

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS - UNIFAL-MG.
PRÓ-REITORA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO;
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA.**

YANA CRISTINA ALBANEZ SANTOS

**DESENVOLVIMENTO DE POTENCIAIS FÁRMACOS *IN SILICO* PARA OS
PRINCIPAIS CARCINOMAS EXISTENTES NO BRASIL.**

ALFENAS – MG

2024

YANA CRISTINA ALBANEZ SANTOS

**DESENVOLVIMENTO DE POTENCIAIS FÁRMACOS *IN SILICO* PARA OS
PRINCIPAIS CARCINOMAS EXISTENTES NO BRASIL.**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia pelo Programa de Pós-Graduação stricto sensu em Biotecnologia da Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Biotecnologia.

Orientador: Prof Dr. Nelson José Freitas da Silveira.
Coorientadora: Prof^a Dr^a. Camila Mariângela Pacheco.

ALFENAS – MG

2024

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

Santos, Yana Cristina Albanez .

Desenvolvimento de potenciais fármacos *in silico* para os principais carcinomas existentes no Brasil. / Yana Cristina Albanez Santos. - Alfenas, MG, 2024.

53 f. : il. -

Orientador(a): Nelson José Freita Da Silveira.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2024.

Bibliografia.

1. Câncer. 2. Bioinformática. 3. Farmacocinética. I. Da Silveira, Nelson José Freita, orient. II. Título.

Ficha gerada automaticamente com dados fornecidos pelo autor.

YANA CRISTINA ALBANEZ SANTOS

DESENVOLVIMENTO DE POTENCIAIS FÁRMACOS IN SILICO PARA OS PRINCIPAIS CARCINOMAS EXISTENTES NO BRASIL.

O Presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação da Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestra em Biotecnologia pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Biotecnologia

Aprovada em: 19 de julho de 2024.

Prof. Dr. Nelson José Freitas da Silveira
Presidente da Banca Examinadora
Instituição: Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL)

Prof. Dr. Walter Filgueira de Azevedo Junior
Instituição: Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL)

Profa. Dra. Patrícia Rufino Oliveira
Instituição: Universidade de São Paulo / USP



Documento assinado eletronicamente por **Nelson José Freitas da Silveira, Professor do Magistério Superior**, em 01/08/2024, às 17:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1292129** e o código CRC **BDF19316**.

A minha mãe, sinônimo de amor, dedicação e força; a ti, tudo dedico. Obrigada por ser meu ponto de paz e inspiração. Te amarei nessa e em todas as outras vidas.

AGRADECIMENTOS

À Deus em primeiro lugar, por seu amor, sua bondade por sempre guiar-me, permitindo, assim, com que concluísse mais uma etapa da minha vida. Ao meu anjo da guarda e todos aqueles presentes que me guiaram/guiam sempre para o bem.

À minha família, minha mãe, que sempre acreditou que eu sou capaz de realizar tudo, foi minha fortaleza, meu porto seguro, minha amiga, companheira e minha maior inspiração. Aos meus irmãos, Thainan, Thuane, Yanca e Hemanuelle, pois tudo que faço é por vocês. Aos meus sobrinhos que das minhas conquistas se veem conquistando tudo que almejam, pois conseguiram! E estarei aqui para tudo que precisarem.

Ao meu orientador Prof. Dr. Nelson José Freitas da Silveira, pela confiança e aprendizado no decorrer do desenvolvimento deste trabalho científico.

À minha coordenadora Prof^a Dr^a. Camila Mariângela Pacheco, por quem tenho um enorme afeto, que sempre me auxiliou, confiou e me proporcionou muitos aprendizados desde a graduação.

Ao meu colega Leonardo Pereira de Araújo que sempre esteve presente compartilhando comigo toda sua sabedoria, com explicações sobre as linhas de comando dos sistemas operacionais Linux e Windows; softwares AutoDock Tools, AutoDock Vina, Pymol e LigPlot+. Além de ser um ótimo colega que ouvia todas minhas reclamações.

Ao João Ricardo Bueno De Moraes Borba que me ajudou com conselhos para nunca desistir e que tudo daria certo.

Ao meu padraсто Ocimar Lino que me apoia e acredita no meu intelecto, fazendo-me mais capaz; ao Mateus Lebron Gonzaga que foi meu suporte, psicólogo e sempre me encorajou a continuar. E a todos meus familiares e amigos que sempre acreditaram em mim.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

E agradeço a FAPEMIG pelo financiamento.

RESUMO

O câncer é uma das doenças que mais atinge a população mundial e com estimativas que o número de indivíduos com essa patologia cresça $\approx 50\%$ em 2040 em relação a 2020. Portanto, o objetivo deste trabalho foi estabelecer e preparar bibliotecas de compostos sintéticos e naturais, a serem utilizados como potenciais fármacos, de forma *in silico*, através da afinidade dos compostos com a proteína alvo, farmacologia e farmacocinética. O método utilizou-se a molécula com o código PDB 7BIR, compostos naturais e sintéticos; realizou-se a ancoragem molecular, juntamente com o composto controle ancorado na molécula estabelecida; obteve-se informações 3D entre os compostos no sítio ativo da proteína, verificou-se as ligações químicas, estabeleceu-se a farmacocinética, farmacodinâmica e a regra de Lipinski. A partir das análises dos parâmetros e comparações com o composto controle, todos foram satisfatórios no bloqueio com da p53 e a MDM2, entretanto, os sintéticos sobressaíram na maioria das análises.

Palavras-chave: câncer; bioinformática; farmacocinética.

ABSTRACT

Cancer is one of the diseases that most affects the world population and with estimates that the number of individuals with this pathology will grow $\approx 50\%$ in 2040 compared to 2020. Therefore, the objective of this work was to establish and libraries of preparations of synthetic and natural compounds, to be used as potential drugs, in an in silico manner, through the surface layer of the compounds with the target protein, pharmacology and pharmacokinetics. The method used the molecule with the PDB code 7BIR, natural and synthetic compounds; molecular anchoring was performed, together with the control compound anchored in the established molecule; we obtained 3D information between the compounds in the active site of the protein, chemical bonds are provided, pharmacokinetics, pharmacodynamics and Lipinski's rule are distributed. From the analysis of interruptions and comparisons with the control compound, all were dominant in blocking p53 and MDM2, however, the synthetics stood out in most of the analyzes.

Keywords: cancer; bioinformatics; pharmacokinetics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Descrição da interação entre p53 e MDM2	19
Figura 2- Ilustra a ferramenta MGLTools descreve como o AutoDock Vina utiliza a grid boxes para identificação do sítio ativo da proteína alvo, sem o composto controle presente na estrutura. Proteína com o código PDB 7BIR, baixada da plataforma Protein Data Bank (PDB).....	24
Figura 3- Imagem da estrutura do código PDB, 7BIR e suas informações de acordo com os parâmetros necessários para ser utilizada nesse estudo. Entretanto, mesmo que a mesma seja um pouco maior de 2 Å, possui-se nela um composto co-cristalizado em seu sítio ativo, ressaltando que o mesmo será necessário como controle, sendo o parâmetro mais relevante para se obter melhores resultados dos compostos propostos.....	27
Figura 4- Configuração das estruturas 3D dos compostos com molécula do código PDB, 7BIR, para comprovar a veracidade da interação nas regiões especificadas pela grid box, sendo esse, o local estabelecido como sítio ativo, através do controle, pelo programa PyMol.....	30
Figura 5- Visualização das interações intermoleculares entre a proteína código PDB, 7BIR e os ligantes sintéticos. São necessárias que todos os compostos interagem-se com determinados componentes químicos, isso estabelecerá a interação com a MDM2, assim como o controle.....	32
Figura 6- Visualização das interações intermoleculares entre a proteína código PDB 7BIR e os ligantes naturais. São necessárias que todos os compostos interagem-se com determinados componentes químicos, isso estabelecerá a interação com a	

MDM2, assim como o controle.....	33
Figura 7- Representação do Boiled egg do primeiro composto sintético utilizado, ele demonstra a provável absorção que o medicamento terá, neste caso, será via gastrointestinal, devido que, na imagem o composto está presente na parte branca.....	36
Figura 8- Bioisosterismo nas regiões selecionadas de acordo com a tabela 1, dos compostos sintéticos e seus respectivos smiles obtidos pelo programa Xundrug, resultando em novos potenciais fármacos.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAOs:	Agentes antineoplásicos orais;
ADMET:	Absorção, distribuição, metabolização, excreção, toxicidade;
AG:	Absorção gastrointestinal;
Å:	Angstrom;
BHC:	Barreira hematoencefálica;
CL:	Depuração de um medicamento (Clearance);
GLN59:	Glutamina 59;
GLY58:	Glicina 58;
H:	Hidrogênio
HIS96:	Histidina 96;
IC –	Inibidor de enzimas do citocromo;
LEU26:	Leucina 26;
MDM2:	Murino duplo minuto 2 (proteína);
MDM4:	Murino duplo minuto 4 (proteína);
NAT:	Naturais;
PHE19:	Fenilalanina 19;
PDB:	Protein Data Bank;
SINT:	Sintéticos;
TLR:	Receptores Toll-like;
TRP23:	Triptofano 23;
TYR67:	Tirosina 67;
T1/2:	Meia-vida de um medicamento;
VD:	Volume de distribuição;
VAL93:	Valina 93.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1	Câncer.....	16
2.2	Proteína P53.....	16
2.3	Proteína MDM2.....	18
2.4	Docking e AutoDock Vina.....	20
2.5	Bioisosterismo.....	21
3	METODOLOGIA.....	23
3.1	Busca por marcador e ligantes.....	23
3.2	Processo de docking molecular e interações no sítio ativo.....	24
3.3	Farmacologia e farmacocinética.....	25
4	RESULTADO E DISCUSSÃO.....	26
4.1	Obtenção do alvo e dos ligantes.....	26
4.2	Redocking e docking.....	28
4.3	Interações no sítio ativo da molécula do código PDB 7BIR.....	29
4.4	Resposta imunológica.....	35
4.5	Farmacocinética e farmacodinâmica.....	36
5	CONCLUSÃO.....	42
	REFERÊNCIAS.....	43

1 INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde (2021) distingue que o câncer/neoplasia/tumor se caracterizam como nomes para definir várias doenças que afetam as células do corpo. É caracterizado por células anormais, que possuem mutações, as quais promovem o desenvolvimento descontrolado e podem invadir qualquer região do corpo (metástase). Devido à falta de sintomas no seu estágio inicial, o diagnóstico para doença ainda é um obstáculo e pode demandar um longo período (INCA, 2021).

Nas últimas duas décadas o número de pessoas diagnosticadas com a doença no mundo aumentou, passando de 6,2 milhões de mortes em 2000 para 10 milhões em 2020. Mundialmente, em 2018, o câncer foi considerado a segunda principal doença a causar morte, ao atingir 9,6 milhões de óbitos (OPAS, 2020). Aliado a isso, o diagnóstico dessa doença em crianças também tem sido ampliado, passando a atingir cerca 400 mil por ano (OMS, 2021).

No Brasil, devido ao número crescente de pessoas e ao envelhecimento, estima-se que entre os anos de 2020 e 2040, haverá aumento no número de novos casos, aumentando 66% o número de novos casos e 81% das causas de mortes (INCA, 2022; OMS, 2021; Ferlay *et al.*, 2021). Tais números preocupam os gestores, pois em 2018, os gastos realizados pelo governo federal, foram de aproximadamente, R\$3,5 bilhões em pacientes oncológicos com idade ≥ 30 anos, em procedimentos hospitalares e ambulatoriais no Sistema Único de Saúde (SUS). Caso não haja métodos para realização de possíveis contribuições adversas do câncer, os casos se manterão crescentes, além das mortes e prevalência da doença, o governo federal gastará cerca de R\$7,84 bilhões em 2040 para o tratamento em pacientes com câncer (INCA, 2022).

No ano de 2023, no Brasil, foram registrados mais de 700 mil novos casos, sendo os mais frequentes o câncer de mama, cólon, reto, pulmão, próstata, colo do útero, cavidade oral e estômago. Os números registrados assemelham-se aos dos países com Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) alto, porém, ainda há desigualdade regional, constando que as regiões com IDH baixo (Norte e Nordeste), têm taxa maior de casos de neoplasias (INCA, 2023; Santos *et al.*, 2023).

Diante desses valores, novas tecnologias vêm sendo avaliadas e estudadas para o desenvolvimento de métodos eficazes nos tratamentos do câncer. Assim, a revolução tecnológica levou a ampliação na criação de recursos computacionais para diversas áreas, transformando-se na principal ferramenta para melhorias sociais, individuais e coletivas. Conseqüentemente, a bioinformática foi criada para superar obstáculos, desenvolvendo métodos capazes de promover esclarecimentos, informações e análises de dados biológicos (Lesk, 2008). Portanto, a bioinformática como artifício de tecnologia da biologia, representa uma ferramenta para alavancar projetos de pesquisas. Assim, ela tem sido apontada como um dos mais importantes instrumentos de descobertas e avanços na saúde, impulsionando o desenvolvimento a favor da humanidade, adquirindo conhecimento sobre os sistemas biológicos e gerando novas alternativas para solucionar os problemas do cotidiano (Guido; Oliva; Andricopulo, 2008; Martins *et al.*, 2015).

A bioinformática é uma área atrativa devido aos seus recursos. Ela emprega a computação, fazendo com que haja diminuição de tempo e de custos de insumos, aumento de desempenho das ferramentas e auxilia nas interações entre estruturas, o que proporciona averiguação das funções biológicas e sua execução (Guido; Oliva; Andricopulo, 2008). Programação através do código aberto, como AutoDock Vina, desenvolvem potenciais medicamentos anticancerígenos, *in silico*, ajudando pesquisadores no desempenho e avanços contra os carcinomas (Trott; Olson, 2010; Chen; Seukep; Guo, 2020). Ferramentas e programas de docking moleculares são úteis para investigar as interações entre os ligantes e receptores biológicos, a partir dos resultados de docking molecular, pode-se levantar hipóteses sobre as interações intermoleculares envolvendo um ligante e sua possível macromolécula receptora, proteínas alvo (Lesk, 2008; Martins *et al.*, 2015).

Aliado a isso, devido ao aumento expressivo de pessoas diagnosticadas com câncer, a limitação para tratamentos, a ocorrência da doença no mundo, assim como em todo território brasileiro, é de extrema necessidade estudar essa doença com variados métodos e ferramentas, obtendo cada vez mais resultados satisfatórios para o tratamento da doença. Nesse sentido, a bioinformática foi utilizada neste trabalho como forma de propor diferentes ferramentas e mecanismos para proporcionar uma pesquisa satisfatória no desenvolvimento de potenciais fármacos. Portanto, o objetivo

deste trabalho ocorreu através de análise computacional, *in silico*, a partir de bibliotecas de compostos sintéticos e naturais como potenciais antineoplásicos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Câncer

O câncer é o termo utilizado para caracterizar um conjunto de doenças que exibem propriedades evolutivas, no qual compartilha uma única patogênese, que promove a disseminação autônoma e a propagação de réplicas. Além disso, altera vias de sinalização celular, impossibilita a resposta imunológica, conseqüentemente favorece sua proliferação (Stratton; Campbell; Futreal, 2009; INCA, 2019).

Câncer, tumores malignos e neoplasias são termos usados para a segunda doença responsável por óbitos no Mundo e no Brasil (OPAS, 2020). É dado como uma doença genética, que provoca mutações/alterações nos genes, modificando o comportamento celular. Algumas dessas células são geradas rapidamente, crescem geralmente suas causas acontecem respeitando algumas irregularidades, como mutações por infecções, vírus, agentes químicos, físicos e biológicos. Essas alterações causam defeitos em uma ou mais proteínas reguladoras do ciclo celular (Iranzo *et al.*, 2018; INCA, 2020), as quais provocam a aceleração da multiplicação celular.

De acordo com a Organização Pan Americana de Saúde (2020), a metástase é a causa principal das conseqüentes mortes por câncer. Seu desenvolvimento ocorre quando as células cancerígenas se deslocam através da corrente sanguínea, dirigindo-se a locais secundários, evitando atuação das células do sistema imune, logo, a morte, fazendo com que se desenvolvam como células mutagênicas (Massagué; Obenauf, 2016).

Para que não ocorra células mutagênicas, algumas proteínas exercem o papel de responder a esse estresse, ocorrendo a apoptose, morte celular programada, uma das várias maneiras de eliminação das células cancerosas (Croce, 2008). A p53 está entre as proteínas mais importantes na indução da morte celular, supervisão do ciclo celular e supressão de células cancerígenas (Zhao *et al.*, 2012).

2.2 Proteína P53

A proteína p53 é uma fosfoproteína nuclear cuja estrutura molecular tem formato tetraédrico, com subunidades simples e idênticas, a qual foi descrita em 1979 no vírus símio SV-40 interligado com antígeno T (Yonish-Rouach, 1997; Mowat, 1998).

Em 1989, o gene p53 foi dado como um gene supressor tumoral, que está relacionado na mutação ou inativação do surgimento do câncer (Yonish-Rouach, 1997; Mowat, 1998; Janus *et al.*, 1999). A p53 está associada na restauração do DNA, monitoramento do ciclo celular, na indução apoptótica e diferenciação celular, impedindo que haja alguma intercorrência no DNA, além de impedir a proliferação de células danosas (Vogelstein; Lane; Levine, 2000).

P53 é um regulador crucial ao longo da progressão da fase G1-S do ciclo celular. Uma vez ativada, a proteína p53 leva ao aumento da expressão da proteína p21, inibidor de quinase dependente de ciclina. Como resultado, frequentemente as células experimentam um bloqueio nesta fase para que o reparo do DNA possa ser efetivamente realizado. Quando a quantidade de danos no DNA ultrapassa a capacidade de restauração, as células essenciais de reparo são afetadas, podendo levar a incorporações de mutações, gerando instabilidade no gene, capaz de originar células cancerígenas (Costa *et al.*, 2003)

O gene supressor de tumor p53 desempenha um papel importante na progressão de tumores, atuando como um fator na transcrição de genes que respondem a uma variedade de insultos celulares por regular o ciclo celular ou bloquear o crescimento celular anormal e a transformação maligna. Conseqüentemente, essas células, que são geneticamente instáveis, tendem a acumular mutações e rearranjos cromossômicos adicionais, levando a um rápido desenvolvimento de células alteradas, contribuindo, assim, para a transformação neoplásica (Elledge, 1996; El-Deiry, 1998).

Cerca da metade dos cânceres apresentam altos níveis de p53 com mutação. Isso promove falhas na associação entre p53 e o DNA, e conseqüentemente prejuízos na ativação de fatores de transcrição envolvidos na atividade apoptótica, e em alguns casos adquirem atividade oncogênica (Wu *et al.*, 1993; Freed-Pastor; Prives, 2012).

Foi demonstrado em estudos que a p53 mutada está presente em variados cânceres, oferecendo uma promessa considerável de marcador tumoral, incluindo câncer de mama (Børresen-Dale, 2003), câncer colorretal (Wu *et al.*, 2017), pulmão (Vogt *et al.*, 2002), próstata (Shenk *et al.*, 2001; Downing; Jackson; Russell, 2001), colo do útero (Lu; Feki, 2006), cavidade oral (Zohrabian *et al.*, 2007) câncer de tireoide (Konde; Ezzat; Asa, 2006) e estômago (Felin *et al.*, 2008).

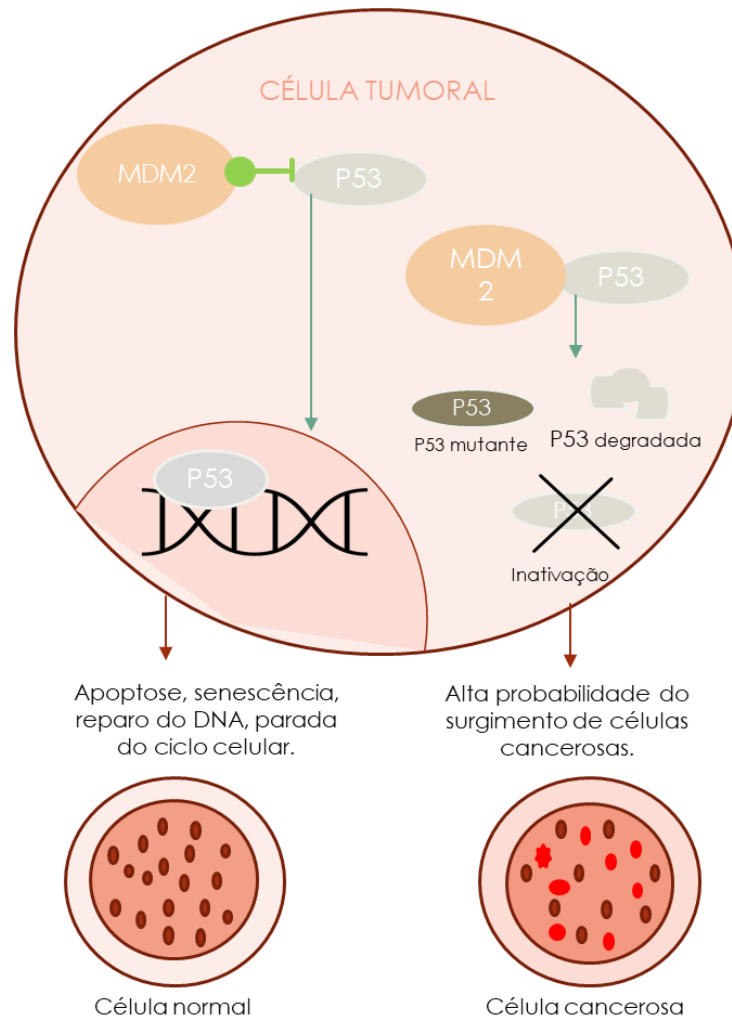
As seleções e mutações podem criar diversidades dentro de um organismo (Belyi; Levine. 2009). A proteína p53 condiciona sua detecção, eliminação ou silenciamento do DNA repetitivo, respondendo a estressores e doenças infecciosas. Sendo que, a p53 do tipo selvagem, tem como função a resistência inata (Belyi; Levine, 2009; Levine, 2020). Em condições normais, o nível de proteína p53 é mantido baixo pelo seu principal regulador negativo, homólogo Murino Duplo Minuto 2 (MDM2), que promove a ubiquitinação do p53 e sua subsequente degradação (Honda; Tanaka; Yasuda, 1997).

2.3 Proteína MDM2

A proteína Murino Duplo Minuto 2 (MDM2) possui funções de interagir com algumas proteínas que influenciam o ciclo celular, diferenciação, morte celular programada, estabilidade do genoma, apoptose e a transcrição (Bohlman; Manfredi, 2014). A capacidade do MDM2 de se ligar diretamente à proteína p53, e sua função inibitória, promove a manifestação de mutações na p53 e vulnerabilidade genômica resultando maior expressão da MDM2 e na resistência adquirida contra seus inibidores (Haronikova *et al.*, 2021).

A indução de MDM2 e Mouse Double Minute 4 (MDM4) em células cancerígenas com p53 é uma estratégia terapêutica intrigante que tem sido usada com sucesso em ambientes clínicos. Desde a descoberta de análogos que inibem a interação p53-MDM2, os inibidores de MDM2 têm sido extensamente pesquisados como uma opção terapêutica potencial para os pacientes com câncer (Vassilev *et al.*, 2004). A figura 1 demonstra como a interação entre p53 e MDM2 como ocorre, quando o regulador negativo exerce sua função.

Figura 1- Descrição da interação entre p53 e MDM2.



Fonte: Do autor.

Legenda: Na ausência de comunicação entre as proteínas p53 e a MDM2 proporciona a reparação do genoma, assim como na apoptose de células anormais pela p53. Entretanto, quando há interação das mesmas ocorre a inatividade, degradação e/ou mutação da p53, a função dela fica comprometida, promovendo a proliferação de células anormais e danos no DNA, possível câncer.

O regulador negativo MDM2 exercer função que resulta em mutação, degradação ou inativa da proteína p53, fazendo que ocorra dano no DNA, resultando em possíveis carcinomas (Haronikova *et al.*, 2021; Zhu *et al.*, 2022). Novas descobertas sugerem que a superexpressão de MDM2 sucede em resistência à quimioterapia convencional (Hou; Sun; Zhang, 2019).

O aumento dos níveis de p53 selvagem reativando suas funções, e a inibição da interação entre MDM2 e p53 são alvos de intensos estudos na medicina do câncer (Zhu *et al.*, 2022; Koo; Sharma; Narayan, 2022). O método consiste em atenuar

células tumorais, fazendo com que não ocorra interações químicas entre p53 e MDM2 e conseqüentemente o aumento da fosforilação da p53. Sendo assim, o bloqueio dessa interação pode vir a promover a apoptose, melhor desempenho da p53 como supressor tumoral e do ciclo celular (Koo; Sharma; Narayan, 2022).

Os medicamentos direcionados à inibição da interação MDM2 e p53 mostraram bons resultados, revelando que uma vez que a apoptose foi induzida, teve uma diminuição na supressão imune e na tumorigenicidade das células cancerosas (Klein; Vassilev, 2004; Guo *et al.*, 2017; Koo; Sharma; Narayan, 2022). Foi identificado inibidores altamente potentes, seletivos e oralmente eficientes na interação entre as proteínas p53-MDM2. O código PDB, 7BIR, foi a proteína utilizada, respectivo sua função, demonstrando efeitos farmacêuticos *in vivo* e atividades anticancerígenas eficazes em doses bem toleradas. Para maximizar a afinidade do ligante para MDM2 e a biodisponibilidade, o design da estrutura baseou-se no ligante e na determinação do metabólito (Chessari *et al.*, 2021). Assim, o código PDB 7BIR, uma macromolécula, proteína, foi creditada como um forte candidato para auxiliar os compostos no desenvolvimento de possíveis fármacos *in silico*.

2.4 Docking e AutoDock Vina

Em 1894 foi o início da ancoragem molecular, o termo “chave-fechadura” foi um modelo proposto por Emil Fischer para poder explicar como acontecia o modelo teórico da interação ligante-receptor. Ambos poderiam reconhecer-se um ao outro através de alinhamentos geométricos, assemelhando-se a uma chave que se encaixa “perfeitamente” em uma fechadura, onde suas conformações não sofreram quaisquer alterações devido a eles serem rígidos. Porém, em 1958, Koshland propôs a teoria do encaixe induzido, refutando essa teoria de encaixes perfeitos e de uma chave para uma fechadura, reconhecendo que ambas as estruturas são flexíveis e que quando reconhecido a enzima, a conformação espacial do sítio ativo é modificada. Após a teoria de Koshland (1958), vários estudos foram feitos e diferentes métodos foram propostos (Grosdidier; Zoete; Michielin, 2011; Chen; Seukep; Guo, 2020).

Décadas se passaram, várias metodologias de docking molecular foram propostas (Bitencourt; De Azevedo, 2019). O docking molecular ou ancoragem molecular, é uma das técnicas mais utilizadas no mundo da pesquisa para realizar triagem de bibliotecas virtuais de compostos e no desenvolvimento medicamentoso.

Esta técnica prediz a maneira como o fármaco se liga a uma molécula alvo (receptor-ligante). Ela interpreta as interações moleculares, quanto afinidade, complementaridade e identifica a localização do sítio ativo de um receptor ou de uma proteína (Bitencourt; De Azevedo, 2019; Da Silveira *et al.*, 2019).

O docking é um processo computacional de busca pelo melhor encaixe do ligante que contribui para que as pequenas moléculas ou substratos se liguem ao sítio de ligação/receptor de uma proteína. Essa associação proporciona o desenvolvimento de um algoritmo eficaz (Dias; De Azevedo, 2008).

O objetivo do docking é indicar de forma eficiente a afinidade de ligação e as conformações ligadas. Tem função de replicar possíveis potenciais químicos por meio do uso de score, representação de uma aproximação computacional que prediz quais afinidades que interação proteína-ligante pode conter, como parâmetros hidrofóbicos, eletrostáticos, de van der Waals e de ligações de hidrogênio (H) (Barreiro; Rodrigues, 1997; Chen; Seukep; Guo, 2020).

Com o domínio do docking, a busca pela melhor conformação são as que possuem menor valor de energia, ou energia afinidade de Gibbs aproximada (quanto menor, melhor), funções matemáticas são empregadas para calcular esta energia com a maior precisão possível. Ferramentas de ancoragem moleculares são notáveis, devido à função de scoring/análise sensível absoluto para ranquear as conformações geradas pelo algoritmo preferencial, a fim de que o método *in silico* se familiarize ao máximo da conformação *in vivo* (Alonso; Bliznyuk; Gready, 2006; Chen; Seukep; Guo, 2020).

O AutoDock Vina foi criado pelo pesquisador Dr. Oleg Trott, em 2010; um programa de código aberto na produção de docking molecular, uma ferramenta semiflexível, de fácil utilização, que realiza docking molecular e triagem virtual. Exercendo uma nova função de scoring nas possibilidades de conformações mais provável quanto a instalação de um algoritmo de otimização energética baseado nesta nova função de scoring computando a afinidade entre um receptor-ligante (Trott; Olson, 2010; Chen; Seukep; Guo, 2020).

2.5 Bioisosterismo:

Em 1919 foi iniciado o primeiro conceito de isosterismo, pelo americano Dr. Irving Langmuir, através de busca de compreender sobre camada de valência dos

elétrons, demonstrando que átomos que são isoeletrônicos, exibem propriedades físico-químicas semelhantes. Em 1951 o cientista Harris Friedman agregou o prefixo “bio”, pois os compostos isósteros também poderiam ter atividade biológicas semelhantes (Jayashree *et al.*, 2022).

O bioisosterismo é uma técnica que visa substituir subestruturas moleculares que causam alguma consequência adversa, por grupos químicos semelhantes, gerando listas de análogos (Lima; Barreiro, 2005). Utilizada no design racional de novos medicamentos para otimização obtendo uma série de compostos inovadores candidatos a novos fármacos (Shan; Ji, 2020). Existem várias razões na aplicação da estratégia de bioisosterismo, destacando, estratégias necessárias de melhorias na atividade farmacológica, otimizar parâmetros farmacocinéticos, diminuição dos efeitos adversos e seletividade de receptores (Lima; Barreiro, 2005; Shan; Ji, 2020).

O XunDrug é uma plataforma que tem o servidor MolOpt (Shan; Ji, 2020), que é um software bioisostérico que gera automaticamente análogos a estrutura escolhida ou sugestiva. Atualmente os compostos bioisostéricos são avaliados conforme sua necessidade, com intuito de melhorias na molécula, bem como as propriedades de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET); utilizando uma ampla busca por novos fármacos. Tais melhorias a partir de um novo composto desenvolvido, tem se destacado pela eficiência no processo de descoberta de novos fármacos, destacando-se como um método promissor, atraindo a atenção de muitos pesquisadores e indústrias (Da Silveira *et al.*, 2022).

3 METODOLOGIA

3.1 Busca por marcador e ligantes

Inicialmente foi realizada uma busca nas plataformas Google acadêmico, Pubmed, Scielo, dentre outras; para determinar quais marcadores estavam presentes nos principais cânceres acometidos no Brasil. Foram pesquisados todos os marcadores presentes nas neoplasias a serem dispostos. Através dessa busca, obteve-se um marcador molecular que está presente em 50% dos cânceres existentes, como também em todos a serem utilizados.

O método do estudo consistiu em usufruir do marcador a proteína p53 para desempenhar suas funções específicas, fazendo com que não houvesse interação em seu regulador negativo MDM2. Contudo, a estrutura tridimensional teria como função ser antagonista da MDM2, fazendo com que os compostos utilizados, interagissem com a p53, conseqüentemente a função de regulação do DNA e do ciclo celular seriam desempenhadas assim como a promoção da interrupção da interação MDM2-P53.

No banco de dados Protein Data Bank (PDB) (Berman *et al.*, 2000) coordenadas tridimensionais da respectiva proteína foram buscadas, para distinguir qual a código PDB seria utilizado, foram adicionados alguns parâmetros. A proteína tem que ser proveniente de *Homo sapiens*, ter resolução cristalográfica menor que 2 Angstrom (Å), ter se mostrado eficiente e conter em sua estrutura um ligante para utilização em testes de validação.

Após a sondagem, a estrutura tridimensional foi baixada no formato PDB, para o servidor local e preparada pela ferramenta MGLTools (Dallakyan, 2010), para ser utilizada. Houve a remoção de moléculas de água, busca por átomos que poderiam estar ausentes, adição de átomos de hidrogênio e das cargas de Kollman. Para o composto co-cristalizado presente no sítio ativo foi separado em um arquivo como controle, para o processo de redocking e, por fim, as estruturas foram transformadas de PDB para o formato PDBQT.

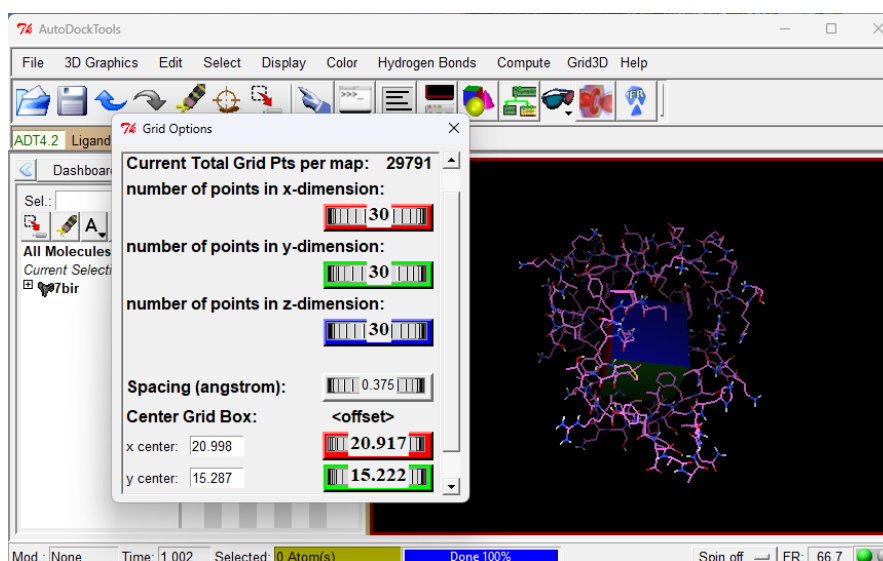
Os ligantes oriundos de produtos naturais foram obtidos do servidor ZINC20 (Irwin *et al.*, 2020) database, no qual a biblioteca TCM (Taiwan) foi escolhida contendo 36.043 compostos. Já para os ligantes sintéticos, a biblioteca "Conjunto de diversidade de descoberta (DDS-50)" da plataforma ENAMINE (ENAMINE, 2023), contendo 50.240 compostos, foram selecionados e baixados no formato SDF. Os

compostos também foram transferidos para um servidor local, e modificados mediante para o formato PDBQT pelo uso do software OpenBabel (O'Boyle *et al.*, 2011). No processo selecionou-se o "--gen3d" (O'Boyle *et al.*, 2011), para que as coordenadas tridimensionais fossem corrigidas.

3.2 Processo de docking molecular e interações no sítio ativo

Após o preparo de todos os arquivos, receptores e ligantes, foi realizado a ancoragem molecular, obtido pelo MGLTools (Dallakyan, 2010) na plataforma AutoDock Vina (Trott; Olson, 2010). Para assegurar que os ligantes propostos interagiriam com o sítio ativo da proteína, os cálculos de docking molecular foram determinados pelos espaços de buscas, chamados de "grid boxes". O AutoDock Vina busca por algoritmos para determinação das conformações que se complementam favoravelmente com a proteína-alvo. O espaço delimitado fora predito em valores das localizações e nos tamanhos das coordenadas cartesianas de x, y e z. Entretanto, para a molécula utilizada, os valores de localização e tamanhos para a delimitação do sítio ativo foi através do ligante co-cristalizado para controle (sítio marcado). A figura 2 demonstra como a grid boxes é operada, através de coordenadas empregadas por literatura ou por um composto já ancorado na proteína a ser manuseada.

Figura 2- Ilustra a ferramenta MGLTools descreve como o AutoDock Vina utiliza a grid boxes para identificação do sítio ativo da proteína alvo, sem o composto controle presente na estrutura. Proteína do código PDB, 7Bir, baixada da plataforma Protein Data Bank (PDB).



Fonte: Do autor.

Com o resultado das coordenadas do sítio ativo, através do controle, iniciou-se a ancoragem primeiramente dos compostos naturais e em seguida dos compostos sintéticos. Após a execução, todos os resultados obtidos foram classificados a partir de sua energia de ligação fornecida por Kcal/mol. Os resultados foram classificados em ordem crescente, do mais negativo para o mais positivo, demonstrando que, quanto mais negativo mais forte o perfil de interação.

Em seguida, os melhores resultados do docking foram ligados novamente a proteína e salvos mediante ao programa PyMOL, para realização das imagens 3D do sítio ativo da proteína com o ligante. Realizou-se a verificação pelo programa LigPlot+ (Laskowski; Swindells, 2011), a fim de observar as forças de interações intermoleculares, como por exemplo: pontes de hidrogênio, interações pi-pi, hidrofóbicas, alquila, pi-sigma, entre outras. Foram calculadas e relacionadas às interações dos compostos com o sítio ativo conforme literatura prévia e o controle. Em seguida foram realizadas pesquisas pela ferramenta SciFinder, para mais informações dos compostos utilizados, visto que a plataforma contém inúmeras informações sobre os compostos, através de bancos de dados científicos, além de ser reconhecida pelo Portal de Periódicos da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoas de Nível Superior (Gabrielson, 2018).

3.3 Farmacologia e farmacocinética

Os códigos SMILES dos compostos precursores foram obtidos pela ferramenta OpenBabel. Após, foram avaliados quanto sua farmacologia e farmacocinética, para validação das simulações feitas *in silico*. O estudo de drogabilidade foi executado as regras de Lipinski: não ter mais que cinco doadores de hidrogênio; ter até dez aceptores de hidrogênio; massa molar menor que 500 Dalton (Da); LogP menor ou igual a cinco (Lipinski *et al.*, 2001). E os parâmetros farmacocinéticos pelas plataformas SwissADME (Daina; Michielin; Zoete, 2017) e ADMETLab 2.0 (Xiong *et al.*, 2021). Por fim, foi utilizado a técnica do bioisosterismo, pelo software Xundrug (Shan; Ji, 2020), aplicada como estratégia quando houver necessidade de melhorias na atividade farmacológica, otimizando parâmetro farmacocinéticos e diminuição dos efeitos adversos (Lima; Barreiro, 2005).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Obtenção do alvo e dos ligantes

A busca pelo marcador presente em todos os cânceres utilizados neste estudo, conforme mencionado, foi a p53. Sendo o método utilizado a inibição com a MDM2, através dos compostos sintéticos e naturais. Estudos empregando a interrupção da interação p53-MDM2, são considerados pertinentes para descobertas que mudarão o rumo do desenvolvimento de fármacos contra tumores (Zhu *et al.*, 2022; Koo; Sharma; Narayan, 2022).

Deste modo, a inibição da interação com o principal regulador negativo, é uma estratégia terapêutica satisfatória devido aos resultados de estudos *in vitro* levados para ensaios clínicos (Hu *et al.*, 2021; Koo; Sharma; Narayan, 2022). Como por exemplo, a realização do experimento pela proteína RG7112 (RO5045337), um antagonista da MDM2. Onde, através do seu uso, a maioria dos pacientes que submeteram ao seu tratamento apresentaram melhora devido a doença não sofrer proliferação (Marine *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2021).

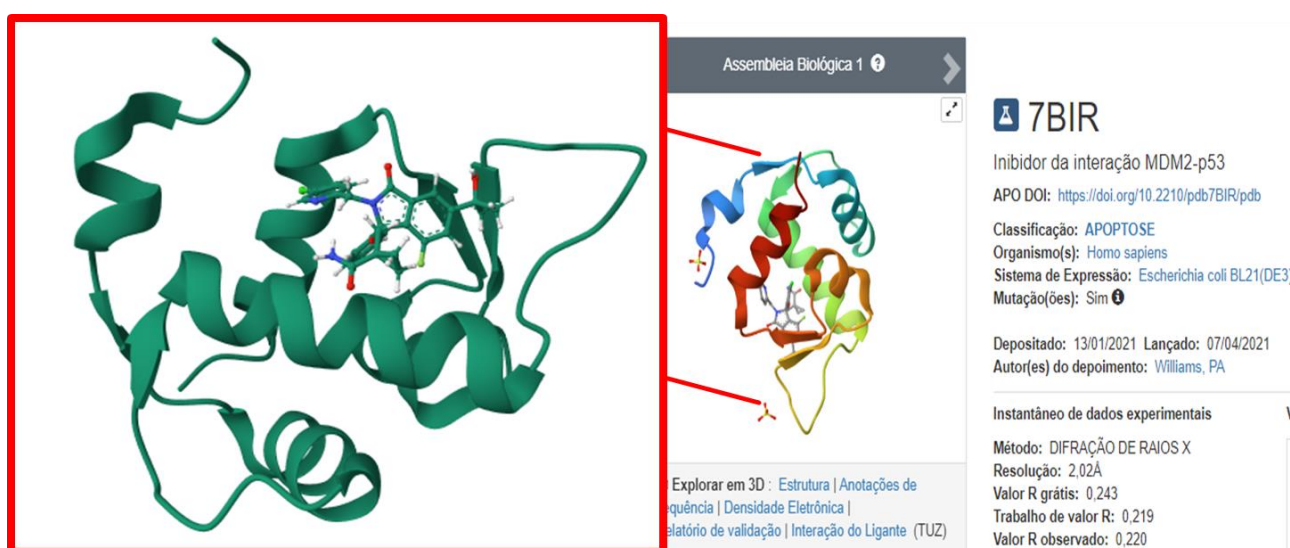
Outros estudos com a mesma metodologia, mostraram-se bons resultados. Foi relatado, que ao impedir a relação da p53-MDM2, a apoptose é induzida, como também há a diminuição na supressão imune e na tumorigenicidade das células cancerosas (Klein; Vassilev, 2004; Guo *et al.*, 2017; Koo; Sharma; Narayan, 2022). Na figura 3 demonstra-se simplificada como a proteína MDM2 faz com que a p53 não exerça suas funções, conseqüentemente, as células tumorais continuam multiplicando desordenadamente

A proteína utilizada neste estudo foi o código PDB, 7BIR, cristalizada e estudada por Chessari e colaboradores (2021). Escolhida devido aos parâmetros citados na metodologia, além do composto presente em sua estrutura. Quando levado *in vivo*, apresentou equilíbrio de propriedades, como, biodisponibilidade oral, seletividade e eficácia na farmacodinâmica antitumoral, pelo modelo de xenoinxerto SJS-1 em doses toleradas (Chessari *et al.*, 2021).

Adicionado a isto, a proteína com código PDB, 7BIR (Chessari, *et al.*, 2021) foi baixada para um servidor local pela plataforma Protein Data Bank. Mesmo que sua estrutura não esteja de acordo com a metodologia, devido o valor de resolução de 2,02 Å. Entretanto, em sua estrutura existe um composto ligado: 1-[[1-(R)]-2-[(5-

cloranilpiridin-2-il)metil]-1-(4-clorofenil)-7-fluoranil-3-oxidanilideno-5-(2-oxidanilpropan-2-il)isoindol-1-il]oximetil]ciclopropano-1-carboxamida (C₂₈H₂₆Cl₂FN₃O₄) com valores de IC₅₀ definidos, sendo este o composto controle deste estudo.

Figura 3- Imagem da estrutura 7BIR e suas informações de acordo com os parâmetros necessários para ser utilizada nesse estudo. Entretanto, mesmo que a mesma seja um pouco maior de 2 Å, possui-se nela um composto co-cristalizado em seu sítio ativo, ressaltando que o mesmo será necessário como controle, sendo o parâmetro mais relevante para se obter melhores resultados dos compostos propostos.



Fonte: Plataforma Protein Data Bank (PDB), modificada pelo autor.

Após ser baixada para o servidor local, a proteína com o código PDB, 7BIR, foi preparada pela ferramenta MGLTools para sua utilização. O preparo consiste em retirar as moléculas de água, devido às moléculas de H₂O serem extremamente reativas, podendo interagir com o composto no sítio ativo. Realizou uma busca por átomos que pudessem estar ausentes, a adição de hidrogênio e das cargas de Kollman, quando necessário. Foi retirado o composto co-cristalizado em sua estrutura, para realização do redocking para confirmar se a abordagem de docking acha a posição cristalográfica do ligante.

Em seguida, os compostos naturais foram pesquisados no banco de dados Zinc20 e os sintéticos através do banco de dados Enamine, escolhidos por possuírem uma maior quantidade de compostos. Assim, foram baixados para o servidor local,

50.240 compostos sintéticos, 36.043 compostos naturais pela biblioteca TCM em Taiwan e preparados pelo software OpenBabel. Após o preparo, os compostos sintéticos tiveram o total 49.803 e os naturais 45.189. Durante o processo de manipulação os compostos poderão ser substituídos se tiverem duplicado e/ou dados como “iguais”. Quando há pequenas diferenças o sistema compreende como compostos diferentes. Além disso, os compostos tiveram seus respectivos nomes modificados para “sint” para a biblioteca de sintéticos e “nat” para naturais.

4.2 Redocking e docking

A ancoragem molecular, foi preparada pela ferramenta MGLTools e AutoDock Vina, na determinação dos cálculos do docking molecular, com a “grid boxes”, utilizado para determinar as energias de ligação do sítio ativo. Consecutivamente, realizou-se o redocking, retirada do composto presente na proteína e novamente ancorado no mesmo sítio de origem. Com isso, encontrou-se a mesma posição da estrutura original, comprovando a metodologia de docking molecular pelo AutoDock Vina. Ele estabeleceu a geometria do ligante no sítio ativo da proteína, através de complementaridade, afinidade, identificação e verificação da localização do sítio ativo (Chen; Seukep; Guo, 2020). O controle foi co-cristalizado de maneira que encontrou-se resultados semelhantes à vida real, validando sua atividade. Sendo essa energia o controle para os parâmetros obtidos para dos compostos a serem utilizados.

Com o domínio do docking e ancoragem molecular (score) de indicar formas eficientes pela afinidade de energia, que representa seu valor de aproximação computacional e prediz as interações proteínas-ligante a fim de que o método *in silico* se familiarize ao máximo da conformação *in vivo*. Assim, observou-se a comunicação das estruturas 3D dos compostos com molécula com código PDB, 7BIR, para comprovar a veracidade da interação nas regiões especificadas pela grid box, sendo esse, o local estabelecido como sítio ativo da interação entre a P53 e a MDM2.

A partir da ancoragem molecular dos compostos sintéticos e naturais utilizando o AutoDock Vina, foram obtidos uma tabela organizada com os resultados das energias de ligação de cada composto de forma crescente. Obteve-se por usar os compostos que tiveram uma energia de ligação mais forte que os demais, devido a isso, trabalhou-se com os três primeiros de cada categoria. Dado aos resultados, observa-se que os produtos naturais obtiveram energias de ligação mais fortes,

entretanto a diferença entre eles não se encontra maior que o desvio padrão de $\pm 3,0$ Kcal/mol apresentado pela ferramenta AutoDock Vina.

Tabela 1 – Resultado da energia de ligação do docking molecular dos compostos a serem utilizados com possíveis fármacos.

	Identificação	Energia de Ligação (Kcal/mol)
Sintéticos	Sint038125	-10,1
	Sint043781	-10,1
	Sint033402	-10,1
	Controle	-9,5
Naturais	Nat026277	-11,2
	Nat034716	-11,1
	Nat038026	-10,9

Fonte: Do autor.

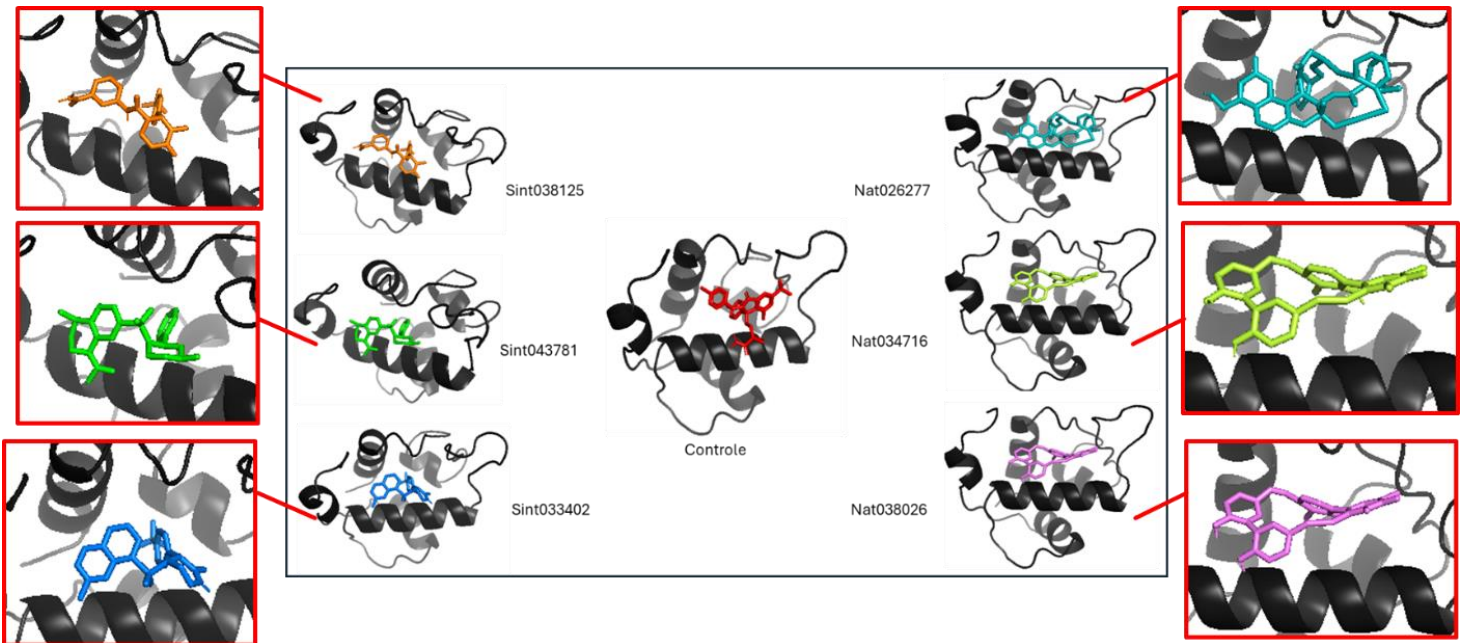
Esperava-se que os compostos tivessem energia de ligação superior ao composto controle, que fossem maior que o desvio padrão. Entretanto os compostos pouco se divergem, e encontram-se semelhantes ao controle. Para que obtivesse resultados diferentes do controle, a energia molecular teria que ser superior a 12,5 e/ou inferior a 6,5, de modo que a proporção entre eles não entrariam nos valores do desvio padrão do sistema. Porém, como o controle é o parâmetro mais preciso demonstrando energia de ligação cabíveis, revela que as interações provavelmente ocorrerão entre o composto e a proteína utilizada com o código PDB.

4.3 Interações no sítio ativo da molécula com o código PDB, 7BIR

Análises de sequências, relações estrutura-função, docking molecular e triagem virtual são algumas das abordagens desenvolvidas por bioinformática estrutural pela ferramenta PyMOL, além de obter uma visão geral e útil do design dos compostos e suas interações em 3D (Yuan; Chan; Hu, 2017). Na figura 4, a ferramenta PyMOL identificou na forma tridimensional quanto ao docking molecular dos ligantes

no sítio ativo da proteína com o código PDB 7BIR, se haveria real energia de interação entre eles.

Figura 4- Configuração das estruturas 3D dos compostos com molécula com código PDB 7BIR, para comprovar a veracidade da interação nas regiões especificadas pela grid box, sendo esse, o local estabelecido como sítio ativo, através do controle, pelo programa PyMol.

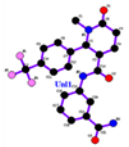

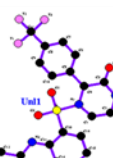
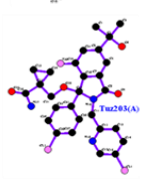
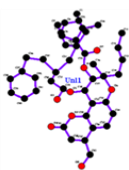
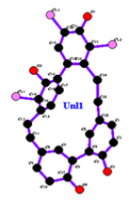


Fonte: Do autor.

A verificação tridimensional de todos os ligantes propostos, foram demonstrados como possivelmente inseridos corretamente no sítio ativo da proteína estabelecida. Isso ocorreu através da observação do composto controle, sendo perceptível através das configurações 3D da proteína. Compreendo que cada ligante vai se inserir de uma forma diferente no sítio ativo, devido ao tamanho, estrutura e local de afinidade.

Para mais detalhes sobre os compostos, as estruturas químicas foram descritas abaixo na Tabela 2. Sendo que plataforma SciFinder é uma ferramenta de referências oferecidas pela Capes. No qual indexa periódicos científicos, contendo variadas base de dados científicas (Gabrielson, 2018). Como era previsto, os compostos naturais demonstraram ser bem maiores e mais complexos que os compostos sintéticos, visualmente, podendo ser um empecilho quando utilizados para experimentos *in vivo*

Tabela 2- Estrutura química detalhada dos compostos sintéticos e naturais, informações detalhadas e fornecedores.

Compostos	Nome estrutural	Estrutura molecular	Referencia
	N-(3-carbamoylphenyl)-1-metil-6-oxo-2-[4-(trifluorometil)fenil]piperidina-3-carboxamida	C ₂₁ H ₂₀ F ₃ N ₃ O ₃	Enaminar
	1-[4-metil-7-(4-metil-2-fenilpiperazin-1-il)sulfonil-3,4-di-hidro-2H-quinolin-1-il]etanona	C ₂₃ H ₂₉ N ₃ O ₃ S	Enaminar
	4-(2-Metilquinolin-8-il)sulfonil-3-[4-(trifluorometil)fenil]piperazina-2-ona	C ₂₁ H ₁₈ F ₃ N ₃ O ₃ S	Enaminar
	1-[[[(1~{R})-2-[(5-cloranilpiridin-2-il)metil]-1-(4-clorofenil)-7-fluoranil-3-oxidanilideno-5-(2-oxidanilpropan-2-il)isoindol-1-il]oximetil]ciclopropano-1-carboxamida	C ₂₈ H ₂₆ Cl ₂ FN ₃ O ₄	ChEMBL
	Acetato de [2-Acetiloxi-4,5-bis(fenilmetoxi)-6-(tritoloximetil)oxan-3-il]	C ₄₃ H ₄₂ O ₈	Zinc20: Banco de dados TCM em Taiwan
	(20E)-17,21,23-tricloropentaciclo[20.2.2.110,14.115,19.02,7]octacosano-1(24),2(7),3,5,10(28),11,13,15,17,19(27),20,22,25-tridecaeno-5,13,16,24-tetrol	C ₂₈ H ₁₉ Cl ₃ O ₄	Zinc20: Banco de dados TCM em Taiwan

Fonte: Do autor.

Distinguiu-se detalhadamente os compostos apresentados, todos os ligantes foram nomeados segundo os seus respectivos códigos de identificação, dispostos em ordem de acordo com a Tabela 1. As informações dos compostos obtidas pela plataforma SciFinder não resultaram efeitos como esperado, pois, não foi possível encontrar nenhuma referência sobre os compostos, apenas sites de vendedores. Por

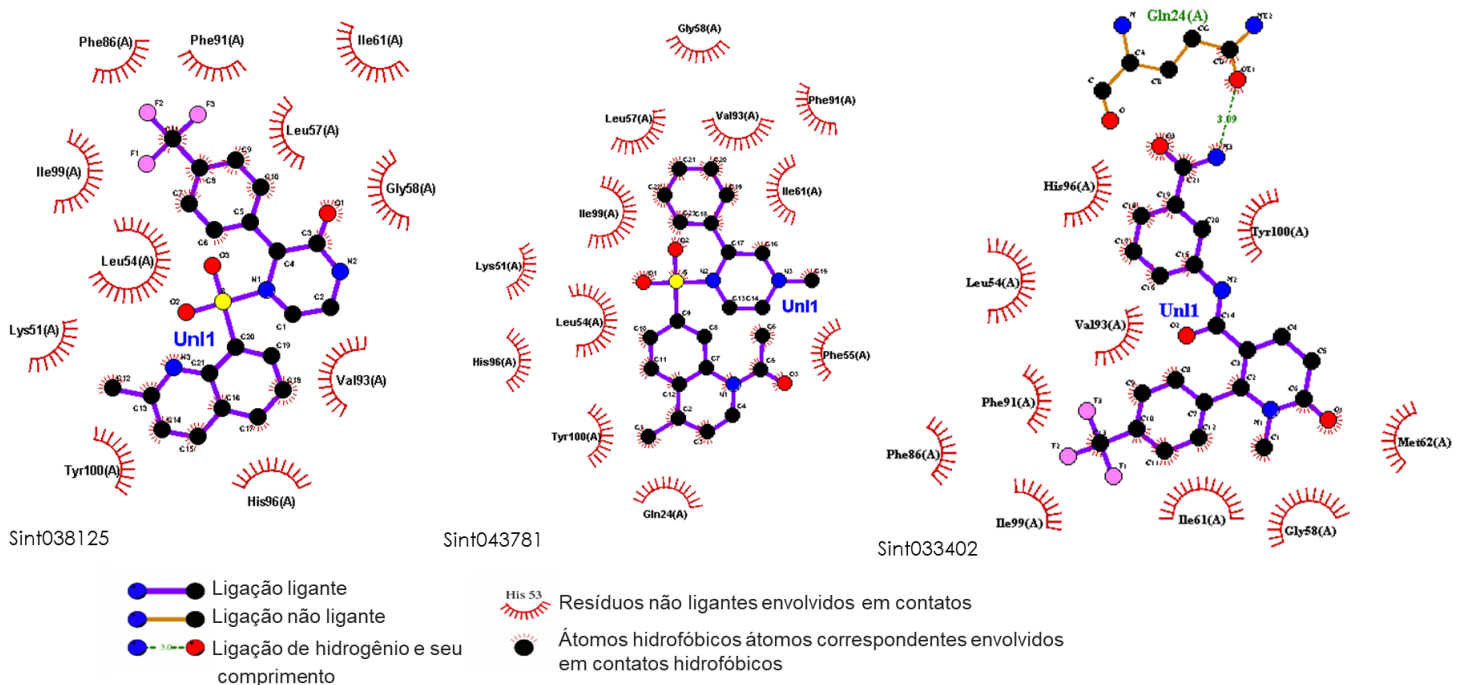
não possuir referências nem outras informações, pode-se indicar produtos inéditos na área de quimioterápicos, abrangendo ainda mais a variação de compostos.

Entretanto, o composto sintetizado na molécula com código PDB, 7BIR, anteriormente, não havia sido alvo de nenhum método científico como potencial fármaco para neoplasias. Entretanto, obteve-se resultados benéficos quando estudado e levado *in vivo* (Chessari *et al.*, 2021). Evidenciando a grande relevância de estudos que visam a descoberta de compostos para potenciais fármacos.

Outro fato foram os compostos Nat034716 e Nat038026 que foram dados como iguais pela plataforma Zinc20, sendo justificado que, quando ocorreu o docking dos compostos, foram duplicados. A identificação ZINCO85947357 contém dois compostos similares, que apresentam códigos iguais, mas que possuem diferenças estruturais. Por isso existem dois códigos diferentes nos resultados (Nat034716 e Nat038026).

Das interações geradas dos compostos com a proteína foram analisadas pelo programa LigPlot+ (Laskowski *et al.*, 2011). Os parâmetros entre proteína-ligante, as forças de interações intermoleculares foram descritas de acordo com suas reações e comparadas quanto ao controle. Como foi realizado o estudo de Agarwal e colaboradores (2015).

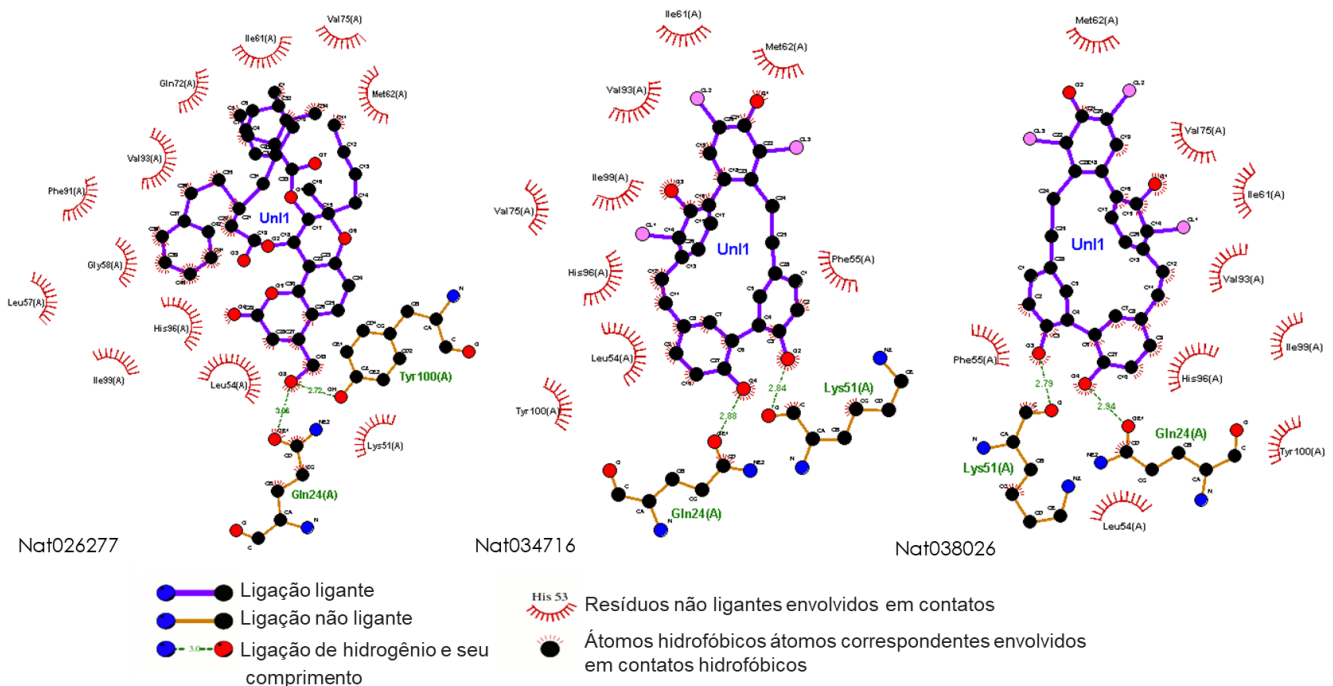
Figura 5 - Visualização das interações intermoleculares entre a proteína código PDB 7BIR e os ligantes sintéticos. São necessárias que todos os compostos interagem-se com determinados componentes químicos, isso estabelecerá a interação com a MDM2, assim como o controle.



Fonte: Do autor.

Nesse processo de ancoragem molecular, foram classificadas interações intermoleculares pelos ligantes com a proteína. Todos os resultados, foram estabelecidos de acordo com a Tabela 1. O composto Sint038125 realiza quatro interações de van der Waals, ligações de H não clássicas, Pi-Cátion, Pi-Pi Stacked, Alquila e Pi-Alquila. O composto Sint043781 realiza quatro interações de van der Waals, ligação de H não clássica, Pi-Cátion, Pi-Alquila, Alquila e Pi-Pi Stacked. O composto Sint033402 realiza uma única ligação de Hidrogênio (H) clássica com o aminoácido Gln24; das outras interações realizadas são, ligação de H não clássica, Alquila, Pi-Alquila, Pi-Cátion, Pi-Sigma e Pi-Pi Stacked. Os compostos sintéticos então realizam importantes interações com a molécula de formas diversificadas, mostrando as variadas interações intermoleculares que cada ligante pode realizar.

Figura 6- Visualização das interações intermoleculares entre a proteína código PDB 7BIR e os ligantes naturais. São necessárias que todos os compostos interagem-se com determinados componentes químicos, isso estabelecerá a interação com a MDM2, assim como o controle.



Fonte: Do autor.

Dos compostos naturais, o ligante Nat026277 faz uma única ligação de H clássica com a Gln59, realiza ligação de H não clássica, cinco ligações de van der Waals, Pi-Cátion, Alquila e Pi-Alquila. O composto Nat034716 realiza nove ligações de van der Waals, ligação de H não clássica, Pi-Sigma, Alquila e Pi-Alquila. Por fim, o composto Nat038026 realiza nove interações de van der Waals, ligação H não clássica, Pi-sigma, Alquila e Pi-Alquila. Como o controle foi o melhor parâmetro estabelecido, realizou-se uma ligação de H clássica com Gln59, ligação de H não clássica, Pi-Cátion, Pi-Pi Stacked, Pi-Alquila, Alquila, Halogênio e Doador-doador. Além disso, mostrou-se a semelhança entre os compostos Nat034716 e Nat038026 foram evidentes quanto são enantiômeros.

Ademais, existem ligações estabelecidas para haver interação com a MDM2, pelo contato direto via pontes de hidrogênio, com a presença de três sub bolsas de resíduos hidrofóbicos da p53, exercendo o reconhecimento da Phe19, Trp23 e Leu26, que auxiliam nessa interface entre a p53 e MDM2. A caracterização estrutural inicial da interface de ligação p53-MDM2 revelou que o *N*-terminal do MDM2 possui uma

bolsa hidrofóbica profunda ocupada por cadeias laterais de três resíduos de aminoácidos no domínio de transativação alfa-helicoidal de p53 (Chessari *et al.*, 2021).

Sendo que, “à bolsa Phe, faz interação de Van der Waals com Val93 e formando uma interação aromática de ponta a ponta com Tyr67. O anel C3-clorofenil ocupa o bolso Trp, como visto em muitas outras estruturas inibidoras. A bolsa Leu é preenchida pelo grupo 4-nitrobenzil que está envolvido em uma interação de empilhamento com His96. A estrutura de isoindolinona oferece bons vetores para explorar as bolsas canônicas de MDM2.” - Chessari *et al.*, 2021.

Conforme observado nas figuras 5 e 6 são representadas as interações intermoleculares. De acordo com os três locais de ligação na sub bolsas da p53, Phe19, Trp23 e Leu26, todos os compostos interagem com partes dela. Observado que as interações possivelmente foram eficientes na interação com a p53.

4.4 Resposta imunológica

Como dito anteriormente, os compostos ligados a molécula com código PDB, 7BIR, exerceram função de interação com a p53 no lugar do regulador negativo MDM2, isso fará que haja grande probabilidade de os compostos serem potenciais fármacos antineoplásicos. Conseqüentemente, é previsto que a p53 exercerá suas funções, como também ative algumas vias imunológicas.

Por exemplo, a p53 do tipo selvagem, tem como função a resistência imunológica (Belyi; Levine. 2009; Levine, 2020), estudos por Levine (2020) apresenta a proteína p53 como imunogênica em células neoplásicas, descreve que as células TCD-4 Th2 seriam auxiliares que permitiriam a produção de anticorpos específicos, fazendo com que peptídeos produzidos tenham atração para ligar-se em células T classe 2 (HLA) e CD-4 (TCRs), auxiliando células B na produção de anticorpo IgG. Os anticorpos não necessariamente devem reconhecer a mutação, pois reconhecem altas concentrações de peptídeos da p53 nas extremidades do C e N-terminais da

proteína; justificando que o aumento dos níveis de qualquer proteína pode desencadear uma resposta imunológica (Levine, 2020).

Consequente, quando ocorre a resposta na p53 no polimorfismo, observa-se a promoção de receptores Toll-like (TLR), concedendo diferentes respostas ao estresse por infecção ou genético, sucede-se que acontece o aumento da expressão TLR3. Quando ocorre a mutação da p53, o gene TLR altera sua expressão, conferindo a sensibilidade de TLR3, afetando a apoptose induzida e a resposta do interferon do tipo 1 (Taura *et al.*, 2010).

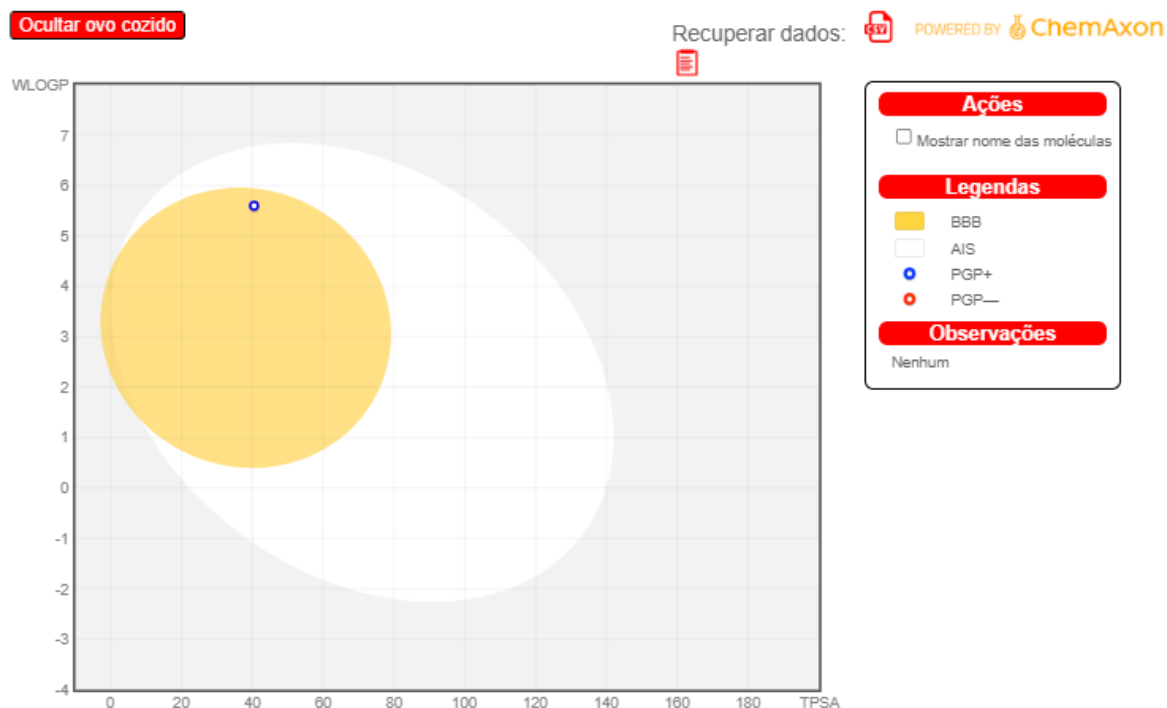
Além disso, mesmo que o NF-κB e a p53 geralmente possuem efeitos contrários, quando ocorre a sinalização da resposta imune, o NF-κB é dependente de p53 para regulação de alguns genes melhorando a resposta inflamatória e tecidual a sinais nocivos, resultando na indução pró-inflamatória em macrófagos e monócitos. Entretanto, quando ocorre a mutação da p53 combinado com o NF-κB, podem modificar o microambiente tumoral inflamatório, conseqüentemente, ocorre a indução de células epiteliais e não-epiteliais na promoção do gene promotor de cânceres (Lowe *et al.*, 2014). Além disso, novas descobertas sugerem que a superexpressão de MDM2 sucede em resistência à quimioterapia convencional (Hou; Sun; Zhang, 2019). Sugerindo então, a importância da proteína p53 na resposta imunológica, quando não ocorre sua mutação.

4.5 Farmacocinética e farmacodinâmica

Se faz necessário a previsão das possíveis propriedades de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade. Os aspectos de drogabilidade pelas regras de Lipinski e de lipofilicidade (Log P) e parâmetros farmacocinéticos, foram efetuados através das plataformas SwissADME e ADMETlab. Dos dois softwares utilizados, o primeiro foi o SwissADME apresentando alguns pontos interessantes, especificando a probabilidade de absorção gastrointestinal (AG) ou por barreira hematoencefálica (BHE), denominado como BOILED EGG.

A figura 8, ilustra como é o Boiled egg, separado por clara (parte branca), alta viabilidade dos compostos serem absorvidos pelo trato gastrointestinal; e gema (parte amarela), alta viabilidade dos compostos permeando a barreira hematoencefálica (BHE) acessando o sistema nervoso central.

Figura 7- Representação do Boiled egg do primeiro composto sintético utilizado, ele demonstra a provável absorção que o medicamento terá, neste caso, será via gastrointestinal, devido que, na imagem o composto está presente na parte branca.



Fonte: Do autor.

No sistema apresentado, clara e gema não são mutuamente exclusivas. Porém, há uma parte cinza, onde não é possível prever qual a absorção que o medicamento terá. Ambas as partes irão prever através da ferramenta SwissADME, o BOILED-Egg quais serão as possíveis vias de absorção que cada fármaco terá (Daina; Michielin; Zoete, 2017).

Dos resultados apresentados na figura 7, a maioria foram preditos como compostos a serem prováveis de absorção via gastrointestinal devido sua presença na parte da clara. Somente os dois compostos naturais Nat034716 e Nat038026 tiveram resultados de provável absorção pelo BHE, parte da gema. Com isto, foi possível presumir que os compostos tiveram absorção favorável por estarem presentes no BOILED-Egg e não na parte cinza. Além disso, todos os compostos tiveram uma relação positiva quanto a biodisponibilidade oral, sendo eficientes para o uso pretendido.

Por muito tempo a via endovenosa era a única forma utilizada em relação à medicação. Entretanto adventos aconteceram, métodos variaram-se para introdução

dos agentes antineoplásicos orais (AAOs) (Borner *et al*, 2021). Isto fez com que houvesse melhorias, como a menor utilização de insumos hospitalares (leitos, cateteres, internações, deslocamentos às clínicas), melhora na qualidade de vida devido o tratamento ser feito boa parte em casa, com a permissão médica promovendo aos pacientes o autocuidado e até mesmo a prática de exercícios físicos (Tornio *et al.*, 2018).

Dos parâmetros de absorção, distribuição, metabolização e toxicidade (ADMET) fornecidos pelo sistema ADMETLab 2.0, e complementada pela plataforma SwissADME, avaliados através da solubilidade, farmacocinética, farmacodinâmica e a drogabilidade.

Quadro 1- Predição dos aspectos da drogabilidades dos potenciais terapêuticos.

Ligantes	Absorção	Distribuição	Metabolismo	Excreção	Toxicologia	Lipinski
Sint038125	AG	VD: 0,94L/kg	IC: 0	CL: 1,237 ml/min/kg T1/2: 0,087	Toxicidade AMES, Carcinogenicidade.	Excelente
Sint043781	AG	VD: 1,15L/kg	IC: CYP2D6, CYP3A4	CL: 1,313 ml/min/kg T1/2: 0,191	Toxicidade AMES, Carcinogenicidade.	Excelente
Sint033402	AG	VD: 0,56L/kg	IC: CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4	CL: 1,622 ml/min/kg T1/2: 0,066	Toxicidade AMES, Carcinogenicidade.	Excelente
Controle	AG	VD: 0,61L/kg	IC: CYP2C9, CYP3A4	CL: 0,825 ml/min/kg T1/2: 0,401	Toxicidade AMES, Carcinogenicidade.	Excelente
Nat026277	AG	VD: 0,16L/kg	IC: CYP2C9, CYP3A4	CL: 1,243 ml/min/kg T1/2: 0,318	Toxicidade AMES, Carcinogenicidade.	Excelente
Nat034716	BHC	VD: 0,43L/kg	IC: CYP2C19, CYP2C9	CL: 1,472 ml/min/kg T1/2: 0,026	-	Ruim 2 Violações
Nat038026	BHC	VD: 0,56L/kg	IC: CYP2C19, CYP2C9	CL: 1,517 ml/min/kg T1/2: 0,023	-	Ruim 2 Violações

Fonte: Do autor.

Legenda: AG- Absorção intestinal humana. BHC: Barreira hematoencefálica. VD: Volume de distribuição: adequado previsto 0,04-20L/kg. IC – Inibidor de enzimas do citocromo. CL: Depuração de um medicamento: >15 ml/min/kg: depuração elevada; 5-15 ml/min/kg: depuração moderada; <5: depuração baixa. T1/2 Meia-vida de um medicamento: 0-0,3: excelente; 0,3-0,7: médio; 0,7-1,0 ruim. Toxicidade AMES: Teste de Ames para mutagenicidade. Carcinogenicidade: teste para cancerígenos. Lipinski: Peso molecular ≤500; logP ≤5; aceptores de hidrogênio ≤10; doadores de hidrogênio ≤5.

Os parâmetros do programa ADMETLab 2.0, foi atualizado em 2021. E foi utilizado devido sua grande importância e impacto, sendo citado cerca de 1277 (Xiong *et al.*, 2021) mediante o google acadêmico. Devido sua forma mais atualizada, é utilizado no desenvolvimento de predição e propriedades ADMET relacionadas a medicamentos, através da farmacocinética e a regra de Lipinski (Bitew *et al.*, 2021; Bakchi *et al.*, 2022; Jha *et al.*, 2022). Assim como o modelo complementar, SwissADME, com cerca de 10465 citações (Daina; Michielin; Zoete, 2017). Por isso foram dispostos neste trabalho.

É possível observar que no quadro 1, que todos os compostos se tiveram a ADMET adequada, de acordo com os cálculos e parâmetros das ferramentas utilizadas, tiveram uma predição da provável para absorção intestinal (AG). Averiguando o que foi informado pelo pelo figura 7, BOILED-Egg.

O Vd é um parâmetro calculado ou estimado a partir das concentrações plasmáticas ao longo do tempo (Golan *et al.*, 2014). Ele é definido como o volume necessário que relaciona a dose administrada/contida de fármaco ingerida/presente no sangue ou no plasma (Brunton *et al.*, 2012). Na distribuição dos compostos, o Vd dado pelo sistema é considerado ótimo na faixa de 0,04 a 20 L/kg, ruins quando <0,04 ou >20L/Kg. Com média de 0,63L/kg, os compostos, de acordo com o sistema, foram estimados como ótimos. Entretanto, compreende-se que o Vd é um volume imaginário, um parâmetro bem estabelecido da farmacologia/farmacocinética que reflete a extensão do fármaco presente nos tecidos. Além disso, ocorrem variadas alterações no Vd de um medicamento, devido que, para cada fármaco é único, variando de acordo com a população estudada (Brunton *et al.*, 2012; Golan *et al.*, 2014). Como exemplo, a composição corporal, é uma das características afetada em pacientes com câncer, como a caquexia (Van Den Anker *et al.*, 2018). Esta condição é um distúrbio definido pela perda de peso corporal que provoca alterações catabólicas no músculo esquelético, muscular e no tecido adiposo (Baba; Buch, 2021). Fazendo com que o Vd seja diferente em relação a uma pessoa sem essa condição.

O metabolismo é mediado pela família de enzimas citocromo CYP450 que são passíveis de inibição ou ativação por outros medicamentos. Estas podem ainda sofrer polimorfismo e enquadrar o indivíduo em metabolizador lento ou rápido. Como os pacientes oncológicos normalmente fazem o uso de uma gama de medicamentos, a polifarmácia contribui para o quadro de insuficiência e déficit metabólica derivada do

próprio câncer, no metabolismo do indivíduo (Vyskocilova *et al.*, 2017; Fuchs; Wannmacher, 2017).

De acordo com a metabolização, somente o primeiro composto sintético não teve inibidor de enzimas do citocromo P450 (CYP450). Sendo isoenzimas envolvidas na metabolização de um fármaco, onde moléculas inativas são transformadas em suas formas ativas após metabolização pela via CYP (Golan *et al.*, 2014). Entretanto, todos os outros fizeram esta inibição das enzimas na tabela 2, conseqüentemente há uma maior aptidão de se tornarem tóxicos, ocorrer a diminuição da atividade de enzimas metabólicas, ao aumento da concentração plasmática e da meia-vida de eliminação, impedindo que o clearance (nome genérico da depuração medicamentosa) atua de forma adequada prejudicando o efeito terapêutico (Zhao *et al.* 2021).

Em seguida a excreção, depuração de um medicamento ou clearance, foi dado como baixa pela plataforma. Isso indica que o medicamento permanecerá no organismo por um tempo prolongado do que o “normal”. A excreção é quantificada pelo parâmetro depuração ou clearance renal, representada pela medida da eficiência que o organismo tem em eliminar um fármaco pela circulação sistêmica (Brunton *et al.*, 2012). Já a meia-vida de eliminação foi prevista como excelente segundo os parâmetros do sistema, pois mostraram-se $> 0,3$. Subjetivamente, a meia-vida de um fármaco é dada como o tempo necessário para reduzir sua concentração no plasma em 50% (Brunton *et al.*, 2012; Golan, *et al.*, 2014). Vale ressaltar que nenhum nível é fixo e se aplica a todos os indivíduos, devido à alta variabilidade de cada paciente. Isso faz com que sejam desenvolvidas estratégias individualizadas da farmacologia do medicamento para indivíduo e suas adversidades (Hermans; Dolan, 2020; Ragni, 2021).

Com exceção dos compostos Nat034716 e Nat038026, o restante teve probabilidade de toxicidade para AMES e/ou Carcinogenicidade que foi de grande importância para observar a necessidade do desenvolvimento de novos compostos, visto que, são probabilidades de ocorrerem em um indivíduo saudável.

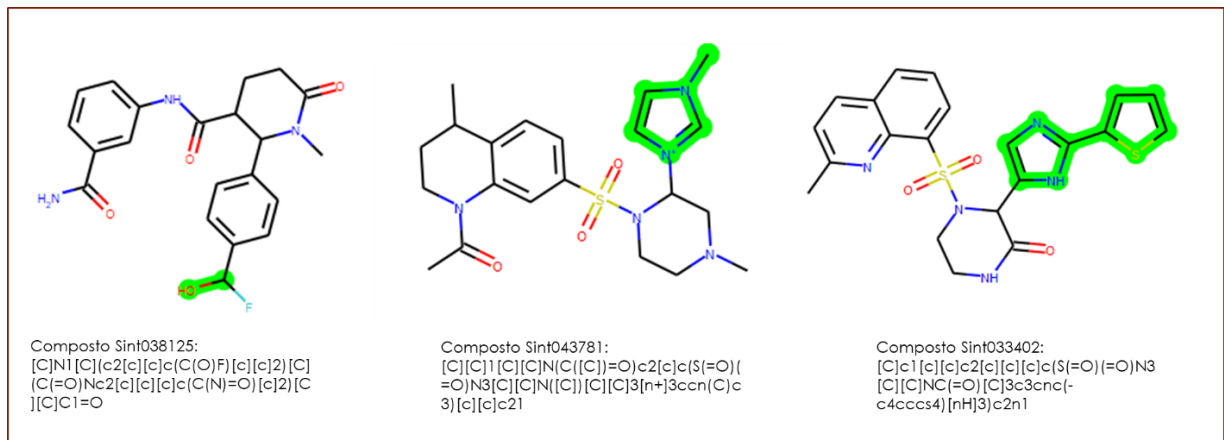
A toxicidade de antineoplásicos podem ser referidas em diferentes tipos: cardiotoxicidade, disfunção reprodutiva, toxicidade gastrointestinal, toxicidade nos rins e na bexiga; toxicidade pulmonar, reações alérgicas, hepatotoxicidade, neurotoxicidade, anafilaxia, toxicidade dermatológica, alterações metabólicas (Fuchs; Wannmacher, 2017). Agentes quimioterápicos à base de taxanos (paclitaxel), platina

(carboplatina e cisplatina), ifosfamida, vinorelbina, topotecano, gencitabina e anticorpos monoclonais (bevacizumabe), embora utilizados frequentemente pela sua eficácia, esses agentes possuem efeitos adversos que podem comprometer o tratamento e a qualidade de vida dos pacientes (Serrano-Olivera; Cortés-Esteban; Poitevin-Chacón, 2014). Do mesmo modo, quando ocorre a administração medicamentosa em alguns pacientes com câncer, os quais podem ser submetidos a terapias com a inserção de adjuvante (s) para regulação de algumas reações, como insônia, ansiedade, depressão, dores, náuseas, vômitos, entre outros (INCA 2001). Como por exemplo o Tramadol (Subedi *et al.*, 2019).

De acordo com a regra de Lipinski *et al* (2001), o peso molecular não pode ultrapassar 500g mol⁻¹, o LogP deve ser < 5, os aceptores de hidrogênio devem ser <10 e o número de doadores de hidrogênio deve ser < 5. Somente os compostos Nat034716 e Nat038026 tiveram o descumprimento deste parâmetro, sendo que ambos tiveram peso molecular >500g mol⁻¹ e tiveram LogP superior a 5. Entretanto, aos outros compostos a análise foi promissora cumprindo os critérios da drogabilidade por Lipinski e colaboradores (2001).

Por fim, foi utilizado a técnica do bioisosterismo, pelo software Xundrug (Shan; Ji, 2020) aplicada como estratégia para otimizar os parâmetros farmacocinéticos e diminuir os efeitos adversos. Entretanto, na realização dos bioisómeros, os compostos naturais não foram satisfatórios, pois não obtiveram nenhum efeito adverso alterado, permanecendo similares. Entretanto, os bioisómeros dos compostos sintéticos surtiram efeitos desejados quando foram criadas novas moléculas a partir da substituição de fragmentos.

Figura 8- Bioisosterismo nas regiões selecionadas de acordo com a tabela 1, dos compostos sintéticos e seus respectivos smiles obtidos pelo programa Xundrug, resultando em novos potenciais fármacos.



Fonte: Do autor.

Foram demonstrados os novos compostos sintéticos obtidos através da plataforma Xundrug pelo sistema MolOpt. Após os resultados, foi utilizado novamente as plataformas SwissADME e ADMETLab para observar quão satisfatório os compostos 1 Sint038125, composto 2 Sint043781 e composto 3 Sint033402 apresentaram. Das modificações que houveram nos parâmetros ADMET, a distribuição dos Vds aumentou com uma média de 0,30L/kg, entretanto, os parâmetros continuam bons. Seguidamente, a metabolização e a toxicidade, que foram satisfatórios, devido que os compostos 1 e 2 não tiveram inibição em nenhuma das enzimas do citocromo e foram desfavoráveis para Toxicidade AMES, o que não ocorreu no composto 3, sendo positivo para inibição CYP2C19 e CYP3A4; e positivo para Toxicidade AMES.

Devido aos resultados dos compostos sintéticos, foi observado que conforme critérios de farmacocinética após o bioisosterismo, revelou-se que os compostos sintéticos Sint038125, Sint043781 e Sint033402 poderão ser potenciais fármacos anticancerígenos. Cabíveis para serem estudos *in vivo*, a serem averiguados de forma mais precisa.

5 CONCLUSÃO

O Câncer é uma das principais doenças acometidas no mundo todo, no Brasil, os mais frequentes são o câncer de mama, cólon e reto, pulmão, próstata, colo do útero, cavidade oral e estômago. A p53 está presente em cerca de 50% dos cânceres no mundo. Suas funções são condicionadas a detecção, eliminação ou silenciamento do DNA repetitivo, respondendo a estressores, doenças infecciosas, exercendo resistência inata. A p53 está entre as proteínas mais importantes na indução da morte celular, supervisão do ciclo celular e supressão de células cancerígenas. O método para tratar os demais cânceres através da reativação das funções p53 foi utilizado no presente trabalho.

Para isso, foi proposto a inibição da interação com seu regulador negativo MDM2. Os resultados mostraram-se satisfatórios neste estudo. Todos os seis compostos apresentaram possível probabilidade quanto a utilização da na proteína com código PDB, 7BIR para interagir e neutralizar a interação com a p53. Porém os compostos naturais apresentam desvantagem devido serem compostos grandes em relação aos sintéticos e não apresentarem modificações bioisostéricas, para melhorias na farmacocinética.

Aliando-se aos parâmetros de farmacocinética e bioisosterismo no qual os resultados mostraram-se que os três compostos sintéticos, Sint038125, Sint043781 e Sint033402; foram oportunos, podendo ser prováveis potenciais alvos a serem levados *in vitro* como antineoplásicos.

REFERÊNCIAS

AGARWAL, T.; ASTHANA, S.; BISSOYI, A. Molecular modeling and docking study to elucidate novel chikungunya virus nsp2 protease inhibitors. **Indian J Pharm Sci.**, v. 77, n. 4, p. 453-460, July/Aug. 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4649777/>. Acesso em: 02 jul. 2024.

ALONSO, H.; BLIZNYUK, A. A.; GREASY, J. E. Combining docking and molecular dynamic simulations in drug design. **Med Res Rev.**, v. 26, n. 5, p. 531-568, Sept. 2006. Doi: 10.1002/med.20067.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Tipos de tratamento de câncer**. Atlanta, Georgia: ACS, 2023. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/managing-cancer/treatment-types.html>. Acesso em: 27 jan. 2023.

BABA, M. R.; BUCH, S. A. Revisiting cancer cachexia: pathogenesis, diagnosis, and current treatment approaches. **Asia Pac J. Oncol. Nurs.**, v. 27, n. 5, p. 508-518, Aug. 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34527780/>. Acesso em: 05 maio 2024.

BAKCHI, B. *et al.* An overview on applications of swissadme web tool in the design and development of anticancer, antitubercular and antimicrobial agents: A medicinal chemist's perspective. **Journal of Molecular Structure**, v. 1259, 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022286022003854>. Acesso em: 01 jul. 2024.

BARREIRO, E. J.; RODRIGUES, C. R. Modelagem molecular: uma ferramenta para o planejamento racional de fármacos em química medicinal. **Química Nova** [online], v. 20, n. 3, p. 300-310, set. 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0100-40421997000300011>>. Acesso em: 24 ago. 2023.

BELYSI, V. A.; LEVINE, A. J. One billion years of p53/p63/p73 evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 42, p. 17609-17610, 2009. Disponível em: <https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.0910634106>. Acesso em: 27 jan. 2023.

BERMAN, H. M. *et al.* The protein data bank nucleic acids research. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 1, p. 235- 242, Jan. 2000. Disponível em: <https://academic.oup.com/nar/article/28/1/235/2384399?login=false>. Acesso em: 23 jan. 2023.

BITENCOURT, F. G.; DE AZEVEDO, W. F. JR. How docking programs work. **Methods Mol Biol.**, v. 2053, p. 35-50, 2019. Disponível em: https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-4939-9752-7_3. Acesso em: 23 jan. 2023.

BITEW, M. *et al.* Pharmacokinetics and drug-likeness of antidiabetic flavonoids: molecular docking and DFT study. **Journals Plos.**, v. 16, n. 12, Dec. 2021.

Disponível em:

<https://journals.plos.org/plosone/article/authors?id=10.1371/journal.pone.0260853>.

Acesso em: 01 jul. 2024.

BORNER, M. *et al.* Atendendo às necessidades dos pacientes: alternativas orais à terapia intravenosa. **The Oncologist.**, v. 6, n. 4, p. 12-16, Aug. 2001. Disponível em:

<https://academic.oup.com/oncolo/article/6/S4/12/6387715?login=false>. Acesso em:

14 nov. 2023.

BRASIL. MINISTERIO DA SAÚDE. Diretriz BRASPEN de terapia nutricional no paciente com câncer. **BRASPEN**, v. 34, p. 2-32, 2019. Disponível em:

<https://f9fcfefb-80c1-466a>

835e5c8f59fe2014.filesusr.com/ugd/a8daef_19da407c192146e085edf67dc0f85106.p

df. Acesso em: 30 jun, 2023.

BRUNSÓ, M. L. *et al.* Probable drug-drug interaction between erlotinib and amiodarone causes severe neurotoxicity in a patient with advanced lung cancer.

Anti-cancer Drugs, v. 29, n. 4, p. 380–383, 2018. Disponível em:

[https://journals.lww.com/anti-](https://journals.lww.com/anti-cancerdrugs/abstract/2018/04000/probable_drug_drug_interaction_between_erlotinib)

[cancerdrugs/abstract/2018/04000/probable_drug_drug_interaction_between_erlotinib](https://journals.lww.com/anti-cancerdrugs/abstract/2018/04000/probable_drug_drug_interaction_between_erlotinib)

.11.aspx Acesso em: 05 maio 2024.

BRUNTON, L. L. *et al.* **As Bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman**. 13. ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan 2012.

BØRRESEN-DALE, A. L. TP53 e câncer de mama. **Zumbir Mutat.**, v. 21, p. 292-300. Feb. 2003. Disponível em:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/humu.10174>. Acesso em: 14 nov. 2023.

CASANOVA, L. M.; COSTA, S. S. Interações sinérgicas em produtos naturais: potencial terapêutico e desafios. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 2, p. 575-595, fev. 2017. Disponível em: [https://s3.sa-east-](https://s3.sa-east-1.amazonaws.com/static.sites.s bq.org.br/rvq.s bq.org.br/pdf/v9n2a09.pdf)

[1.amazonaws.com/static.sites.s bq.org.br/rvq.s bq.org.br/pdf/v9n2a09.pdf](https://s3.sa-east-1.amazonaws.com/static.sites.s bq.org.br/rvq.s bq.org.br/pdf/v9n2a09.pdf). Acesso em:

30 jan. 2024.

COSTA, R. M. A. *et al.* The eukaryotic nucleotide excision repair pathway biochimie.

Biochimie, v. 85, n. 11. p. 1083-1099, Nov. 2003. Doi: 10.1016/j.biochi.2003.10.017

CHEN, C. Y. C. TCM Database@Taiwan: the world's largest traditional chinese medicine database for drug screening *in silico*. **Plos one**, v. 6, n. 1, p.15-39, 2011.

Disponível em:

<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0015939>. Acesso

em: 20 jan. 2024.

CHEN, G.; SEUKEP, A. J.; GUO, M. Recent advances in molecular docking for the research and discovery of potential marine drugs. **Mar Drugs**, v. 18, n. 11, p. 545, 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1660-3397/18/11/545>. Acesso em: 23 jan. 2023.

CHESSARI, G. *et al.* Structure-based design of potent and orally active isoindolinone inhibitors of mdm2-p53 protein-protein interaction. **Revista de Química Medicinal**, v. 64, n. 7, p. 4071-4088, 2021. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jmedchem.0c02188>. Acesso em: 10 abr. 2023

CROCE C. M. Oncogenes and cancer. **N. Engl. J. Med.**, v. 31, n. 5, p. 502-511, Jan. 2008. Disponível em: https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMra072367?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%20pubmed. Acesso em: 06 out. 2023.

CUPPARI, L. **Nutrição clínica no adulto**. 2. ed. Barueri, SP: Manole, 2010.

DAINA, A. M. O.; ZOETE, V. SwissADME: uma ferramenta web gratuita para avaliar a farmacocinética, a semelhança com medicamentos e a compatibilidade com a química medicinal de pequenas moléculas. **Sci. Rep.**, v. 7, n. 42717, 2017. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/srep42717>. Acesso em: 27 jan. 2023.

DALLAKYAN, S. **MGLTools**. Hamburgo, Alemanha: Molecular Graphics Laboratory, 2010. Disponível em: <https://mgltools.software.informer.com/>. Acesso em: 08 out. 2023.

DA SILVEIRA, N. J. F.; PEREIRA, F. S. S.; ELIAS, T. C.; HENRIQUE T. Web services for molecular docking simulations. **Methods Mol Biol.**, v. 2053, p. 221-229, 2019. doi: 10.1007/978-1-4939-9752-7_14.

DELANO, W. L. O sistema gráfico molecular PyMOL. **Schrodinger LLC.**, 2023. Disponível em: www.pymol.org. Acesso em: 09 maio 2023.

DOWNING, S. R.; JACKSON, P.; RUSSELL, P. J. Mutations within the tumour suppressor gene p53 are not confined to a late event in prostate cancer progression. **Review of the Evidence Urol Oncol.**, v. 6, n. 3, p. 103-110, May 2001. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1078143900001198>. Acesso em: 09 dez. 2023.

EL-DEIRY, W. S. P21/p53, cellular growth control and genomic integrity. **Curr Top Microbiol Immunol**, n. 227, p. 121-137, 1998. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-71941-7_6. Acesso em: 02 jan. 2024.

ELIAS, T. C.; OLIVEIRA, H. C. B.; DA SILVEIRA, N. J. F. MB-Isoster: a software for bioisosterism simulation. **Journal of Computational Chemistry**, v. 9999, p. 1-8,

2018. Disponível em: <https://bdtd.unifal-mg.edu.br:8443/handle/tede/1306>. Acesso em: 28 dez. 2022.

ELLEDGE, S. J. Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. **Science**, v. 6, n. 5293, p. 1664-72, Dec. 1996. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.274.5293.1664>. Acesso em: 19 jan. 2023.

ENAMINE: software livre. Kiev, Ucrânia, 2023. Disponível em: <https://enamine.net/>. Acesso em: 05 mar. 2023.

FELIN, I. P. D. *et al.* Expressão de p53, p16 E COX-2 em carcinoma escamoso de esôfago e associação histopatológica. **Arq Gastroenterol**, v. 45, n. 4, p. 308-312, Oct. 2008. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/ag/a/CPZZBp4DVznLpwSw9G8rMJC/?lang=pt>. Acesso em: 10 jan. 2023.

FERLAY, J. *et al.* Global cancer observatory: cancer tomorrow. **International Agency for Research on Cancer**, 2021. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/tomorrow>. Acesso em: 09 jul. 2023.

FREED-PASTOR, W. A.; PRIVADOS, C. Mutant p53: one name, many proteins. **Genes Dev.**, v. 15, n. 12, p.1268-1286, June 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3387655/>. Acesso em: 18 jan. 2023.

FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L. **Farmacologia clínica e terapêutica**. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2017.

GABRIELSON, S. W. SciFinder. **Journal of the Medical Library Association**, v. 106, n. 4, p. 588, 2018. Disponível em: <https://scifinder-n.cas.org>. Acesso em: 20 dez. 2022.

GROSDIDIER, A.; ZOETE, V.; MICHIELIN, O. SwissDock, um serviço web de moléculas pequenas de proteínas baseado em EADock DSS. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. 2, p. 270-277, July 2011. Disponível em: https://academic.oup.com/nar/article/39/suppl_2/W270/2506492. Acesso em: 20 dez. 2022.

GUIDO, R. V. C.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Virtual screening and its integration with modern drug design technologies. **Current Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 1, p. 37-46, 2008.

GOLAN, D. E. *et al.* **Princípios de farmacologia – a base fisiopatológica da farmacologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

GUO, G. *et al.* Local activation of p53 in the tumor microenvironment overcomes immune suppression and enhances antitumor immunity. **Cancer Research**, v. 2292, n. 9, p. 2292-2305, 2017. Doi: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-2832>.

HARONIKOVA, L. *et al.* Resistance mechanisms to inhibitors of p53-MDM2 interactions in cancer therapy: can we overcome them?. **Cell Mol Biol Lett.**, v. 15, n. 1, p. 53, Dec. 2021. Disponível em: <https://cml.biomedcentral.com/articles/10.1186/s11658-021-00293-6>. Acesso em: 07 mar. 2023.

HERMANS, C.; DOLAN, G. Pharmacokinetics in routine haemophilia clinical practice: rationale and modalities—a practical review. **Ther Adv Hematol.**, 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7594230/>. Acesso em: 18 maio 2024.

HOU, H.; SUN, D.; ZHANG, X. The role of MDM2 amplification and overexpression in therapeutic resistance of malignant tumors. **Cancer Cell Int.**, v. 22, n. 19, p. 216, Aug. 2019.

HONDA, R.; TANAKA, H.; YASUDA, H. Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. **FEBS Lett.**, v. 22, n. 1, p. 25-27, Dec. 1997. Disponível em: <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1016/S0014-5793%2897%2901480-4?sid=nlm%3Apubmed>. Acesso em: 18 jan. 2023.

HU, J. *et al.* Direcionamento do mutante p53 para terapia do câncer: estratégias diretas e indiretas. **J. Hematol Oncol.**, v. 14, p. 157, 2021. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1186/s13045-021-01169-0>. Acesso em: 03 fev. 2024.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer.** Rio de Janeiro: INCA, 2011.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil.** Rio de Janeiro, RJ: INCA, 2019.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Gastos federais atuais e futuros com os cânceres atribuíveis aos fatores de risco relacionados à alimentação, nutrição e atividade física no Brasil.** Rio de Janeiro, RJ: INCA, 2022.

IRANZO, J.; MARTINCORENA, I.; KOONIN, E. V. Cancer-mutation network and the number and specificity of driver mutations. **Proc Natl Acad Sci.**, v. 26, n.26, p. 6010-6019, June 2018. Doi: 10.1073/pnas.1803155115.

IRWIN, J. J. *et al.* ZINC20 - A free ultralarge-scale chemical database for ligand discovery. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 60, n. 12, p. 6065-6073, 2020. Doi: 10.1021/acs.jcim.0c00675.

JANUS, F. *et al.* O modelo de papel duplo para p53 na manutenção da integridade genômica. **Celular. Mol. Ciência da Vida**, v. 55, p. 12-27, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1007/s000180050266>.

JHA, V. *et al.* Screening of phytochemicals as potential inhibitors of breast cancer using structure based multitargeted molecular docking analysis. **Phytomedicine Plus**, v. 2, p. 100227, 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2667031322000136>. Acesso em: 01 jul. 2024.

KIER, L. B.; HALL, L. H. Bioisosterism: quantitation of structure and property effects. **Chem Biodivers**, v. 1, n. 1, p. 138-151, Jan. 2004. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cbdv.200490006>. Acesso em: 29 fev. 2024.

KLEIN, C.; VASSILEV, L. Visando a interação p53 – MDM2 para tratar o câncer. **Br. J. Câncer**, v. 91, p. 1415–1419, 2004. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/6602164>. Acesso em: 09 jan. 2023.

KONDO, T.; EZZAT, S.; ASA, S. L. Pathogenetic mechanisms in thyroid follicular-cell neoplasia. **Nat. Rev. Cancer**, v. 6, n. 4, p. 292-306, Apr. 2006. Doi: 10.1038/nrc1836.

KOO, N.; SHARMA, A. K.; NARAYAN, S. Therapeutics visando a interação p53-MDM2 para induzir a morte de células cancerígenas. **Internacional J. Mol., Ciência**, v. 23, p. 5005, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms23095005>. Acesso em: 09 jan. 2023.

KRUISWIJK, F.; LABUSCHAGNE, C. F.; VOUSDEN, K. H. P53 in survival, death and metabolic health: a lifeguard with a licence to kill. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.**, v. 16, n. 7, p. 393-405, July 2015. Doi: 10.1038/nrm4007. PMID: 26122615. Acesso em: 10 abr. 2024.

LASKOWSKI, R. A.; SWINDELLS, M. B. LigPlot+: multiple ligand–protein interaction diagrams for drug discovery. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 51, p. 10, p. 2778-2786, 2011. Doi: 10.1021/ci200227.

LESK, A. M. **Introdução a bioinformática**. Porto Alegre, RS: Artmed, 2008.

LEVINE, A. J. P53 e a resposta imune: 40 anos de exploração - um plano para o futuro. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 2, p. 541, 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/2/541>. Acesso em: 21 dez. 2023.

LIMA, L. M.; BARREIRO, E. J. Bioisosterism: a useful strategy for molecular modification and drug design. **Curr. Med. Chem.**, v. 12, n. 1, p. 23-49, 2005. Doi: 10.2174/0929867053363540.

LIPINSKI, C. A. *et al.* Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development setting. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 46, n. 1-3, p. 3-26, Mar. 2001. Doi: 10.1016/s0169-409x(00)00129-0.

LOWE, J. M. *et al.* p53 e NF- κ B coregulam respostas gênicas pró-inflamatórias em macrófagos humanos. **Câncer Res.**, v. 74, n. 8, p. 2182-2192, abr. 2014. Disponível em: <https://aacrjournals.org/cancerres/article/74/8/2182/599468/p53-and-NF-B-Coregulate-Proinflammatory-Gene>. Acesso em: 30 abr. 2024.

LU, X.; FEKI, A. Phenotypic features with p53 alterations related to human papillomavirus and prognostic evaluation in cervical cancer. **Int. J. Gynecol Cancer**, v. 16, n. 2, p. 708-717, Mar./Apr. 2006. Doi: 10.1111/j.1525-1438.2006.00591.x.

MAITRA, A. Molecular envoys pave the way for pancreatic cancer to invade the liver. **Nature**, v. 567, n. 7747, p. 180-192, Mar. 2019. Doi: 10.1038/d41586-019-00710-z.

MARINE, J. C. *et al.* Keeping p53 in check: essential and synergistic functions of MDM2 and MDM4. **Cell Death Differ.**, v. 13, n. 6, p. 927-934, June 2006. Doi: 10.1038/sj.cdd.4401912.

MASSAGUÉ, J.; OBENAU, A. Metastatic colonization by circulating tumour cells. **Nature**, v. 529, p. 298–306, 2016. Doi: <https://doi.org/10.1038/nature17038>.

MOWAT, M. R. P53 in tumor progression: life, death, and everything. **Adv. Cancer Res.**, v. 74, p. 25-48, 1998. Doi: 10.1016/s0065-230x(08)60764-2.

O'BOYLE, N. M. *et al.* Open Babel: Uma caixa de ferramentas química aberta. **J. Cheminform**, v. 3, n. 33, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1758-2946-3-33>. Acesso em: 19 dez. 2022.

RAGNI, M. V. Optical or optimal conclusion: pharmacokinetic-guided dosing in haemophilia. **The Lancet Hematology**, v. 8, n. 7, July 2021. Disponível em: [https://www.thelancet.com/journals/lanhae/article/PIIS2352-3026\(21\)00163-0/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lanhae/article/PIIS2352-3026(21)00163-0/fulltext). Acesso em: 18 maio 2024.

RAY-COQUARD, I. *et al.* Effect of the MDM2 antagonist RG7112 on the P53 pathway in patients with MDM2-amplified, well-differentiated or dedifferentiated liposarcoma: an exploratory proof-of-mechanism study. **Lancet Oncol.**, v. 13, n. 11, p. 1133-1140, Nov. 2012. Doi: 10.1016/S1470-2045(12)70474-6.

SAHAI, E. *et al.* Uma estrutura para avançar nossa compreensão dos fibroblastos associados ao câncer. **Nat. Rev. Cancer**, v. 20, p. 174–186, 2020. Doi: <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0238-1>.

SANTOS, M. O. *et al.* Estimativa de incidência de câncer no Brasil, 2023-2025. **Rev. Bras. Cancerol**, v. 69, n. 1, p. 213700, fev. 2023. Disponível em: <https://rbc.inca.gov.br/index.php/revista/article/view/3700>. Acesso em: 20 dez. 2023.

SHAN, J.; JI, C. MolOpt: a web server for drug design using bioisosteric transformation. **Curr. Comput. Aided Drug Des.**, v. 16, n. 4, p. 460-466, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31272357/> Acesso em: 05 maio 2024.

SERA, L.; URITSKY, T. Pharmacokinetic and pharmacodynamic changes in older adults and implications for palliative care. **Progress in Palliative Care**, v. 24, n. 5, p. 255–261. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/citedby/10.1080/09699260.2016.1192319?scroll=top&needAccess=true>. Acesso em: 05 maio 2024.

SERRANO-OLIVERA, J. A.; CORTÉS-ESTEBAN, P.; POITEVIN-CHACÓN, A. Câncer cervicouterino: tratamento de la enfermedad persistente, recurrente o metastásica. **Gac Mex Oncol.**, v. 13, n. 4, p. 75-82, 2014.

SUBEDI, M. *et al.* An overview of tramadol and its usage in pain management and future perspective. **Biomed Pharmacother**, v. 111, p. 443-451, Mar. 2019. PMID: 30594783. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30594783/>. Acesso em 05 maio 2024

SHENK, J. L. *et al.* P53 represses androgen-induced transactivation of prostate-specific antigen by disrupting hAR amino- to carboxyl-terminal interaction. **J. Biol. Chem.**, v. 19, n. 42, p. 38472-38479, Oct. 2001. Doi: 10.1074/jbc.M103652200.

STRATTON, M.; CAMPBELL, P.; FUTREAL, P. O genoma do câncer. **Nature**, v. 458, p. 719–724, 2009. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nature07943#> . Acesso em: 30 nov. 2023.

TAURA, M. *et al.* TLR3 induction by anticancer drugs potentiates poly I:C-induced tumor cell apoptosis. **Cancer Sci.**, v. 101, n. 7, p. 1610-1617, July 2010. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1349-7006.2010.01567.x>. Acesso em: 30 abr. 2024.

TORNIO, A.; BACKMAN, J. T. Cytochrome P450 in pharmacogenetics: an update. **Advances in Pharmacology**, v. 83, p. 3-32, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1054358918300267?via%3DiHub>. Acesso em: 22 maio 2024.

THIEBAUT, F. *et al.* Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. **Proc Natl Acad Sci.**, v. 84, n. 21, p. 7735-7738, Nov. 1987. Disponível em: <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.84.21.7735>. Acesso em: 26 abr. 2024.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **J. Comput. Chem.**, v. 30, n. 2, p. 455-461, Jan. 2010. Doi: 10.1002/jcc.21334.

VAN DEN ANKER, J. *et al.* Mudanças de desenvolvimento em farmacocinética e farmacodinâmica. **O Jornal de Farmacologia Clínica**, v. 58, p. 10-25, 2018. Disponível em: <https://accp1.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcph.1284>. Acesso em: 05 maio 2024.

VASSILEV, L. T. *et al.* Ativação in vivo da via p53 por antagonistas de moléculas pequenas de MDM2. **Science**, v. 303, p. 844-848, 2004. DOI: 10.1126/science.1092472.

VOGELSTEIN, B.; LANE, D.; LEVINE, A. Navegando na rede p53. **Nature**, v. 408, p. 307-310, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/35042675>. Acesso em: 21 out. 2022.

VOGT, U. *et al.* P53 gene status in relation to ex vivo chemosensitivity of non-small cell lung cancer. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, v. 128, n. 3, p. 141-147, Mar. 2002. Doi: 10.1007/s00432-001-0305-2.

VYSKOCILOVA, H. E. *et al.* Therapeutic monitoring of amiodarone: pharmacokinetics and evaluation of the relationship between effect and dose/concentration. **Biomed Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.**, v. 161, n. 2, p. 134-143, June 2017. Disponível em: https://biomed.papers.upol.cz/artkey/bio-201702-0003_therapeutic_monitoring_of_amiodarone_pharmacokinetics_and_evaluation_of_the_relationship_between_effect_and_do.php. Acesso em: 05 maio 2024.

WU, X. *et al.* The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. **Genes e Dev.**, v. 7, p. 1126-1132, 1993. DOI: 10.1101/gad.7.7a.1126.

WU, Y. *et al.* Combined detection of the expression of Nm23-H1 and p53 is correlated with survival rates of patients with stage II and III colorectal cancer. **Oncology Letters**, v. 13, n.1, p. 129-136, 2017. Disponível em: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2016.5425?text=abstract>. Acesso em: 05 Set. 2023.

XIONG, G. *et al.* ADMETlab 2.0: an integrated online platform for accurate and comprehensive predictions of ADMET properties. **Nucleic Acids Res.**, v. 49, p. 5-14, July 2021. Doi: 10.1093/nar/gkab255.

YONISH-ROUACH E. A question of life or death: the p53 tumor suppressor gene. **Pathol Biol.**, v. 45, n. 10, p. 815-823, Dec. 1997.

YUAN, S.; CHAN, H. C. S.; HU, Z. Usando PyMOL como plataforma para design computacional de medicamentos. **WIREs Comput. Mol. Sci.**, v. 7, p. 1298, 2017. Disponível em: <https://wires.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/wcms.1298>. Acesso em: 16. mar. 2024.

ZHAO, M. *et al.* Cytochrome P450 enzymes and drug metabolism in humans. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 26, n. 23, p. 12808, Nov. 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34884615/>. Acesso em: 14 maio 2024.

ZOHRABIAN, V. M. *et al.* Gene expression profiling of metastatic brain cancer. **Oncol Rep.**, v. 18, n. 2, p. 321-328, Aug. 2007.