("blue","white","red"))(199)
expr_sub <- expr_sub[order(annotation_row$Via), ]

p <- pheatmap(expr_sub, color=color, breaks=breaks, cluster_rows=FALSE,
  cluster_cols=FALSE, show_rownames=TRUE, show_colnames=FALSE,
  annotation_row=annotation_row, annotation_col=annotation_col,

```

```

annotation_colors=ann_colors, fontsize_row=4, fontsize_col=6,
cellwidth=2, cellheight=2, scale="row")

```

```
#####
```

```
## GRAFICO DE BARRAS
```

```
#####
```

```
library(ggplot2); library(dplyr)
```

```
df <- read.csv("C:/Users/laris/Downloads/GLIO - Página3.csv", sep="," ,
stringsAsFactors=FALSE)
```

```
df$Mean_Normal <- as.numeric(gsub(",", ".", df$Mean_Normal))
```

```
df$Mean_Glioblastoma <- as.numeric(gsub(",", ".", df$Mean_Glioblastoma))
```

```
df$Log2FC <- as.numeric(gsub(",", ".", df$Log2FC))
```

```
df$Grupo <- ifelse(df$Log2FC > 0, "Tumor > Normal", "Normal > Tumor")
```

```
top10_up <- df %>% arrange(desc(Log2FC)) %>% slice(1:10)
```

```
top10_down <- df %>% arrange(Log2FC) %>% slice(1:10)
```

```
df_top20 <- rbind(top10_up, top10_down) %>% arrange(Log2FC)
```

```
df_top20$Gene <- factor(df_top20$HIF1A, levels=df_top20$HIF1A)
```

```
ggplot(df_top20, aes(x=Log2FC, y=Gene, fill=Grupo)) +
```

```
  geom_bar(stat="identity") +
```

```
  scale_fill_manual(values=c("Tumor > Normal"="steelblue", "Normal >
Tumor"="salmon")) +
```

```
  theme_minimal(base_size=14) +
```

```
  labs(title="", x="Log2FC", y="") +
```

```
  theme(axis.text.y=element_text(size=9),
```

```
plot.title=element_text(size=16, face="bold"),  
legend.title=element_blank())
```