



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**HELEN BRAMBILA JORGE PAREJA**

**ESTUDOS COMPUTACIONAIS PARA A SELEÇÃO DE INIBIDORES  
NATURAIS DA PROTEÍNA p53 MUTADA VISANDO O COMBATE AO  
ADENOCARCINOMA COLORRETAL**

Presidente Prudente- SP  
2022



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**HELEN BRAMBILA JORGE PAREJA**

**ESTUDOS COMPUTACIONAIS PARA A SELEÇÃO DE INIBIDORES  
NATURAIS DA PROTEÍNA p53 MUTADA VISANDO O COMBATE AO  
ADENOCARCINOMA COLORRETAL**

Dissertação apresentado Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador:  
Prof. Dr. Hamilton Mitsugu Ishiki

Presidente Prudente- SP  
2022

### Catálogo na Publicação

616.994  
P227e

Pareja, Helen Brambila Jorge

Estudos computacionais para a seleção de inibidores naturais da proteína p53 mutada visando o combate ao adenocarcinoma colorretal \ Helen Brambila Jorge Pareja ; orientador Hamilton Mitsugu Ishiki. -- Presidente Prudente, 2022.

49 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2022.

Bibliografia.

1. Neoplasias Colorretais. 2. Modelagem molecular. 3. Virtual screening. 4. Compostos naturais. 5. Docking molecular. 6. Enzima p53 mutante. I. Ishiki, Hamilton Mitsugu. II. Título.

HELEN BRAMBILA JORGE PAREJA

ESTUDOS COMPUTACIONAIS PARA A SELEÇÃO DE INIBIDORES  
NATURAIS DA PROTEÍNA p53 MUTADA VISANDO O COMBATE AO  
ADENOCARCINOMA COLORRETAL

Dissertação apresentado Pró-Reitoria de  
Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade  
do Oeste Paulista, como parte dos requisitos  
para obtenção do título de Mestre em  
Ciências da Saúde.

Presidente Prudente, 10 de janeiro de 2022.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Hamilton Mitsugu Ishiki  
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste  
Presidente Prudente - SP

---

Profa. Dra. Luciana Scotti  
Universidade Federal da Paraíba  
João Pessoa - PB

---

Prof. Dr. Edson Assunção Mareco  
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste  
Presidente Prudente – SP

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus que é a base da minha vida, ao meu esposo, Jose Alexandre, que esteve ao meu lado em todas as etapas, me amparando e incentivando, e em especial ao meu pai Tarcísio Calil Jorge (*In memoriam*) que me ensinou a ser forte, determinada e nunca desistir dos meus sonhos.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer algumas pessoas que foram fundamentais nessa trajetória. A Deus, que sem dúvida é minha fortaleza e o motivo de permanecer firme em meus objetivos.

Expresso minha eterna gratidão aos meus pais, principalmente meu pai **Tarcísio Calil Jorge** (*In memoriam*), que sempre foi meu grande incentivador, me ensinando a ser a mulher determinada que sou hoje, ele me ofereceu a base do que sou, e a ele serei eternamente grata.

Agradeço a minha Família, meu esposo **Jose Alexandre Pareja**, que esteve ao meu lado durante todo momento, me dando forças para seguir meus sonhos, e as nossas filhas **Manuela e Mariana**, concebidas durante o percurso da pós graduação, que sempre serão minha força e inspiração para crescer.

Muito obrigada ao **Prof. Dr. Hamilton Mitsugu Ishiki**, meu orientador, na qual sinto enorme admiração e respeito, uma pessoa única, dedicado, inteligente, sensato e que evidentemente ama o que faz, me auxiliando em todos os momentos, sem se opor ao horário do dia ou dia da semana, sempre presente, e o maior responsável pelo trabalho, pois sem sua orientação, paciência, dedicação e carinho, nada disso seria possível.

Minha gratidão a **Profa. Dra. Luciana Scotti** e ao **Prof. Dr Marcus Tullius Scotti**, pela disponibilidade e dedicação, por ter ajudado na análise da dinâmica molecular, tão atenciosamente e prontamente disponíveis, com sua vasta sabedoria e habilidade.

Obrigada em especial ao aluno de graduação, **Adriano Junqueira de Moraes**, pela sua colaboração essencial e dedicação a esse trabalho.

Obrigada ao programa de **Pós graduação em ciências da Saúde**, da Universidade do Oeste Paulista, pelo apoio e incentivo educacional.

Meu muito obrigada a secretária do programa de pós graduação, **Ina Lima**, pela disponibilidade, atenção e informações tão atenciosamente prestadas durante todo o curso.

Obrigada a todas as pessoas que durante esses anos de mestrado, contribuíram para sua finalização, de forma direta ou indireta, fazendo parte desse sonho, hoje concretizado.

## LISTA DE SIGLAS

|                 |  |
|-----------------|--|
| 2D              | Bidimensional  |
| 3D              | Tridimensional   |
| Å               | Angstrom   |
| ANK             | Ankyrin  |
| AKT1            | Theorine Protein Kinase                                  |
| ATM             | Pressão atmosférica                                      |
| Cl <sup>-</sup> | Ânion Cloreto  |
| CCR             | Câncer colorretal  |
| C $\alpha$      | Carbono alfa   |
| C-SRC           | Protein tyrosine Kinase Protooncogenesis                 |
| Clog P          | Coefficiente de partição água/octanol                    |
| DNA             | Ácido desoxirribonucleico                                |
| EGFR            | Epidermal growth factor receptor                         |
| GOF             | Ganho de função  |
| HDACi           | Histona desacetilase                                     |
| HSp90           | Heat Shock Protein 90                                    |
| KCAL            | Quilocaloria   |
| KJ              | Quilojoule   |
| LBDD            | Ligand Based Drug Design                                 |
| MD              | Dinâmica Molecular                                       |
| Na <sup>+</sup> | Cátion Sódio   |
| NM              | Nanômetro  |
| NPT             | Partículas numéricas constantes de pressão e temperatura |
| NVT             | Número constante de partículas, volume e temperatura     |
| p53             | Proteína p53   |
| PDB             | Protein Data Bank  |
| PDGFR           | Platelet derived growth fator receptor                   |
| PI3K            | Fosfoinositida 3-quinase                                 |
| RMN             | Ressonância Magnética Nuclear                            |
| RMSD            | Deslocamento médio da raiz quadrada                      |
| RMSF            | Flutuações médias da raiz quadrada                       |
| ROS             | Espécies reativas de oxigênio                            |
| SPC             | Single Point Charge                                      |

|         |  |
|---------|--|
| SBDD    | Desenvolvimento de Drogas Baseada na Estrutura (Structure Based Drug Design) |
| TNKS1   | Tankyrase  |
| VPA     | Ácido Valpróico  |
| VEGFR-2 | Vascular endotelial growth factor receptor - 2                               |



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Fragmento do ligante 6,7-diidro[1,4]dioxino[2,3-f][1,3]benzotiazol-2-amina utilizado nas buscas por análogos, no banco de dados do SISTEMAT-X.....17
- Figura 2 - Ilustração da sobreposição entre a proteína p53 selvagem (Código PDB:1T4W) e a proteína p53 mutante Y220C (Código PDB:2X0U). .19
- Figura 3 - Seleção de composto no banco de dados do SISTEMAT-X, utilizando fragmento do ligante 6,7-diidro[1,4]dioxino[2,3-f][1,3]benzotiazol-2-amina para a busca por análogos, identificado 216 compostos, esses foram submetidos a regra dos cinco, e isolados 127 .....22
- Figura 4 - Posição do ligante 6,7-diidro[1,4]dioxino[2,3-f][1,3]benzotiazol-2-amina extraído da estrutura de raio-X sobreposto com o resultado do re-docking.....22
- Figura 5 - Fórmula estrutural dos 20 compostos que apresentaram as melhores energias de ligação com a enzima p53 mutante, selecionados através dos estudos de docking molecular. ....25
- Figura 6 - Fórmulas estruturais da baicaleína e da nobiletina. ....27
- Figura 7 - Conformação do composto 128, em azul, resultante do docking molecular, e do composto 6,7-diidro[1,4]dioxino[2,3-f][1,3]benzotiazol-2-amina, em marrom, obtida experimentalmente (PDB=2X0U). ....28
- Figura 8 - RMSD dos átomos de C $\alpha$  da proteína p53, os compostos investigados e o inibidor do PDB. ....30
- Figura 9 - RMSD dos átomos de C $\alpha$  dos compostos investigados complexados à proteína P53.....32
- Figura 10 - RMSF dos átomos de C $\alpha$  da proteína P53 complexados aos compostos investigados e o inibidor PDB.....34
- Figura 11 - Simulações de dinâmica molecular durante 1000ps e interações 2D em diferentes tempos. A – Estrutura do complexo P53-composto 1 e seu sítio ativo, e interações 2D e 3D em B – 200ps, C – 600ps e D – 1000ps. Em verde estão destacadas ligações de hidrogênio, rosa representam interações hidrofóbicas e verde claro ligações de van der Waals. ....37
- Figura 12 - Simulações de dinâmica molecular durante 1000ps e interações 2D em diferentes tempos. A – Estrutura do complexo P53-composto 128 e seu sítio ativo, e interações 2D e 3D em B – 200ps, C – 600ps e D – 1000ps. Em verde estão destacadas ligações de hidrogênio, rosa representam interações hidrofóbicas e verde claro interações de van der Waals...38

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Aminoácidos do sítio ativo envolvidos na interação com os compostos ancorados e valores das respectivas energias de interação (kcal/mol).

.....24

Tabela 2 - Valores das energias de ligação ( $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) calculadas através do docking molecular para as 8 enzimas (PDGFR, VEGFR2, C-SRC, HSP90, Phosphoinositide 3-kinase, AKT1, Tankyrase e EGFR ) e o ligante específico de cada enzima, o ligante da p53 mutante, a molécula 1 e a molécula 128.....40

## SUMÁRIO

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO</b> .....  | <b>13</b> |
| 1.1      | Ação da p53 no CCR.....  | 14        |
| 1.2      | Ferramentas computacionais .....   | 15        |
| <b>2</b> | <b>METODOLOGIA</b> .....   | <b>17</b> |
| 2.1      | Busca por ligantes .....   | 17        |
| 2.2      | Preparo da proteína .....  | 18        |
| 2.3      | Docking Molecular .....  | 19        |
| 2.4      | Simulações de dinâmica molecular .....   | 20        |
| <b>3</b> | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....  | <b>21</b> |
| 3.1      | Busca virtual .....  | 21        |
| 3.2      | Resultados do docking .....  | 22        |
| 3.3      | Análise da dinâmica molecular.....   | 29        |
| 3.4      | Análise do docking molecular para outras enzimas relacionadas ao<br>combate do câncer com os compostos 1, 128 e a<br>6,7-diidro[1,4]dioxino[2,3-f][1,3]benzotiazol-2-amina ..... | 39        |
| 3.4.1    | Receptor do fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGFR) .....  | 41        |
| 3.4.2    | Receptor do fator de crescimento vascular endotelial - 2 (VEGFR-2) .....   | 42        |
| 3.4.3    | Protooncogênese da proteína tirosina quinase (C-SRC) .....   | 42        |
| 3.4.4    | Proteína de choque térmico 90 (HSp90).....   | 43        |
| 3.4.5    | Fosfoinositida 3-quinase (PI3K).....   | 43        |
| 3.4.6    | Proteína quinase serina/treonina (AKT1).....   | 44        |
| 3.4.7    | Tankyrase (TNKS1).....   | 44        |
| 3.4.8    | Receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) .....   | 45        |
| <b>4</b> | <b>CONCLUSÃO</b> .....   | <b>46</b> |
|          | <b>REFERÊNCIAS</b> .....   | <b>48</b> |
|          | <b>ANEXO - Normas para a publicação na revista “Current Computer-<br/>Aided Drug Design”</b> .....   | <b>55</b> |

## RESUMO

### **Estudos computacionais para a seleção de inibidores naturais da proteína p53 mutada visando o combate ao adenocarcinoma colorretal**

**Antecedentes:** O câncer colorretal atinge cerca de 1.8 milhões de novos casos no mundo e os tratamentos convencionais frequentemente apresentam resistências. São diversos os fatores relacionados aos insucessos no tratamento, dentre o qual a mutação da enzima p53, envolvida em 50% dos casos, ocasionando a perda de sua funcionalidade como supressora tumoral.

**Objetivo:** este trabalho teve o intuito de pesquisar novos inibidores para a p53 mutante.

**Metodologia:** As metodologias de modelagem molecular que foram empregadas: i) a busca virtual no banco de dados Sistem-X ii) o acoplamento molecular para avaliar a energia de interação entre os compostos encontrados e a enzima.

**Resultados:** A busca virtual utilizando fragmentos da 6,7-diidro[1,4]dioxino[2,3-f][1,3]benzotiazol-2-amina como molde, resultou em 216 compostos análogos que foram submetidos ao teste de Lipink's, sendo aprovados 127 compostos. Estes foram ancorados com a p53 mutante com o emprego do programa iGEMDOCK e os 20 melhores resultados, com as melhores energias de ligação, foram submetidos aos cálculos de dinâmica molecular. Os resultados indicaram que as moléculas possuem boa capacidade de ligação, sendo que os ligantes 1 e 128 apresentaram maior estabilidade nas ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e de van der Waals. A posição dos compostos derivados de flavonóides interagem similarmente ao anel tiazol do 6,7-diidro[1,4]dioxino[2,3-f][1,3]benzotiazol-2-amina.

**Conclusão:** As energias do docking e os estudos de dinâmica indicaram que os compostos encontrados através da busca virtual podem se ligar ao sítio ativo da p53 mutante, bem como à outras enzimas envolvidas em processos carcinogênicos, conseqüentemente, podendo ser potenciais inibidores do CCR.

Palavras-chave: câncer colorretal, modelagem molecular, virtual screening, docking, compostos naturais, docking molecular, enzima p53 mutante

## ABSTRACT

### **Computational studies for the selections of natural inhibitors of mutated p53 protein aiming to combat colorretal adenocarcinoma**

**Background:** Colorectal cancer new cases affects about 1.8 million worldwide and the conventional treatments are often resistant. There are several factors related to treatment failures, including the mutation of p53 enzyme, that is involved in 50% of cases, causing the loss of its functionality as a tumor suppressor.

**Objectives:** this work aimed to search new inhibitors for the mutant p53.

**Methods:** The molecular modeling methodology were employed: i) the virtual screening in Sistem-X database, ii) the molecular docking to calculate the interaction energy between the compounds found and the enzyme.

**Results:** The virtual screening using 6,7-dihydro[1,4]dioxino[2,3-f][1,3]benzothiazol-2-amine fragments as a template, resulted in 216 analogous compounds that were submitted to Lipink's rule, and 127 compounds were approved. These compounds were docked with the mutant p53 using the iGEMDOCK program and the 20 best results, with the best binding energies, were submitted to molecular dynamics. The results indicated that the molecules have a good binding capacity, the molecules 1 and 128 showed the greater stability in hydrogen bonds, hydrophobic and van der Waals interactions. The flavonoids-derived compounds position interacts similarly to the thiazole ring of 6,7-dihydro[1,4]dioxino[2,3-f][1,3]benzothiazol-2-amine.

**Conclusion:** The docking energies and the dynamics studies indicated that the compounds found through the virtual search can bind to the active site of the mutant p53, as well as to other enzymes involved in carcinogenic processes, consequently, being potential CCR inhibitors.

**Keywords:** colorectal cancer, molecular modeling, virtual screening, docking, natural compounds, docking molecular, mutation p53 enzyme

Identification of natural compounds with potential p53 inhibitory activity against colon adenocarcinoma employing virtual screening, molecular docking, and molecular dynamics simulation.

Helen Brambila Jorge Pareja<sup>1</sup>; Adriano Junqueira de Moraes<sup>2</sup>; Luciana Scotti, Marcus Tullius Scotti<sup>3</sup>, Hamilton Mitsugu Ishiki<sup>1</sup>

✉ Hamilton Mitsugu Ishiki  
hamilton@unoeste.br

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde – Universidade do Oeste Paulista/UNOESTE – Presidente Prudente, SP, Brasil  
hamilton@unoeste.br.

<sup>2</sup>Faculdade de Ciências da Saúde – Universidade do Oeste Paulista/UNOESTE – Presidente Prudente, SP, Brasil. 0000-0002-4619-095X

<sup>3</sup>Universidade Federal da Paraíba

O trabalho está apresentado sobre a forma de artigo, segundo as normas do periódico Current Computer-Aided Drug Design (Qualis B2 - Medicina II)

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer colorretal (CCR) pertence a um grupo de mais de 200 doenças neoplásicas, causadas por diversas cascatas de sinalização celular desreguladas, e é um dos principais problemas de saúde pública mundial [1]. Está entre as quatro principais causas de morte no mundo, sendo o CCR a terceira neoplasia mais frequente, com cerca de 1,8 milhões de novos casos e 0,88 milhões de óbitos anualmente [2,3]. No Brasil, o CCR é a segunda neoplasia mais frequente entre as mulheres e a terceira entre os homens, desconsiderando o câncer de pele não-melanoma. Estima-se que entre 2020-2022, surjam 40.990 novos casos, sendo 20.520 ocorrendo em homens e 20.470 ocorrendo em mulheres e o total de óbitos por ano pode chegar a 20.578 [4]

Os tratamentos convencionais para o CCR incluem cirurgia, quimioterapia e radioterapia. Dependendo da localização e da progressão da doença, esses tratamentos podem ser utilizados de modo isolado ou em conjunto [5]. O tratamento cirúrgico isolado, muitas vezes não é possível e cerca de 66 e 61% dos pacientes nos estágios II e III do cólon e reto, respectivamente, são submetidos a tratamentos adicionais com quimioterapia e/ou radioterapia adjuvante e/ou neoadjuvante [6]. Entretanto, esses tratamentos têm muitos efeitos colaterais devido à sua inespecificidade e citotoxicidade para quaisquer células que estão crescendo e se dividindo, além da resistência aos fármacos que estão cada vez mais frequentes [7,8].

A apoptose e a autofagia são dois eventos regulatórios que podem levar à morte de células cancerígenas. Uma das ações da quimioterapia, por exemplo, é promover a apoptose por meio da indução do gene supressor do tumor. [9] No entanto, as células cancerígenas frequentemente neutralizam esses processos e acabam se tornando resistentes aos medicamentos, sendo um dos principais motivos para a recidiva da doença, o que representa um desafio no regime de tratamento do câncer, e pauta de diversas pesquisas, com terapias distintas que visam menor resistência e maior tolerância, como a terapia *in situ* ou fotodinâmica [10,11]; que em casos indicados, associados ao tratamento radioterápico, na tentativa de extinguir a doença, diminui a recidiva. Nkune e

colaboradores em 2021, constataram que a radioterapia potencializou o efeito contra a proliferação, pro-apoptótico e dano ao DNA [12].

Devido à alta incidência do CCR, e sua morbi-mortalidade expressiva, a busca tem se tornado frenética por terapias eficazes, com alta tolerância e baixa resistência; com avanço da biologia molecular tornou-se possível aumentar a especificidade aos tratamentos, usando alvos genéticos com maior incidência nas mutações genômicas que relacionam ao CCR; com foco na pesquisa da p53 mutante, devido ao papel fundamental que ela exerce sobre essa doença, sendo responsável por aumentar a resistência terapêutica, uma vez que ela sofre mutação em 50% dessa neoplasia, com perda de funcionalidade [13,14]; além de sua ação direta, também pode ocasionar, que os reguladores da p53, como a caspase-9 e seu cofator, o fator 1 de ativação da protease apoptótica, podem ser inativados, gerando a resistência aos medicamentos atualmente utilizados [15].

### 1.1 Ação da p53 no CCR

A proteína p53 é considerada um fator de transcrição supressor de tumor, que sob estresse, particularmente estímulos indutores de dano ao DNA, fica estabilizada por modificações pós-tradução, principalmente por meio da fosforilação de resíduos da serina e treonina [16]. Uma vez ativada, a p53 se liga aos elementos do DNA levando a regulação seletiva da expressão transcricional, exercendo papel fundamental na supressão tumoral, por ação direta em uma série de processos celulares tais como: apoptose, parada do ciclo celular, reparo do DNA, supervisão da plasticidade celular, auto renovação, diferenciação, e outros eventos fundamentais para correção do processo carcinogênico [17]. Através de suas funções, a p53 garante a replicação adequada e mantém a estabilidade genômica, prevenindo deste modo a evolução tumoral [18,19].

Mutações da proteína p53 que estão relacionadas ao câncer, podem levar à perda de sua função como supressora do tumor e, adicionalmente, é relatado adquirir uma função denominada ganho de função (GOF) que enriquece a p53 mutante com propriedades oncogênicas que promovem a carcinogênese. Com



o GOF, a p53 mutante além de ser dominada por suas propriedades pró-oncogênicas também facilita a resistência aos medicamentos [20,21].

A mutação se desenvolve pela substituição de apenas um aminoácido, sendo que em aproximadamente 30% dos casos estão envolvidos 6 resíduos de aminoácidos “hotspot” dentro do domínio de ligação ao DNA (Arg175, Gly245, Arg248, Arg249, Arg273 e Arg282), mas pode acontecer em qualquer um dos códons da cadeia [21]. Os domínios da ligação com o DNA, são caracterizados de duas formas, de contato ou conformacional; sendo que esta última ocorre nos aminoácidos Arg175, Gly245, Arg248 e Arg249, e gera uma mudança drástica na estrutura da proteína p53. As de contato (Arg273 e Arg282) ocorrem nos resíduos de aminoácidos que fazem contato direto com o alvo (p53) prejudicando a transcrição [22]. Devido a estas mutações, ocorre a perda na função supressora tumoral na p53 do tipo selvagem, fortalece as células tumorais, aumento da quimiorresistência, invasão, metástase, angiogênese, instabilidade genômica, resistência e morte celular, evitando assim a destruição da célula tumoral. A proteína p53 mutante só fica estabilizada na célula cancerosa, pois a mantém estável e acumulada [23].

A p53 mutante também pode promover a diferenciação das células somáticas em células tronco cancerosas; que possuem ação de auto renovação e diferenciação, gerando uma célula heterogênea [17]. A inibição da p53 mutante desempenha um papel fundamental na supressão tumoral, uma vez que mais da metade dos pacientes com CCR são portadores dessa anomalia genômica. Sua mutação não gera apenas a perda de função da p53, como guardião do genoma, mas potencializa a tumorigênese, o chamado ganho de função, e a proteína p53 mutante acumula de tal forma, que contribui para progressão e agressão tumoral. Deste modo, a inibição da p53 mutante tornou-se alvo na terapia contra o CCR, pois tem-se mostrado um tratamento promissor, com melhores resultados e menor resistência, tanto na terapia medicamentosa única, como associada a outros inibidores quimioterápicos [23].

## 1.2 Ferramentas Computacionais:

As técnicas de modelagem molecular auxiliam no desenvolvimento de novas drogas utilizando basicamente duas abordagens diferentes, o projeto de

fármaco baseado em ligante (Ligand Based Drug Design - LBDD) e o projeto de fármaco baseado em estrutura (Structure Based Drug Design - SBDD). Os métodos de SBDD se baseiam no conhecimento do arranjo topológico de alvos biológicos, logo, utilizam como pré-requisito dados tridimensionais detalhados da macromolécula em estudo. Essa informação pode ser obtida mediante a análise de estruturas cristalográficas, de RMN ou de modelagem por homologia. Adicionalmente, a ferramenta computacional permite avaliar a química dos elementos em relação ao arranjo espacial, a natureza eletrônica dos átomos do ligante e a interação entre eles, caracterizando deste modo a dinâmica, as energias e as estruturas das interações [24].

O método de *docking* (ancoragem) molecular, idealizado desde 1970, é uma das principais estratégias de SBDD e possui como objetivo prever o modo de ligação e a afinidade das moléculas, denominadas ligantes, dentro de um sítio ativo, localizado em um receptor de interesse (proteína/enzima), denominado alvo [25].

Quando exposto na biblioteca de compostos (*virtual screening*), o método deve ser capaz de distinguir as moléculas que se ligariam ao receptor e classificar os ligantes com maior afinidade. Para tanto existem os algoritmos de busca conformacional, utilizados para explorar o perfil de energia livre e encontrar o melhor modo de ligação do ligante com o sítio ativo do receptor, e a função de pontuação "score" de energia que avalia a qualidade desta ligação e seleciona as conformações mais relevantes [26]. Os resultados das conformações tridimensionais (3D) do local do ligante, geralmente em uma proteína, é determinada por difração de raios-X. Conhecer o sítio de ligação antes do docking, aumenta significativamente a sua eficiência [25,26].

O iGEMDOCK é uma ferramenta, que cria um ambiente de seleção virtual a partir de preparações realizadas através de uma análise pós-triagem utilizando-se de interações farmacológicas [27]. Ele age em três fases: fornece interfaces para preparar o local de ligação da proteína alvo e a biblioteca de ligantes; em seguida, os ligantes da biblioteca são ancorados no possível sítio de ligação, usando a ferramenta de acoplamento iGEMDOCK, e por fim gera perfis de interação proteína-ligante de caráter eletrostáticos, de ligação de hidrogênio e de van der Waals. Com base nesses perfis e estruturas dos ligantes, o iGEMDOCK infere as interações farmacológicas e agrupa os ligantes para a

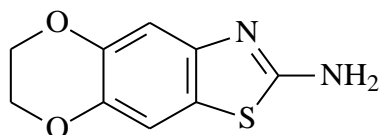
análise pós-triagem. O iGEMDOCK classifica e visualiza os ligantes combinando as interações farmacológicas e a função de pontuação, baseado em sua energia [26].

## 2. METODOLOGIA

### 2.1. Busca por ligantes

A primeira etapa do trabalho foi a busca virtual realizada no banco de dados do SISTEMAT-X, por inibidores provenientes de produtos naturais que sejam análogos ao fragmento do 6,7-diidro[1,4]dioxino[2,3-f][1,3]benzotiazol-2-amina, representado na figura 1. Este composto é o inibidor que está complexado com a estrutura da p53 mutante, retirada do Protein Data Bank (PDB) e utilizada nos estudos de ancoragem. Essa semelhança é fundamental, pois supõe que os compostos encontrados serão capazes de atuar no mesmo sítio ativo da p53 mutante, e desta forma inibi-la [25,26].

Figura 1 - Fragmento do ligante 6,7-diidro[1,4]dioxino[2,3-f][1,3]benzotiazol-2-amina utilizado nas buscas por análogos, no banco de dados do SISTEMAT-X.



Fonte: O Autor (2021).

O banco de dados do SISTEMAT-X foi acessado através do endereço eletrônico: <https://sistemax.ufpb.br> [25]. A estrutura indicada na figura 1 foi desenhada e foi realizada uma busca por similaridade, com um índice de 0.4.

Considerando que as propriedades farmacocinéticas são uma das principais razões para que se encerre o desenvolvimento de candidatos a novos fármacos [29], após a etapa do *virtual screening* foram verificados se os compostos seguem a regra de Lipinski. Essa regra estima se o composto em estudo irá apresentar propriedade de fármaco, reduzindo assim o número de compostos com propriedades indesejadas. As propriedades moleculares relevantes, são múltiplos de cinco, tais como: cinco doadores de ligação de

hidrogênio, mais que 10 receptores de ligação de hidrogênio, peso molecular maior do que 500 daltons, log P e Clog P maior do que 5 (esses dois últimos determinam se os compostos podem atravessar a membrana celular) [30]. Os cálculos foram realizados com o emprego do programa swissADME [31].

Em seguida, os compostos aprovados pela regra de Lipinski tiveram as suas cargas atômicas calculadas através do programa UCSF Chimera versão 1.14 [32], e foram submetidos ao estudo de docking, utilizando o programa iGEMDOCK, para estimar os valores da energia de ligação entre a enzima e os ligantes encontrados, realizando no final um ranking [26,27].

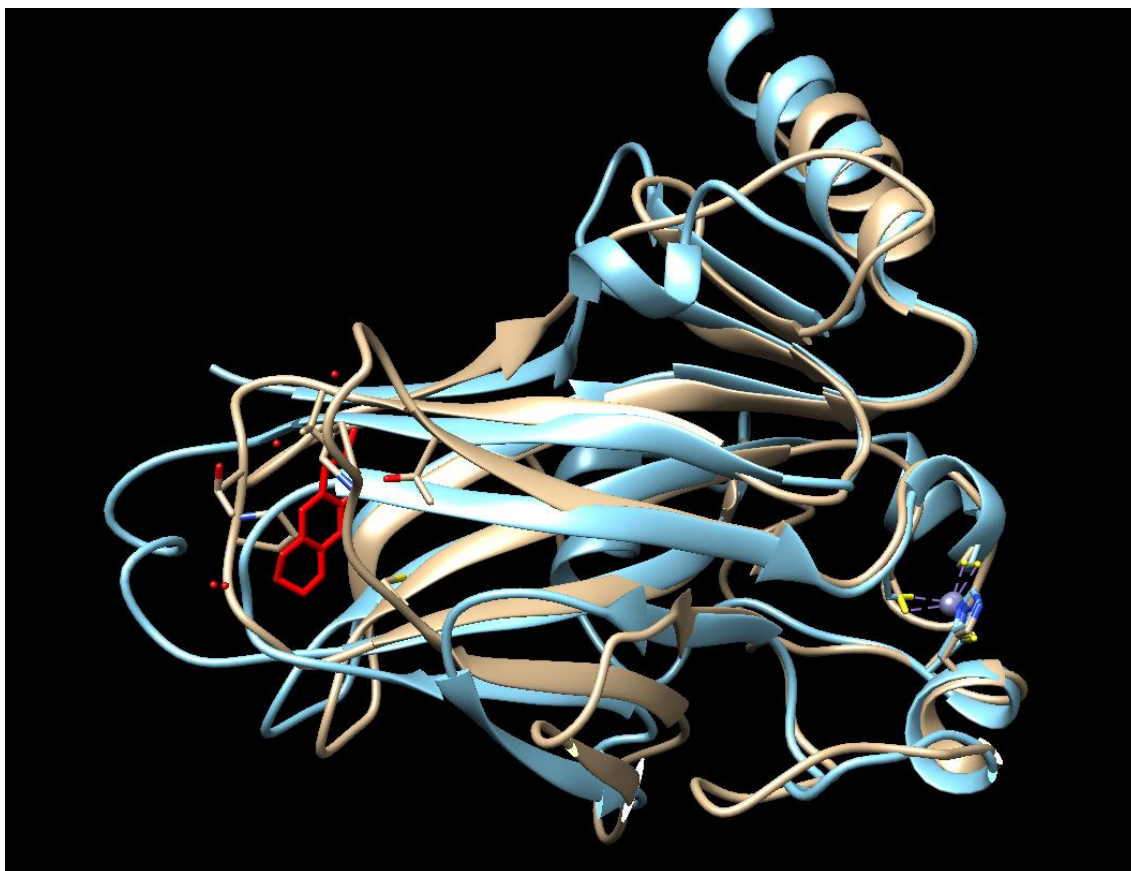
## 2.2 Preparo da proteína

A estrutura tridimensional da proteína p53 mutante, Y220C, Figura 2, em azul, utilizada como receptor, foi extraída do Protein Data Bank (PDB) sob o código 2X0U [33]. Esta proteína está complexada como o composto 6,7-diidro[1,4]dioxino[2,3-f][1,3]benzotiazol-2-amina, em vermelho, e foi obtida com uma resolução de 1.60Å.

A Figura 2 ilustra a sobreposição entre a proteína p53 selvagem (Código PDB:1T4W) e a proteína mutante Y220C. Como pode ser observado, de modo geral, apenas a região que envolve o sítio de ligação da 6,7-diidro[1,4]dioxino[2,3-f][1,3]benzotiazol-2-amina possui modificações conformacionais significativas. Estas modificações podem explicar o motivo pelo qual os compostos que inibem a p53 mutada, não devem possuir nenhuma, ou pouca influência sobre a p53 selvagem [34].

Com o auxílio do programa UCSF Chimera versão 1.14 as moléculas de água foram retiradas, os átomos de hidrogênio foram adicionados e as cargas atômicas foram calculadas [32].

Figura 2 - Ilustração da sobreposição entre a proteína p53 selvagem (Código PDB:1T4W) e a proteína p53 mutante Y220C (Código PDB:2X0U).



Fonte: O autor (2021).

Antes de iniciar o estudo com as moléculas encontradas no banco de dados de produtos naturais, o composto 6,7-diidro[1,4]dioxino[2,3-f][1,3]benzotiazol-2-amina foi submetido ao re-dock para verificar a capacidade do programa em realizar os cálculos de ancoragem para esta classe de compostos e para esta enzima. Nesta etapa, o ligante que foi cristalizado com a proteína p53 mutante (PDB=2X0U) foi removido e a sua posição de interação calculada novamente através do programa iGEMDOCK [26].

### 2.3 Docking Molecular

Os estudos de ancoragem molecular (docking) entre os ligantes encontrados na literatura e a proteína P53 mutante, foram realizados com o emprego do programa iGEMDOCK. Este programa é uma ferramenta integrada

que cria um ambiente de seleção virtual a partir de preparações realizadas através de uma análise pós-triagem utilizando-se de interações farmacológicas [26].

Primeiramente o programa fornece interfaces interativas para preparar o local de ligação da proteína alvo e a biblioteca de ligantes. Em seguida, cada ligante da biblioteca é ancorado no local de ligação usando a ferramenta de acoplamento iGEMDOCK. Posteriormente, o iGEMDOCK gera perfis de interação proteína-ligante, sendo essas interações de caráter: eletrostáticos, de ligação de hidrogênio e de van der Waals. Com base nesses perfis e estruturas dos ligantes, o iGEMDOCK infere as interações farmacológicas e agrupa os ligantes para a análise pós-triagem. Finalmente, o iGEMDOCK classifica e visualiza os ligantes combinando as interações farmacológicas e a função de pontuação (score), baseada em energia que foram calculadas através do iGEMDOCK [26,27].

#### 2.4 Simulações de dinâmica molecular

As simulações de dinâmica molecular (DM) foram realizadas para estimar a flexibilidade das interações entre a proteína p53 mutante e os compostos investigados usando o software GROMACS 5.0 [35,36]. Além disso, foi possível verificar o comportamento dos ligantes no sítio ativo das proteínas estudadas e analisar as interações que foram perdidas e formadas durante a dinâmica. A topologia foi preparada usando o campo de força GROMOS96. A simulação da dinâmica molecular foi realizada usando o modelo de água SPC de carga pontual estendida em uma caixa cúbica [37,38].

O sistema foi neutralizado pela adição de íons ( $\text{Cl}^-$  e  $\text{Na}^+$ ) e minimizado para remover maus contatos entre moléculas complexas e solvente. O sistema também foi balanceado em 300K usando o algoritmo V-rescale em 100 ps representado por NVT (número constante de partículas, volume e temperatura), seguido por equilíbrio a 1 atm de pressão usando o algoritmo Parrinello-Rahman como NPT (partículas numéricas constantes pressão e temperatura) até 100 ps.

As simulações de DM foram realizadas em 5.000.000 etapas a 10 ns. Para determinar a flexibilidade da estrutura e se o complexo é estável perto da

estrutura experimental, o deslocamento médio da raiz quadrada (RMSD) de todos os átomos de C $\alpha$  foi calculado em relação às estruturas de partida. Flutuações média da raiz quadrada (RMSF) também foram analisadas para entender o papel dos resíduos próximos ao local de ligação do receptor. Os gráficos de RMSD e RMSF foram gerados com o emprego do software Grace (<http://plasma-gate.weizmann.ac.il/Grace/>) e a proteína e os ligantes foram visualizados no UCSF Chimera [35,39].

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O CCR é a neoplasia com impacto mundial, e a p53 mutante é uma das principais proteínas de combate, presente em 50% dos pacientes com esse tumor. Diversas pesquisas são realizadas com foco nesse guardião, para impedir a sua inativação e assim fornecer o tratamento e a cura para os pacientes que tem o CCR [8,9]. Entretanto, a melhor forma de diminuir a incidência é prevenir, e com abordagens que possam ser acessíveis à toda população. Deste modo, o consumo de compostos naturais que tenham a ação de inibir a mutação do p53 ou que possam combater a proteína mutante, e evitar o desenvolvimento da doença, parece ser uma boa estratégia.

#### 3.1 Busca virtual

O SISTEMAT-X é um banco de dados que possui mais de 3000 sesquiterpenos lactonizados da família *Asteraceae* e alcalóides de *Apocynaceae* e a busca utilizando o fragmento indicado na figura 1 resultou em 216 compostos com estruturas análogas. Em seguida, todos os compostos encontrados foram submetidos a uma análise para verificar se estavam de acordo com a regra dos 5, de Lipinski através do programa SwissADME [25,30]. Do total, 127 compostos foram aprovados. A figura 3 ilustra resumidamente a sistemática da busca pelos análogos do fragmento da p53 mutada.

Figura 3 - Seleção de composto no banco de dados do SISTEMAT-X, utilizando fragmento do ligante 6,7-diidro[1,4]dioxino[2,3-f][1,3]benzotiazol-2-amina para a busca por análogos, identificado 216 compostos, esses foram submetidos a regra dos cinco, e isolados 127

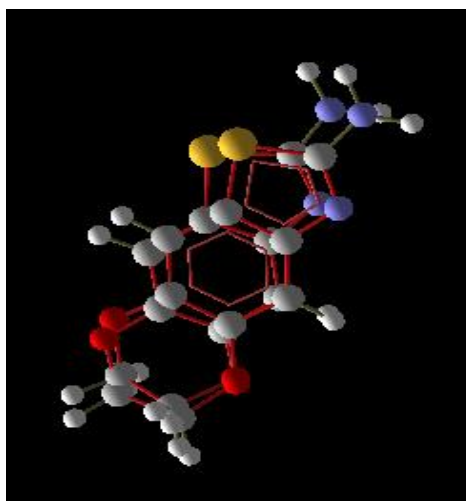


Fonte: O Autor (2021).

### 3.2 Resultados do docking

Antes de se realizar o estudo de ancoragem foi efetuado o procedimento de re-dock, onde o ligante originalmente complexado com a p53 mutante foi extraído, e ancorado novamente com a mesma proteína, com o emprego do programa iGEMDOCK. O resultado esperado é de que a posição obtida através dos cálculos seja idêntica a posição do cristal, obtido experimentalmente, podendo apresentar um desvio máximo (RMSD = root mean square deviation) de até 2 a 3 Å [26,40]. Em nosso estudo foi constatado um RMSD = 0,59 Å, cujas posições da estrutura de raio-X e do docking sobrepostas estão apresentadas na figura 4. Este resultado indica que os compostos análogos a este ligante podem ser estudados através deste programa.

Figura 4 - Posição do ligante 6,7-diidro[1,4]dioxino[2,3-f][1,3]benzotiazol-2-amina extraído da estrutura de raio-X sobreposto com o resultado do re-docking.



Fonte: O Autor (2021).



Os compostos avaliados e aprovados através da regra dos 5 de Lipinski foram submetidos ao processo de *docking* contra a proteína p53 mutante com a utilização do programa iGEMDOCK [41,30].

No caso do *docking* molecular, as possíveis moléculas bioativas foram testadas para um determinado alvo molecular a fim de estabelecer qual, ou quais, delas apresentam melhor acomodação ao sítio ativo do alvo [26]. Neste trabalho utilizamos os 127 compostos encontrados no banco de dados, selecionados pela regra de Lipinski [30], e realizamos o *docking* de cada um deles, sendo que todos os compostos apresentaram boa interação com o sítio ativo da p53 mutante, com potencial para inibi-la, com maior ou menor valores de energia de interação. Os resultados obtidos nos ensaios computacionais são dados em termos da energia de ligação necessária para que a provável molécula bioativa se ligue ao sítio ativo do alvo molecular selecionado. A estabilidade do complexo receptor-ligante pode ser traduzida em níveis de energia livre – que se refere à quantidade de energia disponível para a realização de trabalho cinético pelo composto, quanto menor a energia de ligação, mais estável será o complexo, pois menor será a quantidade de energia disponível para a realização de trabalho cinético [41,42]. Pressuposto desse conceito, observamos que após realizado o *docking*, dos 127 ligantes, apenas os ligantes que se acoplaram ao sítio ativo da proteína p53 mutante, baseado no composto da cristalografia, foram os que apresentaram os melhores valores para a energia de interação com a proteína. Desses compostos foram selecionados apenas os 20 que apresentaram as menores energia de ligação, ou seja, maior estabilidade do complexo receptor-ligante e dessa forma melhor capacidade para inibir a proteína p53 mutada.

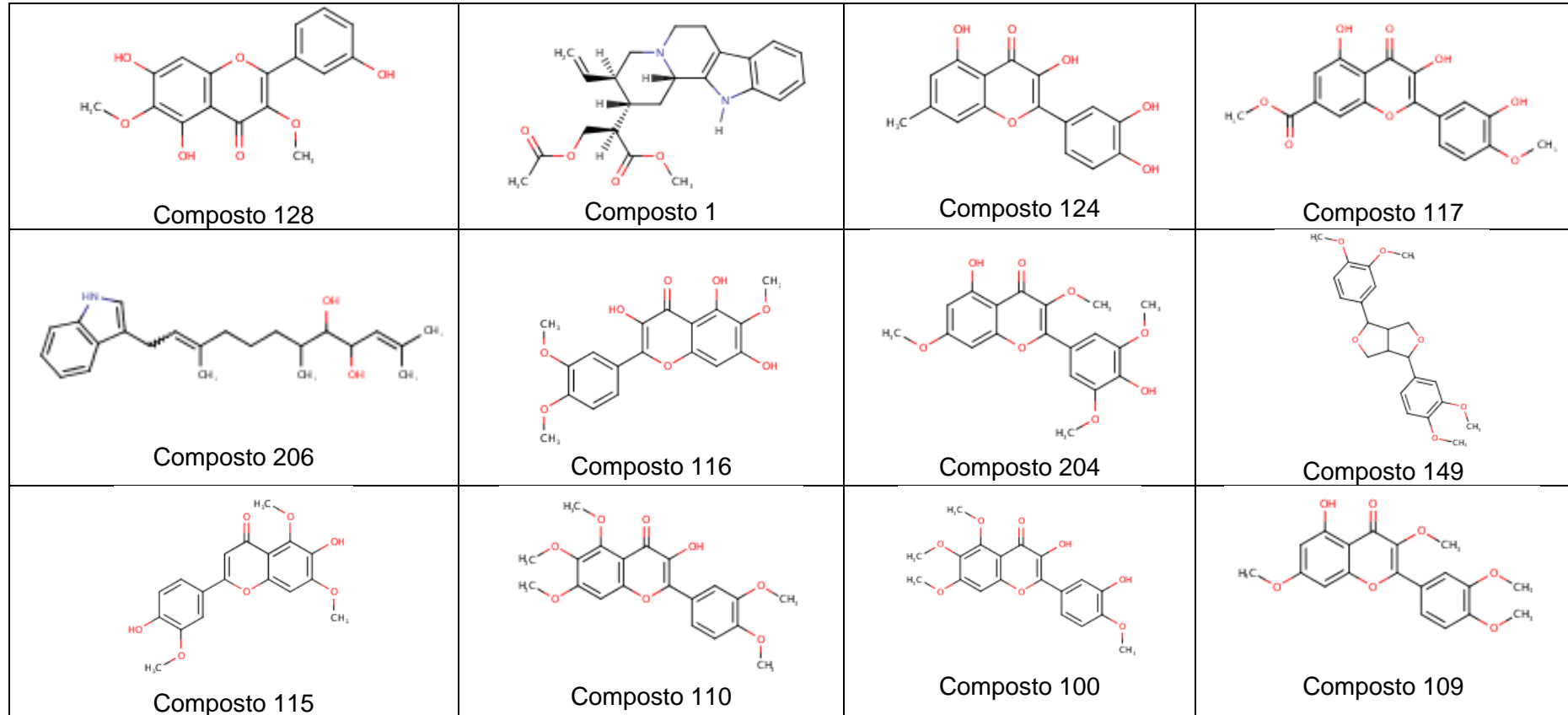
A Tabela 1 apresenta os 20 ligantes com as melhores energias calculadas através das análises de *docking* e os respectivos valores das energias, em kJ/mol. Dentre os resultados obtidos, o composto 128 (5-hidroxi-7-(hidroximetil)-3,6-dimetoxi-2-(3-metoxifenil)-4H-croman-4-ona) foi o que apresentou a melhor energia, desta forma apresenta a maior estabilidade do complexo, e maior potencial para inibir a proteína estudada. Os demais compostos também apresentam energia de ligação satisfatória, e serão discutidos durante o trabalho. As fórmulas estruturais dos compostos apresentados na Tabela 1 estão representadas na Figura 5.

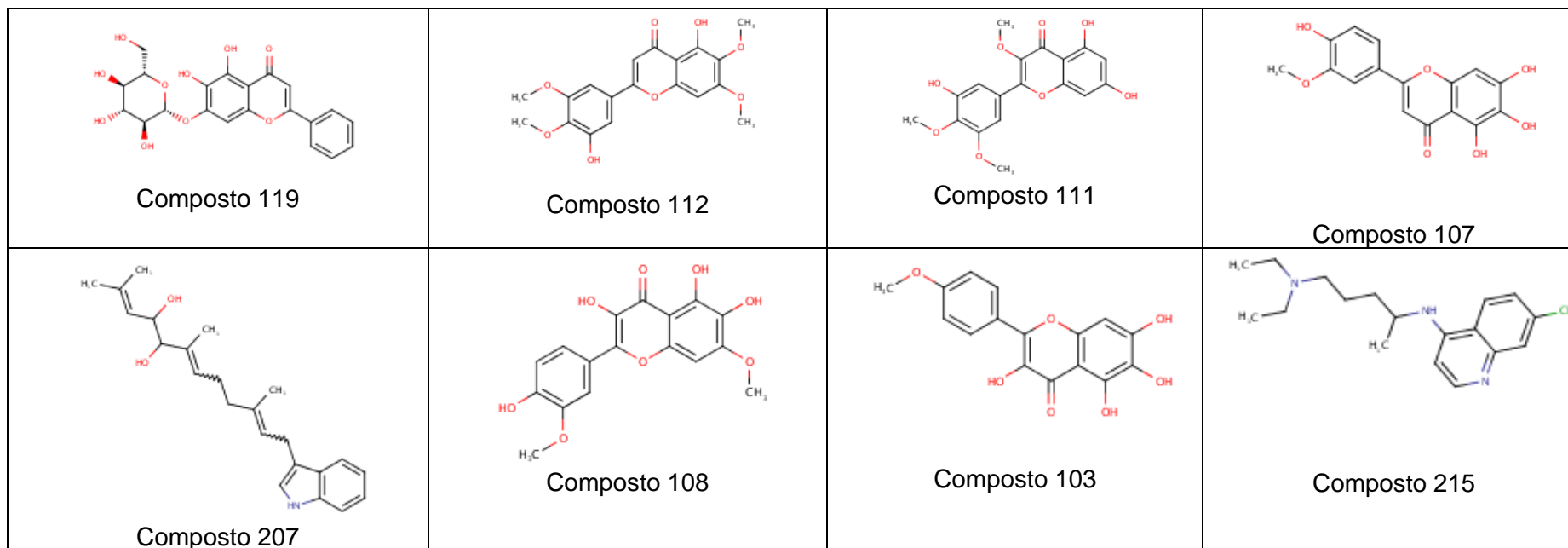
Tabela 1 - Aminoácidos do sítio ativo envolvidos na interação com os compostos ancorados e valores das respectivas energias de interação (kcal/mol).

| Composto | Energia (kcal/mol) | H-M Leu145 | V-M Leu145 | V-S Leu145 | V-S Val147 | V-S Thr150 | V-M Pro151 | V-S Pro 151 | V-M Cys220 | V-M Glu221 | V-M Pro222 | V-S- Pro222 | V-M Pro223 | V-S Pro223 |
|----------|--------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|------------|------------|------------|-------------|------------|------------|
| Ligante  | -102,8             | -3,50      | 0,00       | 0,00       | -10,50     | -13,64     | -8,06      | -4,31       | -6,88      | -8,66      | -3,85      | -4,26       | -1,43      | -2,97      |
| 128      | -146,3             | -2,50      | -3,74      | -3,56      | -14,00     | -12,98     | -6,13      | -8,44       | -8,95      | -10,67     | -7,00      | -8,82       | -1,54      | -2,28      |
| 1        | -146,2             | 0,00       | -1,32      | -1,82      | -10,12     | -11,86     | -6,85      | -6,49       | -7,12      | -9,63      | -5,90      | -5,25       | -4,84      | -8,69      |
| 124      | -146,0             | 0,00       | -2,63      | -3,01      | -11,89     | -6,86      | -7,09      | -9,85       | -9,66      | -10,57     | -5,94      | -8,77       | -1,13      | -1,88      |
| 117      | -145,2             | 0,00       | -1,14      | -2,21      | -16,44     | -6,32      | -4,83      | -4,58       | -8,58      | -9,74      | -5,82      | -5,20       | -2,47      | -5,05      |
| 206      | -144,2             | 0,00       | -2,92      | -1,31      | -12,55     | -8,79      | -5,49      | -6,88       | -7,84      | -8,58      | -4,53      | -4,31       | -0,80      | -1,78      |
| 116      | -143,3             | 0,00       | -3,14      | -2,40      | -12,09     | -6,12      | -7,14      | -8,95       | -8,51      | -10,32     | -7,91      | -5,60       | -3,05      | -7,75      |
| 204      | -143,0             | 0,00       | 5,44       | -1,28      | -16,26     | -9,42      | -6,49      | -4,22       | -7,95      | -10,86     | -7,88      | -7,40       | -2,58      | -6,22      |
| 149      | -142,8             | 0,00       | -0,28      | 2,74       | -16,58     | -13,31     | -7,71      | -6,71       | -6,96      | -10,43     | -6,34      | -5,49       | -1,63      | -1,70      |
| 115      | -142,2             | 0,00       | -2,32      | -3,15      | -12,05     | -4,65      | -6,81      | -3,46       | -9,41      | -10,30     | -6,35      | -8,21       | -0,95      | -1,89      |
| 110      | -141,2             | 0,00       | 3,31       | -1,46      | -13,48     | -7,89      | -5,32      | -6,30       | -7,85      | -12,13     | -8,41      | -5,71       | -2,73      | -4,81      |
| 100      | -141,1             | -0,78      | -2,91      | -2,46      | -10,49     | -13,23     | -6,78      | -8,95       | -6,64      | -9,46      | -7,87      | -6,07       | -2,61      | -5,02      |
| 109      | -141,0             | 0,00       | -3,55      | -3,26      | -8,85      | -11,70     | -6,21      | -7,58       | -8,91      | -12,06     | -6,77      | -8,65       | -1,53      | -0,18      |
| 119      | -140,9             | -2,50      | -3,70      | -1,78      | -14,97     | -13,47     | -7,76      | -4,61       | -6,60      | -9,70      | -6,08      | -7,55       | -0,94      | -2,93      |
| 112      | -139,7             | -1,55      | -1,84      | -2,62      | -12,19     | -13,27     | -5,68      | -3,87       | -9,04      | -11,60     | -7,33      | -8,81       | -1,24      | -2,45      |
| 111      | -138,2             | 0,00       | -0,29      | -3,76      | -12,87     | -11,23     | -6,52      | -7,14       | -8,66      | -10,00     | -6,64      | -8,82       | -1,18      | -2,97      |
| 107      | -138,0             | 0,00       | -1,61      | -1,93      | -11,15     | -7,20      | -4,71      | -6,15       | -9,76      | -10,83     | -6,36      | -9,03       | -1,19      | -1,66      |
| 207      | -138,0             | 0,00       | -2,60      | -2,54      | -11,89     | -8,67      | -7,98      | -8,01       | -8,59      | -9,28      | -5,06      | -5,18       | -0,85      | -1,85      |
| 108      | -137,1             | 0,00       | -2,53      | -3,24      | -14,19     | -7,99      | -5,96      | -5,09       | -9,35      | -10,53     | -7,04      | -6,63       | -1,61      | -0,93      |
| 103      | -136,3             | -2,50      | -1,44      | -2,19      | -15,31     | -6,12      | -6,77      | -8,78       | -6,98      | -9,07      | -6,52      | -3,72       | -2,65      | -7,52      |
| 215      | -136,0             | -2,48      | -2,55      | -1,72      | -12,95     | -8,74      | -5,35      | -6,77       | -8,17      | -10,89     | -7,54      | -6,26       | -2,53      | -3,29      |

Fonte: O autor (2021).

Figura 5 - Fórmula estrutural dos 20 compostos que apresentaram as melhores energias de ligação com a enzima p53 mutante, selecionados através dos estudos de docking molecular.

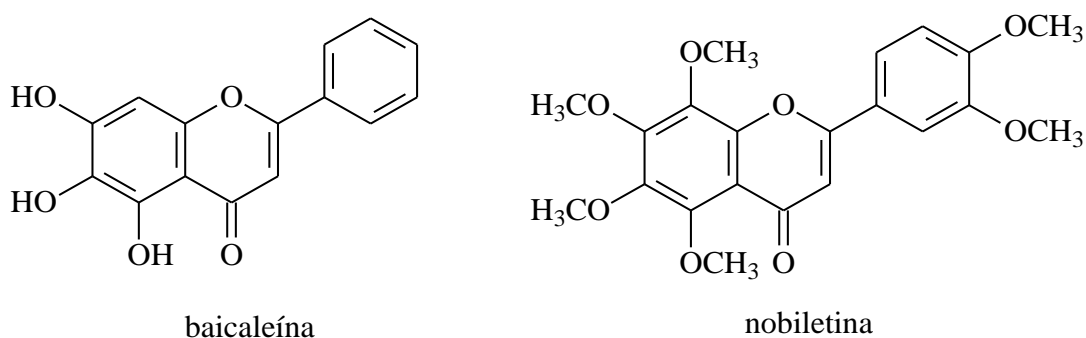




Fonte: O Autor (2021).

Observa-se que na Figura 5, os 15 melhores compostos selecionados no banco de dados do SISTEMAT-X, com melhor energia de interação, que apresentaram afinidade com a p53 mutante, possuem em suas estruturas o esqueleto de flavonóides, ilustrado na Figura 6, através da estrutura química da baicaleína e da nobiletina, que são flavonóides, sua semelhança estrutural com 15 dos 20 compostos com melhor energia de interação isolados neste trabalho [43]. Tanto a baicaleína, como a nobiletina apresentaram atividade de inibição da p53 mutante SNU-16 em células de tumor gástrico humano [44]. Além desses flavonóides existem diversos outros que além da proteção no CCR, possuem ação contra várias neoplasias em outros sitio ativo; essa interação pode ocorrer por meio da sua ação antioxidante, por modulação da p53 ou até mesmo ação direta no ciclo celular [45]. Chang e colaboradores em 2018, realizou um estudo de meta-análise utilizando uma revisão sistemática de 4.678 artigos de diversos países identificou que as subclasses flavonol, flavona e antocianidina foram capazes de reduzir o CCR [46]. Uma das teorias de sua ação benéfica considera que a presença de um grupo hidroxila na posição 3, localizado no anel B, contribui para a eliminação de potenciais espécies reativas de oxigênio (ROS) [45].

Figura 6 - Fórmulas estruturais da baicaleína e da nobiletina.



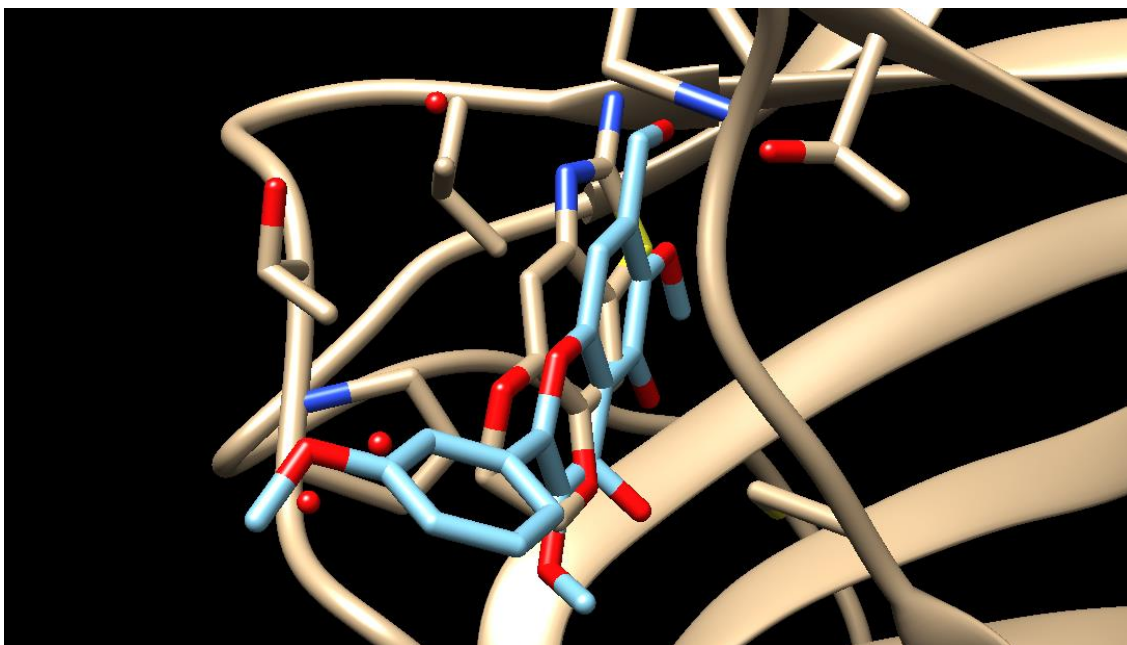
Fonte: O Autor (2021).

Esse fato é extremamente relevante ao considerar que dos 20 compostos encontrados em nosso trabalho, que apresentaram as melhores energias de ligação, 15 possuem estruturas semelhantes aos de flavonóides. Este, por sua vez, possui ação protetora no CCR, reforçando a teoria de que os compostos

encontrados possam também ter a mesma ação, porém não há nenhum estudo da ação dos flavonóides com p53 mutada no combate ao CCR.

A cristalografia de raio-X do composto 6,7-diidro[1,4]dioxino[2,3-f][1,3]benzotiazol-2-amina, apresenta um sanduiche dos sistemas de anéis entre a Pro151 e Val147 em um lado da cavidade, onde ocorre a interação com o anel do tiazol, e entre a Pro222 e Pro223 do outro lado da cavidade, onde ocorre a interação com o dioxano. A Figura 7 apresenta o composto 128, em azul, na conformação resultante do *docking* molecular, em marrom está o composto 6,7-diidro[1,4]dioxino[2,3-f][1,3]benzotiazol-2-amina, em sua conformação obtida experimentalmente. Os anéis A e C do flavonóide estão orientados para a mesma posição do anel tiazol, interagindo também com fragmentos da Pro151 e Val147. O composto 128 apresentou melhor energia de ligação com a p53 mutada, em relação a 6,7-diidro[1,4]dioxino[2,3-f][1,3]benzotiazol-2-amina, o que indica uma maior capacidade de inibição.

Figura 7 - Conformação do composto 128, em azul, resultante do *docking* molecular, e do composto 6,7-diidro[1,4]dioxino[2,3-f][1,3]benzotiazol-2-amina, em marrom, obtida experimentalmente (PDB=2X0U).



Fonte: O autor (2021).

Os valores das energias apresentados na Tabela 1 indicam que as energias de van der Waals, da cadeia secundária da Val147 aumentou de -10,50

kcal/mol no ligante, para -14,00 kcal/mol para o composto 128. A energia de van der Waals para a cadeia principal da Pro151 com o ligante diminuiu cerca de 2,00 kcal/mol, mas a da cadeia secundária aumentou cerca de 4,00 kcal/mol. As interações de van der Waals com as cadeias principal e secundária da Pro222, e com a cadeia principal da Pro223 também são maiores para o ligante 128. Estes resultados indicam que o composto 128 apresenta uma energia de interação melhor com a proteína p53, e essas interações ajudam na estabilização do composto dentro do sítio ativo, aumentando seu potencial em inibi-lo. O átomo de enxofre do anel tiazol está posicionado perto do resíduo Cys220 que sofreu a mutação, alocado na parte mais profunda do sítio de ligação.

### 3.3 Análise da dinâmica molecular

As simulações de dinâmica molecular foram realizadas para verificar se os compostos em estudo conseguem se ligar à proteína p53 mutante sob a influência de água, íons, temperatura e pressão [35]. A flexibilidade e mudanças conformacionais na estrutura da p53 também foi investigada para analisar a influência das alterações estruturais nas ligações e interações que ocorrem com os compostos [36]. Para isso, o desvio médio quadrático (RMSD) foi calculado para os átomos de C $\alpha$  da proteína e de cada composto, separadamente. Apenas para os compostos 111 e 124 não foi possível realizar os cálculos de dinâmica devido a problemas de parametrização com essas estruturas.

A análise de RMSD da proteína p53 complexada aos compostos em estudo mostrou que a proteína atingiu flutuações baixas variando entre 0,2 a 0,35nm, apresentando padrão semelhante de flutuações com todos os compostos, exceto para o composto 109 que apresentou flutuações mais alta a partir de 6ns (Figura 8). Esses resultados indicam a estabilidade da p53. Além disso, a partir dessas análises, é possível inferir que a proteína investigada foi inibida pelos compostos devido o padrão de semelhança entre as flutuações dos compostos e o inibidor que se encontra complexado na estrutura retirada do PDB.

Figura 8 - RMSD dos átomos de C $\alpha$  da proteína p53, os compostos investigados e o inibidor do PDB.

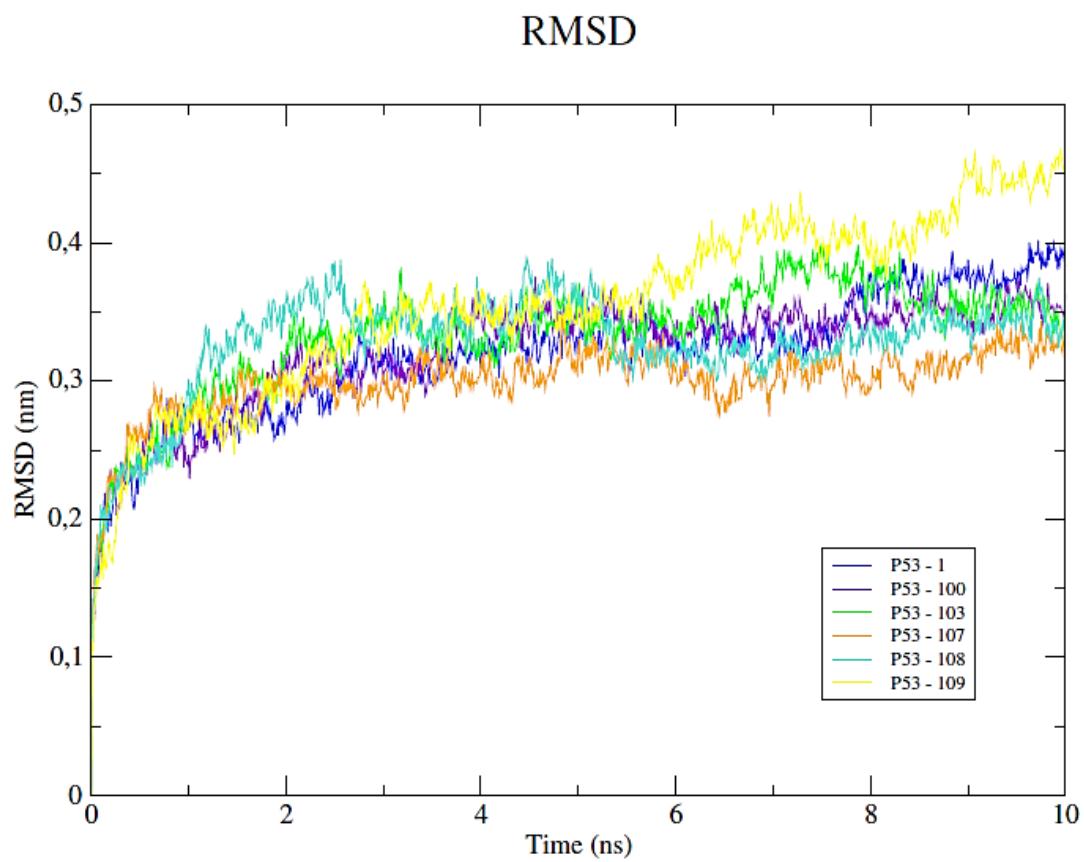
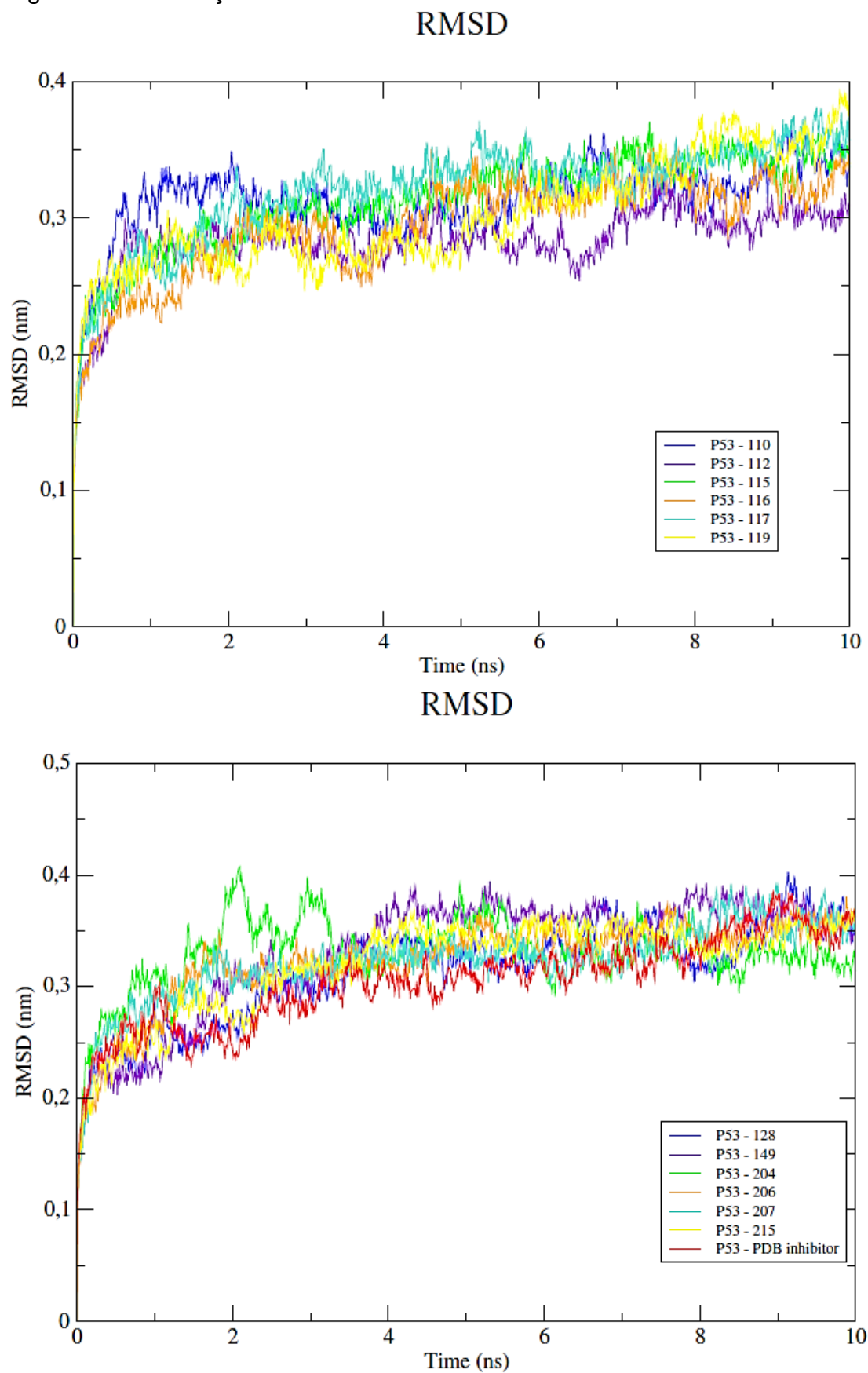




Figura 8. Continuação.



Fonte: O autor (2021).

Ao verificar o RMSD dos compostos investigados complexados com a p53, observamos estabilidade na maioria dos compostos durante toda a simulação de dinâmica. Os compostos que apresentaram estabilidade foram: 1, 100, 103, 107, 108, 109, 119, 128, 149, 204, 215 e o inibidor PDB (Figura 9). Embora os demais compostos apresentem condições desfavoráveis devido à instabilidade, eles não perderam contato com o sítio ativo. Mas apresentaram maior flexibilidade se manter ligado à estrutura proteica.

Figura 9 - RMSD dos átomos de C $\alpha$  dos compostos investigados complexados à proteína P53.

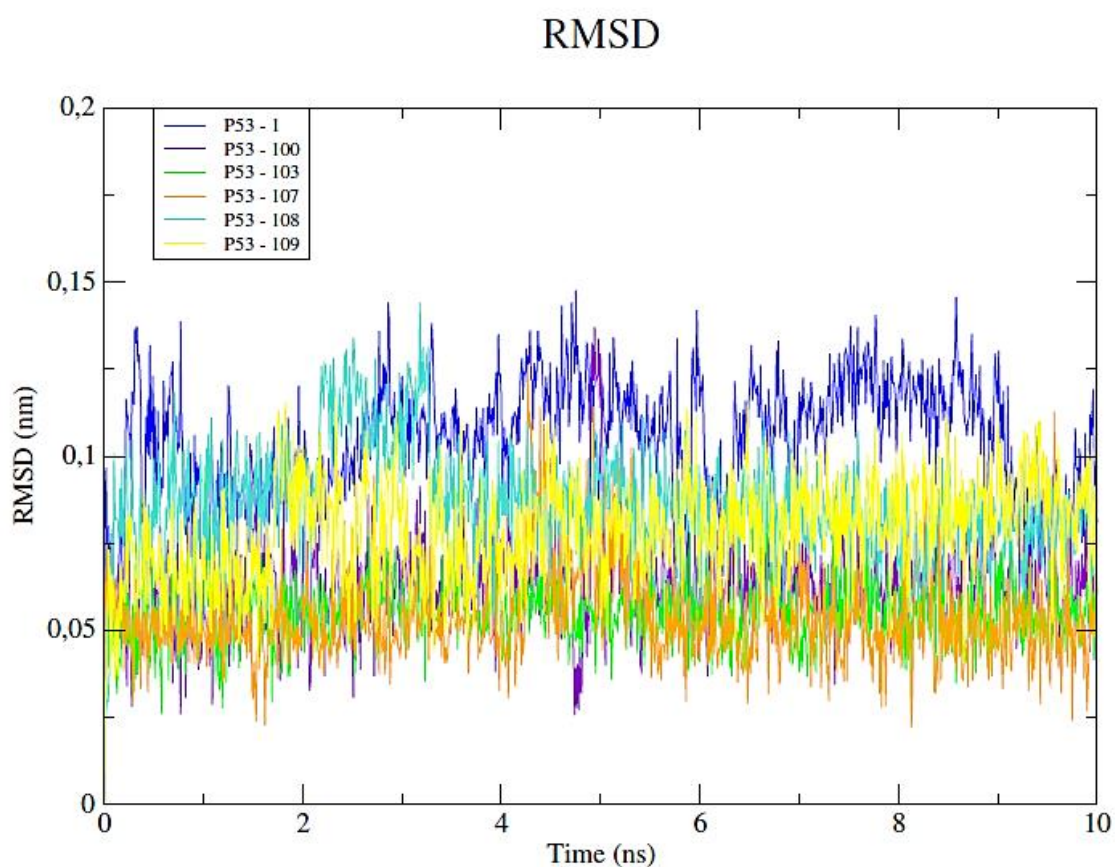
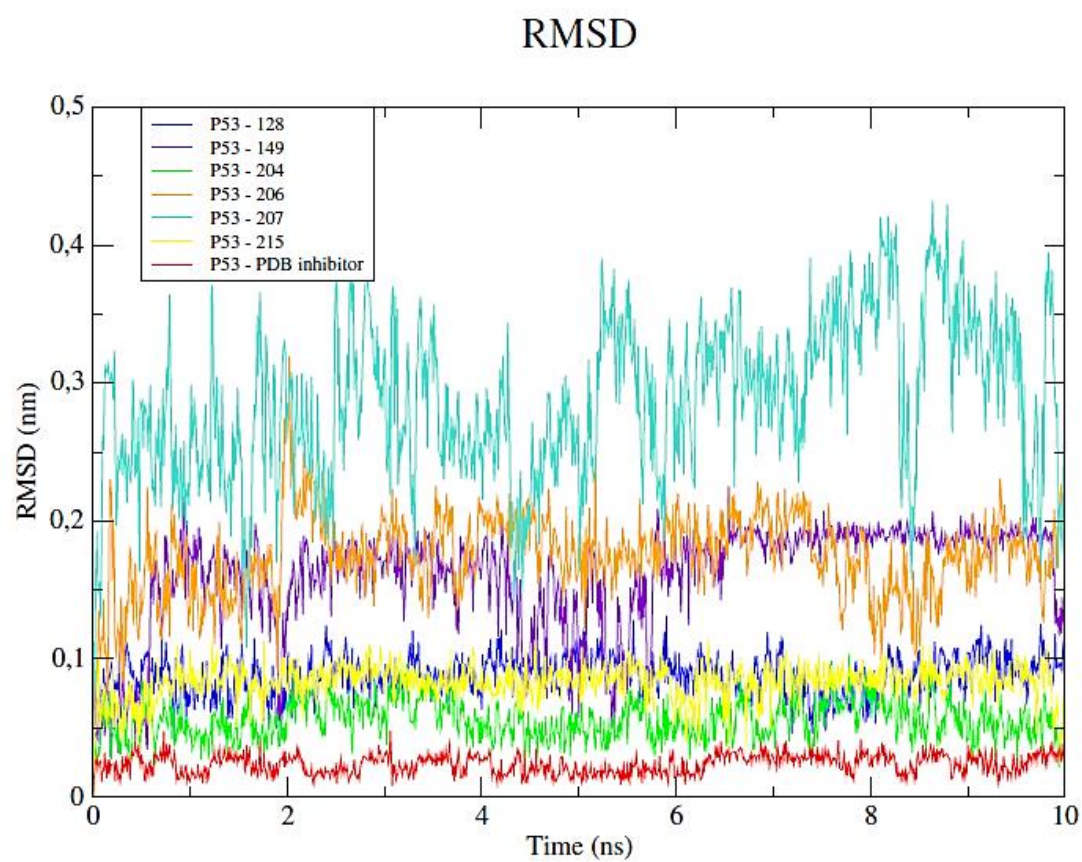
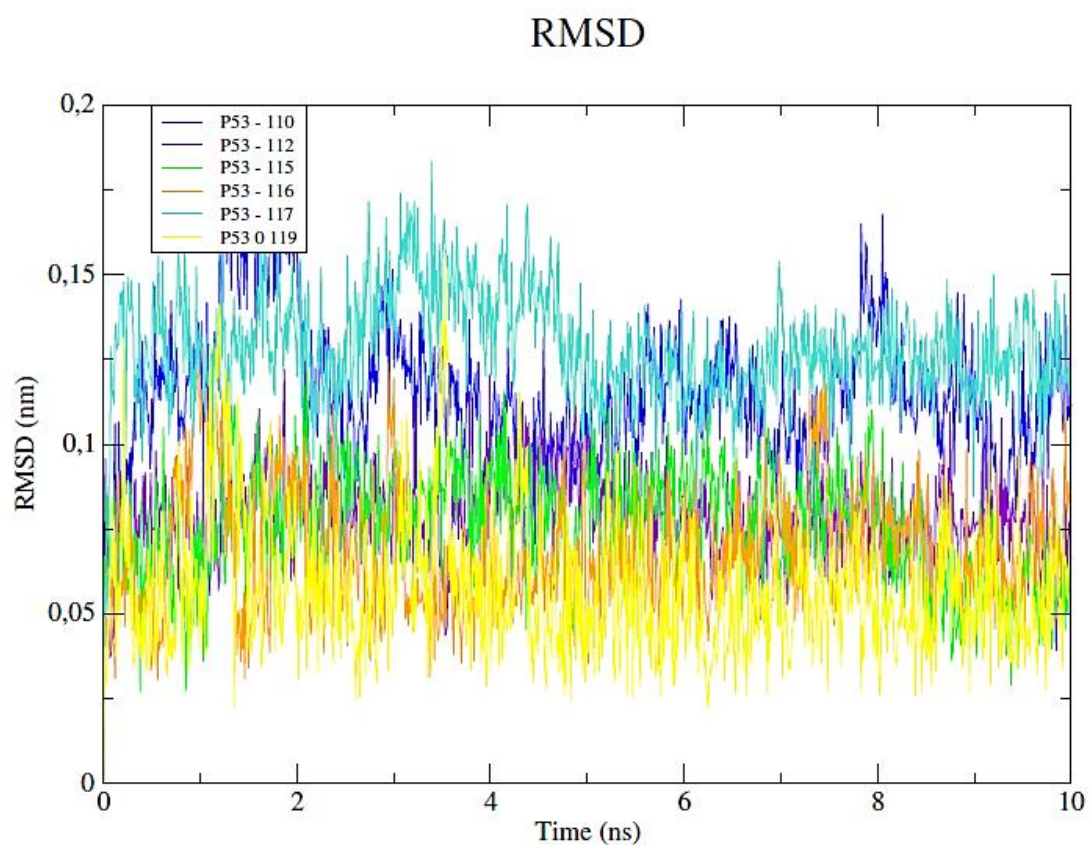


Figura 9 - Continuação



Fonte: O autor (2021).

Para compreender a flexibilidade dos resíduos e os aminoácidos que contribuem para a mudança conformacional da enzima investigada, foram calculadas as flutuações médias da raiz quadrada (RMSF) de cada aminoácido da proteína. Resíduos com altos valores de RMSF indicam aminoácidos mais flexíveis e valores baixos de RMSF refletem aminoácidos menos flexíveis. Quanto maior a flexibilidade do aminoácido, mais distante ele estará do sítio ativo da proteína p53 mutada [38]. Considerando que os aminoácidos com flutuações acima 0,3 nm contribuem para a flexibilidade da estrutura proteica, constatamos que dentre os aminoácidos que compõem a proteína p53, apenas os aminoácidos nas posições 97, 98, 165, 167, 180-186, 224, 225 e 290 são responsáveis pelas pequenas mudanças conformacionais da proteína (Figura 10). Observou-se, entretanto, que nenhum destes aminoácidos está posicionado diretamente no sítio ativo dos compostos estudados e não há interação entre estes aminoácidos e os compostos ancorados, indicando que nossos compostos estão relativamente estáveis.

Figura 10 - RMSF dos átomos de C $\alpha$  da proteína P53 complexados aos compostos investigados e o inibidor PDB.

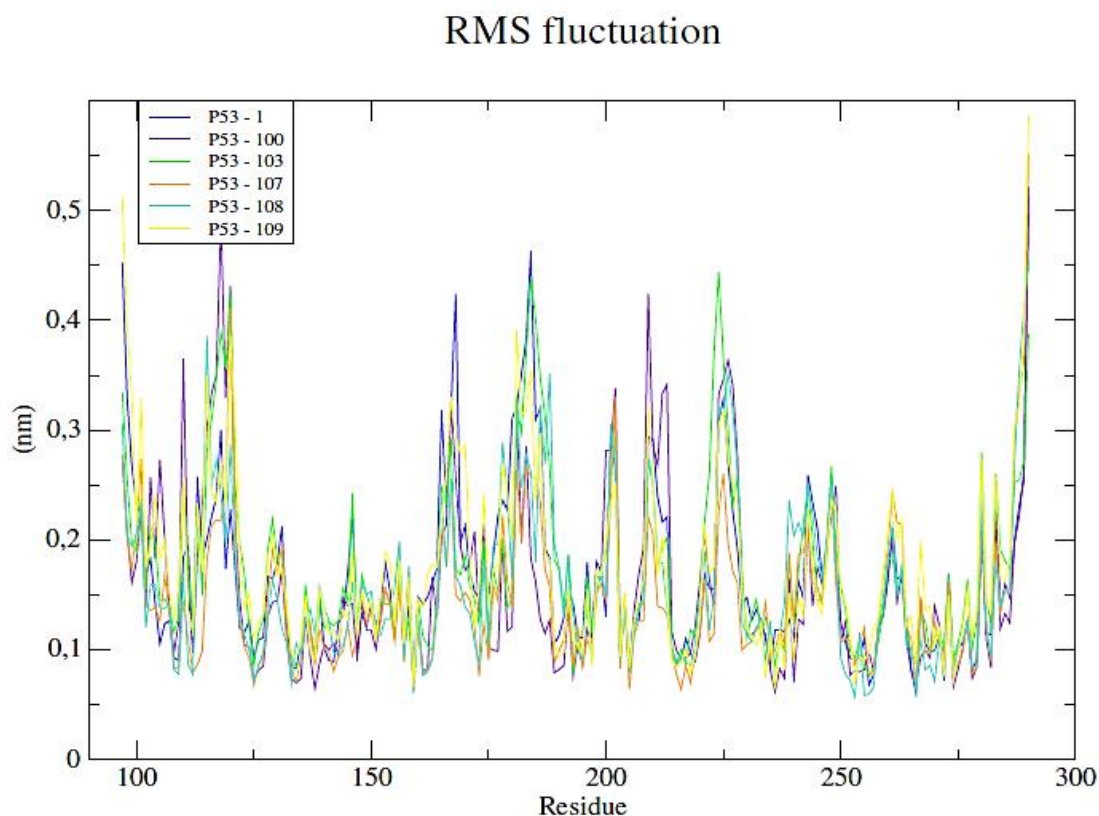
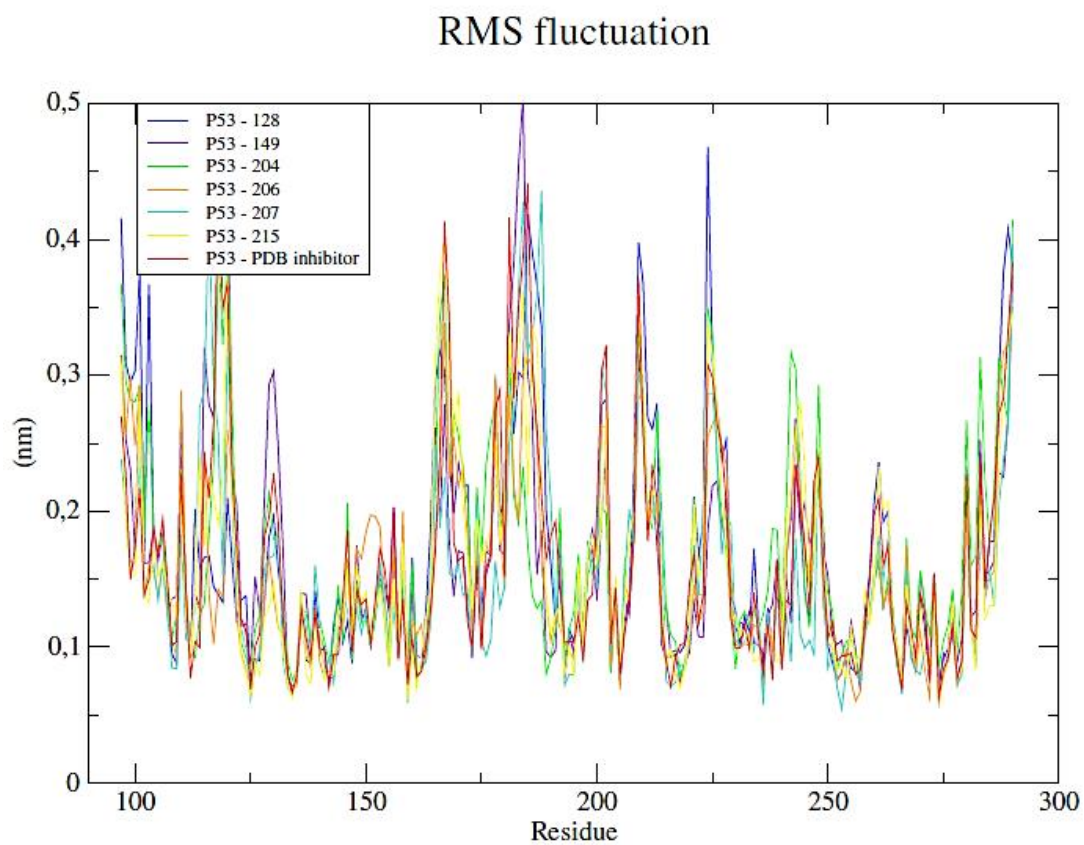
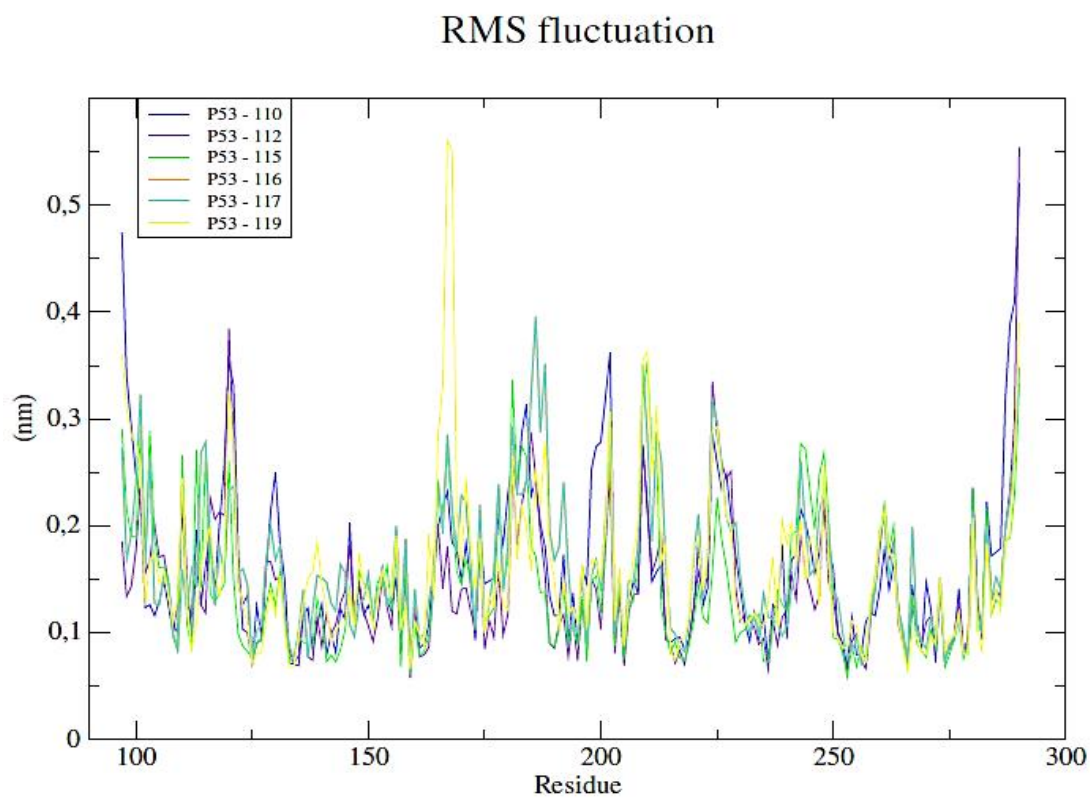


Figura 10 - Continuação

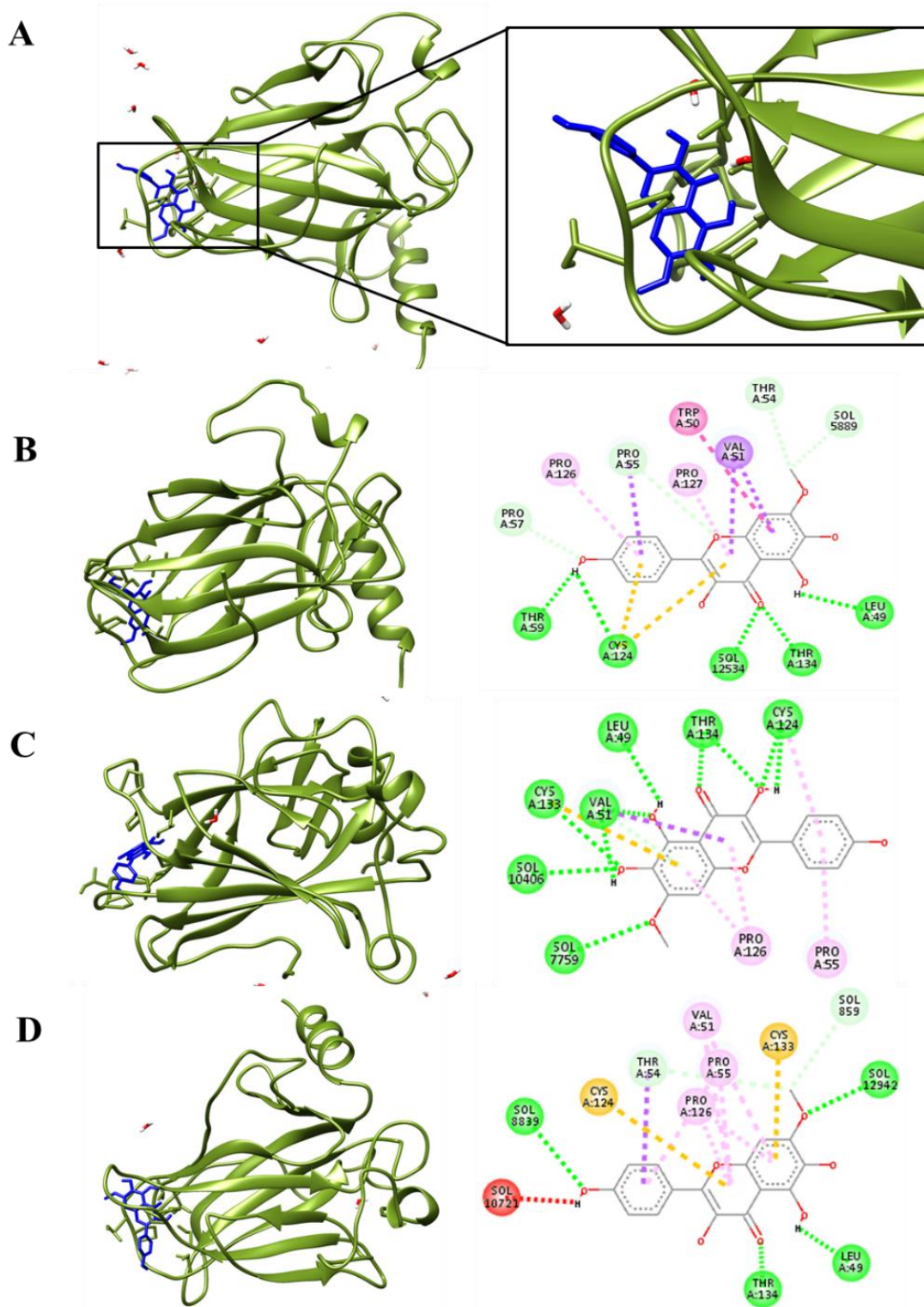


Fonte: O autor (2021)

Os dois melhores compostos no rank dos valores de energia de ligação, obtidos através do docking molecular, foram analisados através de programas gráficos (compostos 1 e 128) [38]. Foi constatado que o composto 1, complexado com a p53 mutante apresentou diversas ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e de van der Waals. Dentre as ligações e interações formadas com os aminoácidos durante a dinâmica, destacam-se os resíduos Leu49, Trp50, Val51, Thr54, Pro55, Pro57, Thr59, Cys 124, Pro126, Pro127 e Thr134. Destaca-se ainda que as ligações mais fortes foram observadas durante a etapa de 600ps, onde foram observadas a formação de cinco ligações de hidrogênio com o composto 1 (Figura 11).

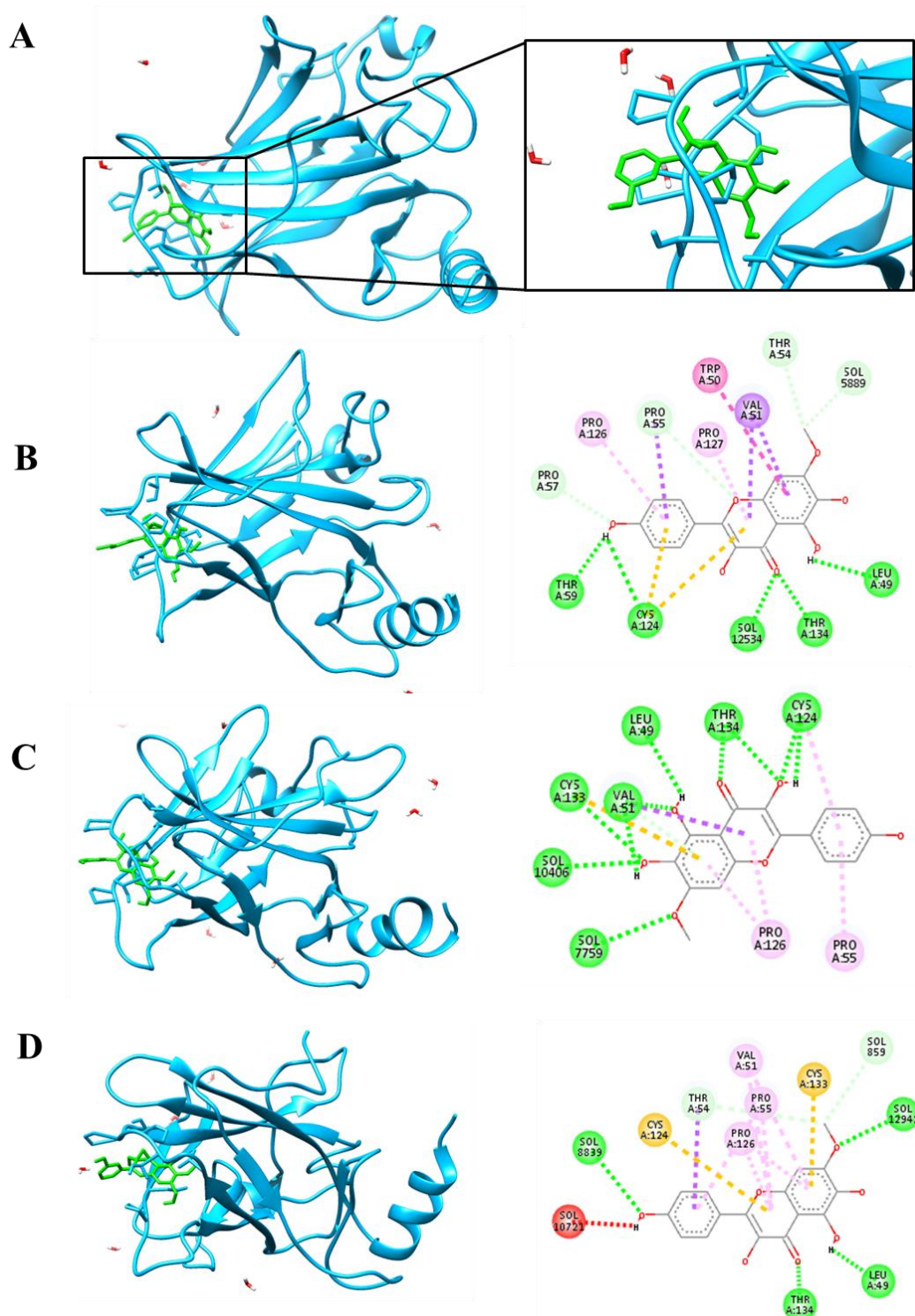
As mesmas ligações e interações também foram observadas entre os aminoácidos citados e o composto 128, com ligações mais estáveis durante a etapa de 600ps, esse fator é relevante, uma vez que essas ligações de hidrogênio mais forte, permite uma melhor estabilidade do complexo e menor chance de perda da ligação durante o processo da DM, mantendo dessa forma a p53 mutante inibida, mesmo sobre a influência de uma temperatura mais elevada (Figura 12).

Figura 11 - Simulações de dinâmica molecular durante 1000ps e interações 2D em diferentes tempos. A – Estrutura do complexo P53-composto 1 e seu sítio ativo, e interações 2D e 3D em B – 200ps, C – 600ps e D – 1000ps. Em verde estão destacadas ligações de hidrogênio, rosa representam interações hidrofóbicas e verde claro ligações de van der Waals.



Fonte: O autor (2021).

Figura 12 - Simulações de dinâmica molecular durante 1000ps e interações 2D em diferentes tempos. A – Estrutura do complexo P53-composto 128 e seu sítio ativo, e interações 2D e 3D em B – 200ps, C – 600ps e D – 1000ps. Em verde estão destacadas ligações de hidrogênio, rosa representam interações hidrofóbicas e verde claro interações de van der Waals.



Fonte: O autor (2021).



### 3.4 Análise do docking molecular para outras enzimas relacionadas ao combate do câncer com os compostos 1, 128 e a 6,7-diidro[1,4]dioxino[2,3-f][1,3]benzotiazol-2-amina.

Ao realizar o estudo do docking molecular e da DM, observou-se o grande potencial dos compostos 1 e 128 em inibir a p53 mutante, com boa energia de ligação e estabilidade do complexo alvo-ligante. Para melhor analisar esses compostos, em relação à capacidade de combate a carcinogênese, outras oito proteínas-alvo foram selecionadas de forma aleatória, que estão relacionadas com vias distintas da oncogênese, elas foram selecionadas baseadas na sua incidência expressiva com a carcinogênese sem relação específica com sitio primário da neoplasia; e foram ancoradas com o composto 1, 128 e a 6,7-diidro[1,4]dioxino[2,3-f][1,3]benzotiazol-2-amina. Esta análise foi realizada para avaliar se esses compostos teriam potencial de interagir com outros alvos aleatoriamente, através de uma via alternativa, além da p53 mutante, o que notoriamente demonstrará a abrangência dos nossos compostos no tratamento desta doença e de outras neoplasias para estudos futuros, reafirmando dessa forma a credibilidade dos nossos compostos.

Foram selecionadas 8 proteínas aleatoriamente e seus respectivos ligantes, que são importantes no envolvimento das neoplasias, sem especificação precisa com o CCR: PDGFR (código PDB: 6J0), VEGFR2 (código PDB: 3VO3), C-SRC (código PDB: 4U5J), HSP90 (código PDB: 1UY6), PI3K (código PDB: 1E7U), AKT1 (código PDB: 6HHF), TNKS1 (código PDB: 7CES) e EGFR (código PDB: 7LGS). Para cada uma destas proteínas selecionadas foi realizado o estudo do docking molecular com o seu ligante específico, com ligante da p53 mutada (6,7-diidro[1,4]dioxino[2,3-f][1,3]benzotiazol-2-amina) e com os compostos 1 e 128. Os valores da energia de ligação foram calculados e apresentados na tabela 2.

Tabela 2 - Valores das energias de ligação ( $\text{kJ.mol}^{-1}$ ) calculadas através do docking molecular para as 8 proteínas (PDGFR, VEGFR2, C-SRC, HSP90, Phosphoinositide 3-kinase, AKT1, Tankyrase e EGFR ) e o ligante específico de cada proteína, o ligante da p53 mutante, o composto 1 e o composto 128.

|  | Energia ( $\text{kJ.mol}^{-1}$ ) |               |                       |               |
|--|----------------------------------|---------------|-----------------------|---------------|
|  | Total                            | Van-der-Waals | Ligação de Hidrogênio | Eletrostática |
| <b>PDGFR</b><br><b>Código PDB:</b><br><b>6JOL</b>  |                                  |               |                       |               |
| Ligante PDGFR                                      | -183,31                          | -170,34       | -12,97                | 0,00          |
| Ligante P53  | -84,33                           | -71,98        | -12,35                | 0,00          |
| Composto 1   | -123,75                          | -113,86       | -9,90                 | 0,00          |
| Composto 128                                       | -146,22                          | -127,55       | -18,68                | 0,00          |
| <b>VEGFR2</b><br><b>Código PDB:</b><br><b>3VO3</b> |                                  |               |                       |               |
| Ligante VEGFR2                                     | -195,37                          | -181,75       | -13,62                | 0,00          |
| Ligante P53  | -91,21                           | -80,61        | -10,60                | 0,00          |
| Composto 1   | -125,70                          | -113,02       | -12,69                | 0,00          |
| Composto 128                                       | -127,58                          | -115,32       | -12,26                | 0,00          |
| <b>C-SRC</b><br><b>Código PDB:</b><br><b>4U5J</b>  |                                  |               |                       |               |
| Ligante C-SCR                                      | -110,02                          | -99,80        | -10,23                | 0,00          |
| Ligante P53  | -78,20                           | -68,71        | -9,49                 | 0,00          |
| Composto 1   | -124,07                          | -105,77       | -18,30                | 0,00          |
| Composto 128                                       | -127,98                          | -111,37       | -16,61                | 0,00          |
| <b>HSP90</b><br><b>Código PDB:</b><br><b>1UY6</b>  |                                  |               |                       |               |
| Ligante HSP90                                      | -131,08                          | -116,55       | -14,53                | 0,00          |
| Ligante P53  | -78,98                           | -61,26        | -17,72                | 0,00          |
| Composto 1   | -119,91                          | -106,89       | -13,02                | 0,00          |
| Composto 128                                       | -121,9                           | -105,50       | -16,40                | 0,00          |
| <b>PI3K</b><br><b>Código PDB:</b><br><b>1E7U</b>   |                                  |               |                       |               |
| Ligante PI3K                                       | -127,02                          | -108,68       | -18,34                | 0,00          |
| Ligante P53  | -86,16                           | -76,66        | -9,50                 | 0,00          |
| Composto 1   | -119,94                          | -109,98       | -9,96                 | 0,00          |
| Composto 128                                       | -128,36                          | -114,36       | -14,01                | 0,00          |
| <b>AKT1</b><br><b>Código PDB:</b><br><b>6HHF</b>   |                                  |               |                       |               |
| Ligante AKT1                                       | -211,18                          | -198,62       | -12,55                | 0,00          |
| Ligante P53  | -82,68                           | -62,71        | -19,96                | 0,00          |
| Composto 1   | -147,72                          | -134,11       | -13,61                | 0,00          |
| Composto 128                                       | -126,82                          | -109,63       | -17,19                | 0,00          |

Tabela 2 - Continuação.

| <b>TNKS1</b><br><b>Código PDB:</b><br><b>7CES</b> | <b>Total</b> | <b>Van-der-<br/>Waals</b> | <b>Ligação de<br/>Hidrogênio</b> | <b>Eletrostática</b> |
|---|--------------|---------------------------|----------------------------------|----------------------|
| Ligante TNKS1                                     | -205,10      | -194,68                   | -10,42                           | 0,00                 |
| Ligante P53                                       | -88,66       | -79,48                    | -9,18                            | 0,00                 |
| Composto 1  | -165,55      | -152,66                   | -12,89                           | 0,00                 |
| Composto 128                                      | -131,56      | -121,84                   | -9,71                            | 0,00                 |
| <b>EGFR</b><br><b>Código PDB:</b><br><b>7LGS</b>  |              |                           |                                  |                      |
| Ligante EGFR                                      | -144,85      | -138,47                   | -6,38                            | 0,00                 |
| Ligante P53                                       | -77,92       | -64,92                    | -13,00                           | 0,00                 |
| Composto 1  | -125,58      | -108,99                   | -16,58                           | 0,00                 |
| Composto 128                                      | -120,03      | -107,75                   | -12,28                           | 0,00                 |

Fonte: O autor (2021).

A análise detalhada para cada uma das 8 proteínas, avalia a extensão da atuação dos principais ligantes analisados nesse trabalho e seu potencial ação em outros alvos para o combate tanto do CCR, como em outras neoplasias situadas em sítios ativos distintos, uma vez que as oitos proteínas investigadas nesse estudo estão relacionadas à outras vias da oncogênese, diferente da p53 mutante. Em todos os cálculos de docking os compostos 1, 128 e a 6,7-diidro[1,4]dioxino[2,3-f][1,3]benzotiazol-2-amina estão no mesmo sítio ativo dos ligantes específicos de cada proteína estudada.

#### 3.4.1 Receptor do fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGFR)

O PDGFR tem grande relação com a oncogênese, é uma proteína armazenada nos grânulos-  $\alpha$  plaquetários, e tem ação em receptores associados a enzima tirosina quinase, que expressam potentes sinais mitogênicos, sua superexpressão está associada ao CCR [47]. O Imatinibe é o seu principal ligante e atua tanto em doenças inflamatórias, como o tratamento do CCR. Agnieszka e col em 2019, realizaram um estudo para o tratamento de CCR refratário em relação à terapia convencional, e fizeram uso do imatinibe, indicando que ele interfere no crescimento do câncer após quimioterapia, diminuindo a resistência e recorrência do CCR [47,48].

No estudo do docking molecular com a proteína PDGFR, o ligante Imatinibe, o ligante da p53 mutada (6,7-diidro[1,4]dioxino[2,3-f][1,3]benzotiazol-2-amina), o composto 1 e o composto 128, tiveram os seguintes valores de energia de ligação total:  $-183,31 \text{ kJ.mol}^{-1}$ ,  $-84,33 \text{ kJ.mol}^{-1}$ ,  $-123,75 \text{ kJ.mol}^{-1}$  e  $-46,22 \text{ kJ.mol}^{-1}$ , respectivamente. Como pode ser observado, apesar dos compostos 1 e 128 não terem as suas energias de interação superior ao do imatinibe, eles apresentam uma boa energia total de ligação, indicando a possibilidade de interação com esta proteína. No entanto a 6,7-diidro[1,4]dioxino[2,3-f][1,3]benzotiazol-2-amina apresentou valor de energia de interação inferior, indicando a sua especificidade com a p53 mutante.

#### 3.4.2 Receptor do fator de crescimento vascular endotelial - 2 (VEGFR-2)

O VEGFR-2 faz parte de uma das vias de sinalização das células endoteliais e mesangiais envolvido na angiogênese, sua desregulação pode levar ao dano no tecido vascular, e induzir expansão de vasos sanguíneos que potencializam o desenvolvimento tumoral [49]. Ao realizar o docking molecular deste alvo (Tabela 2), observa-se que o composto 128 e composto 1 apresentaram energia de ligação total inferior ( $-127,58 \text{ kJ.mol}^{-1}$  e  $-125,7 \text{ kJ.mol}^{-1}$  respectivamente) em comparação ao ligante da proteína ( $-195,37 \text{ kJ.mol}^{-1}$ ). Estes resultados indicam que tanto o composto 128 como o composto 1, mesmo com energia inferior, comparado ao seu ligante, ela é satisfatória, com potencial para inibi-lo.

#### 3.4.3 Protooncogênese da proteína tirosina quinase (C-SRC)

As proteínas quinases possuem a chave central da comunicação no controle intracelular, desde a regulação, transdução de sinais, funções químicas até o controle transcricional, e por isso a um amplo interesse no estudo delas, principalmente para o desenvolvimento de novos fármacos. Uma das classes dessas proteínas, é a tirosina quinase, que apresentam várias subdivisões, entre elas as citoplasmáticas, que são as C-SRC, que desempenham papel especial

no crescimento celular embrionário, cuja atividade excessiva está relacionada às mutações oncogênicas [50]

Os resultados do docking molecular dessa proteína com os compostos investigados, e seu ligante específico (Tabela 2), demonstram notoriamente que a energia de ligação total do composto 1 ( $-124,07 \text{ kJ.mol}^{-1}$ ) e do composto 128 ( $-127,98 \text{ kJ.mol}^{-1}$ ), foram melhores, se comparado ao ligante do alvo ( $-99,8 \text{ kJ.mol}^{-1}$ ), o que permite avaliar maior afinidade para o complexo receptor-ligante e com grande potencial de inibir a C-SRC.

#### 3.4.4 Proteína de choque térmico 90 (HSp90)

As proteínas de choque térmico atuam contra agregação incorreta das proteínas, e a HSp90 é a mais importante delas, pois é essencial para a viabilidade celular, uma vez que está ligada à maturação, estabilização e resposta ao estresse das proteínas sinalizadoras do ciclo celular. Esta proteína está envolvida na estabilização do fenótipo tumoral de diversos tipos de neoplasias, sendo o ponto central de regulação. Sua superexpressão, favorece a oncogênese, permitindo que essas células tolerem um microambiente desequilibrado [51].

Na análise do docking molecular, a energia de ligação total do ligante original ( $-131,08 \text{ kJ.mol}^{-1}$ ) foi melhor em comparação com o ligante da p53 mutada ( $-78,98 \text{ kJ.mol}^{-1}$ ), com o composto 1 ( $-119,91 \text{ kJ.mol}^{-1}$ ) e com o composto 128 ( $-121,9 \text{ kJ.mol}^{-1}$ ), como apresentado na Tabela 2. Apesar de apresentarem valores de interação inferiores, ambos os compostos teriam potencial para inibir a HSP90, uma vez que apresentam boa energia de interação com ela.

#### 3.4.5 Fosfoinositida 3-quinase (PI3K)

A PI3K é responsável pela regulação da proliferação, diferenciação e sobrevivência celular, sua superexpressão está envolvida em diversas vias de desenvolvimento das neoplasias, especialmente no CCR, sendo um potencial alvo terapêutico nessa patologia, uma vez que desempenha um papel significativo na resistência terapêutica e metástases do CCR [52]. Arunaksharan

e colaboradores em 2019, evidenciaram que o tratamento do CCR primário e avançado tem sido bem-sucedido através da inibição da PI3K [52].

Foi realizado o estudo de docking molecular dessa proteína com os principais composto do trabalho, o ligante da p53 mutada e o ligante alvo, e os resultados estão demonstrados na Tabela 2. Observa-se que o composto 128 apresentou melhor energia de ligação total ( $-128,36 \text{ kJ.mol}^{-1}$ ), quando comparado ao ligante PI3K ( $-127,02 \text{ kJ.mol}^{-1}$ ), sendo assim, torna-se um potencial inibidor dessa proteína.

#### 3.4.6 Proteína quinase serina/treonina (AKT1)

A AKT1 é ativada por fator de crescimento plaquetário, e está relacionada à proliferação e sobrevivência, portanto tem associação ao processo de resistência aos tratamentos, juntamente com a via PI3K. Se estas duas vias forem desreguladas ocorrerá o processo de transição do epitélio mesenquimal, migração e invasão celular, o que acarretará na progressão do CCR, principalmente por modular a atividade transcricional [53].

Na análise do docking molecular com a AKT1, o ligante alvo apresentou energia de ligação total significativamente maior ( $-211,18 \text{ kJ.mol}^{-1}$ ), quando comparado ao ligante p53 ( $-82,68 \text{ kJ.mol}^{-1}$ ) e aos compostos 1 e 128 (respectivamente  $-147,72 \text{ kJ.mol}^{-1}$  e  $-126,82 \text{ kJ.mol}^{-1}$ ). Apesar da energia menor, os compostos apresentaram energia de ligação satisfatória, o que permite a inibição deste alvo. Além desse fato, o composto 128, apresenta boa energia de interação com proteína PI3K, sendo que este e o AKT1 agem juntos no processo de resistência as drogas, ter um composto com boa energia de ligação nas duas proteínas, pode aumentar o potencial de inibição e agir na resistência delas.

#### 3.4.7 Tankyrase (TNKS1)

As TNKS1 estão envolvidas em diversas doenças, inclusive nas neoplásicas, uma vez que interage com diversos substratos reconhecendo sua sequência através do ankyrin (ANK). Elas também realizam a regulação proteica através processo de ibiquização, alongando o telômero, ação mitose,

metabolismo da glicose, reparação do DNA, entre outras funções essenciais na estabilidade celular e na oncogênese [54].

Por estas razões esta proteína também foi estudada no docking molecular, de acordo com os dados da Tabela 2, observa-se que o ligante original da TNKS1 apresenta melhor energia de ligação total ( $-205,1 \text{ kJ.mol}^{-1}$ ), quando comparado ao composto 1 ( $-165,55 \text{ kJ.mol}^{-1}$ ) e ao composto 128 ( $-131,56 \text{ kJ.mol}^{-1}$ ). Novamente, tanto o composto 1, quanto o composto 128 apresentaram boa energia de ligação com essa proteína, tornando-os potenciais inibidores.

#### 3.4.8 Receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR)

O EGFR está relacionado a diversos sinais de proliferação, diferenciação, migração e sobrevivência celular, uma vez ativado ele pode ter efeitos intranucleares. Sua superexpressão no núcleo está relacionado com a resistência medicamentosa. Especialmente no CCR tem se mostrado favorável no tratamento com anticorpos monoclonais, diminuindo a resistência ao tratamento, uma vez que são capazes de influenciar o comportamento biológico das células neoplásicas [55].

Devido a sua importância no CCR, realizamos o seu estudo de docking molecular. Observa-se, na Tabela 2, que o ligante do alvo apresenta energia de ligação total melhor ( $-144,85 \text{ kJ.mol}^{-1}$ ), quando comparado ao composto 1 ( $-125,58 \text{ kJ.mol}^{-1}$ ) e o composto 128 ( $-120,03 \text{ kJ.mol}^{-1}$ ), porém a diferença é mínima. Estes resultados indicam o grande potencial em inibir este alvo.

Após a análise detalhada do docking molecular das 8 proteínas que tem ação essencial nas vias da oncogênese e dos seus respectivos ligantes, em comparação com a energia de interação dos principais compostos estudados nesse trabalho (composto 1 e 128) e o ligante da p53 mutada (6,7-diidro[1,4]dioxino[2,3-f][1,3]benzotiazol-2-amina), foi verificado que na maioria das situações, os compostos 1 e 128, apresentam energia de interação satisfatória com as proteínas estudadas, em algumas situações superior, e mesmo que inferior, muito similar ao ligante do alvo, o que demonstra seu grande potencial em inibi-los. Por outro lado, ligante da p53 mutada sempre apresentou energia de interação inferior em todas as análises, o que demonstra sua

especificidade da 6,7-diidro[1,4]dioxino[2,3-f][1,3]benzotiazol-2-amina para a proteína p53 mutada.

Verificou-se que os alvos C-SRC e PI3K, no docking molecular apresentaram melhores energia de interação para o composto 128, quando comparado ao ligante alvo, evidenciando sua maior afinidade com elas e conseqüentemente, seu grande potencial em inibir além da p53 mutante, essas demais proteínas envolvidas em vias alternativas do CCR e em outros sítios da doença neoplásica.

#### 4 CONCLUSÃO

O p53 é considerado o guardião do genoma humano, e a sua mutação leva ao desenvolvimento do CCR em mais da metade dos pacientes. As investigações direcionada para essa proteína tem se tornado o foco do tratamento, entretanto a abordagem adequada é a prevenção, e na literatura temos evidências de compostos naturais que diminuem a incidência do CCR, porém nenhum estudo que comprove que esses compostos naturais tenham a relação com a p53 mutante no CCR.

Nosso estudo mostrou que as pontuações de energia da ligação entre a p53 mutante com as moléculas encontradas no banco de dados, foram satisfatórias e com boa estabilidade para a interação do complexo proteína-ligante, evidenciando que o composto 128 apresenta melhor energia de interação, ou seja, melhor estabilidade em sua ligação com a p53 mutante.

O docking molecular dos compostos 1, 128 e ligante da p53 mutada (6,7-diidro[1,4]dioxino[2,3-f][1,3]benzotiazol-2-amina) com outras oito proteínas importantes na oncogênese tanto do CCR, como em outros sítios da doença neoplásica, demonstrou que as proteínas C-SRC e PI3K apresentaram melhor energia de interação com o composto 128, comparado ao ligante do alvo. Para as outras 6 proteínas, tanto o composto 128 quanto o composto 1 apresentaram energias de ligação similares ao do ligante do alvo, e mesmo em situações inferiores, a energia desses dois compostos foram satisfatória, desta forma esses compostos, estudados nesse trabalho podem potencialmente inibir o CCR por outras vias, além da p53 mutada, além da ação em casos de resistência e



metástases, visto que a maioria dessas proteínas estão envolvidas em refratariedade ao tratamento do CCR.

Os resultados deste estudo demonstram que os compostos selecionados possuem grande potencial em inibir a proteína p53 mutante, além de ser associado aos flavonóides que apresentam fator protetor nas neoplasias, inclusive no CCR.

Outros estudos *in vitro* e *in vivo* podem ser realizados para explorar os resultados *in silico* para poder diminuir a incidência dessa doença tão devastadora.

## REFERÊNCIAS

- [1]. Kunnumakkara AB, Bordoloi D, Sailo BL, Roy NK, Thakur KK, Banik K, Shakibaei M, Gupta SC, Aggarwal BB (2019) Cancer drug development: The missing links. *Exp Biol Med* 244:663-689.  
<https://doi.org/10.1177/1535370219839163>
- [2]. Tepus, M., & Yau, T. O. (2020) Non-Invasive Colorectal Cancer Screening: An Overview. *Links Exp Gastrointestinal tumors* 7.3:62–73.  
<https://doi.org/10.1159/000507701>
- [3]. Johdi NA, Sukor NF (2020) Colorectal Cancer Immunotherapy: Options and Strategies. *Front Immunol* 11:1624. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01624>
- [4]. Silva JAG (2019) Tipos de câncer. <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer>. Accessed 5 May 2021.
- [5]. Yoshino T, Arnold D, Taniguchi H, Pentheroudakis G, Yamazaki K, Xu RH (2018) Pan-Asian adapted ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol.* 29:44–70.  
<https://doi.org/10.1093/738>
- [6]. Miller KD, Nogueira L, Mariotto AB, Rowland JH, Yabroff KR, Alfano CM (2019) Cancer treatment and survivorship statistics. *Journal Cancer Clin.* 0:1–23. <https://doi.org/10.3322/caac.21565>
- [7]. Perera GL, Nicolás GF, Casariego NGJ, Diaz RR, San HGR, Pérez PJA (2017) 5-fluorouracil toxicity in the treatment of colon cancer associated with the genetic polymorphism 2846 A>G. *Journal Oncol Pharm Pract.* 23:396–8.  
<https://doi.org/10.1177/1078155216647202>
- [8]. Blondy S, David V, Verdier M, Mathonnet M, Perraud A, Christou N (2020) 5-Fluorouracil resistance mechanisms in colorectal cancer: From classical pathways to promising processes. *Cancer science* 111/9:3142–3154.  
<https://doi.org/10.1111/cas.14532>
- [9]. Zheng HC (2017) *The Molecular Mechanisms of Chemoresistance in Cancers*. <https://www.impactjournals.com/oncotarget>. Accessed 02 dezembro 2020
- [10]. Shen N, Hu J, Zhang LN, Zhang L, Sun YG, Xie YH, Wu SM, Liu L and Gao ZB (2012) Doxorubicinloaded zein in situ gel for interstitial chemotherapy

of colorectal cancer. *Acta Pharm Sin B*; 2:610-614.

<https://doi.org/10.1016/j.apsb.2012.09.001>

[11]. Barberio MT, Pecori B, Roca MS, Imbimbo S, Bruzzese F, Leone A, Muto P, Delrio P, Avallone A, Budillon A, Di Gennaro E (2017) Synergistic antitumor interaction between valproic acid, capecitabine and radiotherapy in colorectal cancer: critical role of p53. *Journal Exp Clin Cancer Res* 6;36:1-177.

<https://doi.org/10.1186/s13046-017-0647-5>

[12]. Nkune, Cherie A, Abrahamse HK (2021) Possible Enhancement of Photodynamic Therapy (PDT) Colorectal Cancer Treatment when Combined with Cannabidiol. *Journal Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* Vol. 21.

<https://doi.org/10.2174/1871520620666200415102321>

[13]. Imperatore C, Valadan M, Tartaglione L, Persico M, Ramunno A, Marialuisa Menna M, Casertano M, Dell'Aversano C, Singh M, Garigliota MLD, Bajardi F, Morelli E, Fattorusso C, Altucci C, Varra M (2020) Exploring the photodynamic Properties of Antiproliferative Benzodiazopyrrole Derivatives. *Links Exp Int J Mol.* 13;21(4):1246. <https://doi.org/10.3390/ijms21041246>

[14]. Boyer J, McLean EG, Aroori S (2004) Characterization of p53 Wild-type and null isogenic colorectal cancer cell lines resistant to 5-fluorouracil, oxaliplatin, and irinotecan. *Clin Cancer Res.* 2004;10(6):2158-2167.

<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-03-0362>

[15]. Olivos D, Mayo L (2016) Emerging non-canonical functions and regulation by p53: p53 and stemness. *Links Exp Int J Mol* 17:1982.

<https://doi.org/10.3390/ijms17121982>

[16]. Arandkar S, Furth N, Elisha Y, Nataraj NB, van der Kuip H, Yarden Y (2018) Altered p53 functionality in cancer-associated fibroblasts contributes to their cancer-supporting features. *Proc Natl Acad* 115:6410–5.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1719076115>

[17]. Ghatak D, Ghosh DD, Roychoudhury S (2021) Cancer Stemness: p53 at the Wheel - molecular and Cellular Oncology. The of jornal *Frontiers in Oncology.* <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.604124>.

[18]. Ziranu P, Lai E, Schirripa M, Puzzoni M, Persano M, Pretta A, Munari G, Liscia N, Pusceddu V, Loupakis F, Demurtas L, Libertini M, Mariani S, Migliari M, Dubois M, Giampieri R, col (2021) The Role of p53 Expression in Patients with *RAS/BRAF* Wild-Type Metastatic Colorectal Cancer Receiving Irinotecan

and Cetuximab as Later Line Treatment. *Links Expot J. Targeted Oncology*.

<https://doi.org/10.1007/s11523-021-00816-3>.

[19]. Muller PAJ, Vousden KH (2014) Mutant p53 in cancer: new functions and therapeutic opportunities. *Links Exp. Cancer Cell*. 25:304–17.

<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.01.021>

[20]. Friedman PN, Chen X, Bargonetti J, Prives C (1993) The p53 protein is an unusually shaped tetramer that binds directly to DNA. *Proc Natl Acad* 90:3319–3323. <https://doi.org/0.1073/pnas.90.8.3319>

[21]. Zhao D, Tahaney WM, Mazumdar A, Savage MI, Brown PH (2017) Molecularly Targeted Therapies for p53-mutant Cancers. *Links Exp Cell Mol Life* 74.22:4171–4187. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2575-0>.

[22]. Yue X, Zhao Y, Xu Y, Zheng M, Feng Z, Hu W (2017) Mutant p53 in cancer: accumulation, gain-of-function and therapy. *Links Exp Mol Biol*. 429.11:1595–1606.

<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.03.030-7>

[23]. Yue X, Wu F, Li Y, Liu J, Boateng M, Mandava K (2020) Gain of function mutante p53 protei activates AKT though the Rac1 signaling to promote tumorigenesis. *Link exp Cell Cycle* 19.11:1338-1351

<https://doi.org/10.1080/15384101.2020.1749790>

[24]. Garofalo, M., Grazioso, G., Cavalli, A., & Sgrignani, J. (2020). How Computational Chemistry and Drug Delivery Techniques Can Support the Development of New Anticancer Drugs. *Molecules*, 25(7), 1756.

<https://doi.org/10.3390/molecules25071756>

[25]. Scotti MT, Herrera-Acevedo C, Oliveira TB, Costa POR, Santos SYK, Rodrigues RP (2018) Sistemax, an Online Web-Based Cheminformatics Tool for Data Management of Secondary Metabolites. *Molecules*. 3.23:103

<https://doi.org/10.3390/molecules23010103>

[26]. Yang JM, Chen CC (2004) iGEMDOCK: A generic evolutionary method for molecular docking. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*. 55.2:288-304 <https://doi.org/10.1002/prot.20035>

[27]. Guedes IA, Magalhães CS, Dardenne LE (2004) Receptor–ligand molecular docking. *Biophys* 6.1:75–87. <https://doi.org/10.1007/s12551-013-0130-2>.

- [28]. Meng XY, Zhang HX, Mezei M, Cui M (2011) Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. *Curr Comput Aided Drug Des.* 7.2:146-57. <https://doi.org/10.2174/157340911795677602>
- [29]. Gupta S, Mohan G (2014) Dual Binding Site and Selective Acetylcholinesterase Inhibitors Derived from Integrated Pharmacophore Models and Sequential Virtual Screening. *BioMed Res. Int.* 2014.14:21 <https://doi.org/10.1155/2014/291214>
- [30]. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ (2001) Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 46.1:3–26 [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(00\)00129-0](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(00)00129-0)
- [31]. Daina A, Michielin O, Zoete V (2017) SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific reports* 7:42717 <https://doi.org/10.1038/srep42717>
- [32]. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE (2004) UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem.* 25.13:1605-12. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>
- [33]. Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, Shindyalov IN, Bourne PE (2000) The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, 28.235-242. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>
- [34]. Huyen Y, Jeffrey PD, Derry WB, Rothman JH, Pavletich NP, Stavridi ES, Halazonetis TD. (2004) Structural differences in the DNA binding domains of human p53 and its *C. elegans* ortholog Cep-1. *12(7):1237-43.* doi: 10.1016/j.str.2004.05.007. PMID: 15242600
- [35]. Sohraby F, Bagheri M, Aliyari M, Aryapou H. (2017) *In silico* drug repurposing of FDA-approved drugs to predict new inhibitors for drug resistant T315I mutant and wild-type BCR-ABL1: A virtual screening and molecular dynamics study. Vol 17:234-240. <https://doi.org/10.1016/j.jmgs.2017.04.005>
- [36]. Abraham MU, Murtola T, Schulz R, Páll S, Smith JC, Hess B (2015) Gromacs: high performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *Software X.* 1.2:19-25 <https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001>

- [37]. Berendsen HJC, Van der Spoel D, Van Drunen R (1995) GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. *Computer Physics Communications* 91:1-3 [https://doi.org/10.1016/0010-4655\(95\)00042-E](https://doi.org/10.1016/0010-4655(95)00042-E)
- [38]. Bondi A (1964) Van der Waals Volumes and Radii. *J. Phys.* 68:441-451, 1964. <https://doi.org/10.1021/j100785a001>
- [39]. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE (2004) UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 25.13:1605-12 <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>
- [40]. Wong CF (2008) Flexible ligand-flexible protein docking in protein kinases systems. *Biochim Biophys Acta* 1784.1:244-51. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2007.10.005>
- [41]. Schmid N, Eichenberger AP, Choutko A, Riniker S, Winger M, Mark AE, Van Gunsteren WF (2016) Definition and testing of the GROMOS force-field versions 54A7 and 54B7. *European biophysics journal*, 40.7:843. <https://doi.org/10.1007/s00249-011-0700-9>
- [42]. Barros MEDSB (2015) Estudos de Docking Molecular, síntese e atividade biológica de análogos da -massoialactona e da combretastatina A-4 (Master's thesis, Universidade Federal de Pernambuco)
- [43]. Thieury C, Lebouvier N, Guevel R, Barguil Y, Herbette G, Antheaume C, Hnawia E, Asakawa Y, Nour M, Guillaudeux T. (2017) Mechanisms of Action and Structure-Activity Relationships of Cytotoxic Flavokawain Derivatives. *Exp. Bioorganic & Medicinal Chemistry* S0968-0896(16)30887-2
- [44]. Moon JY, Cho M, Ahn KS, Cho SK (2013) Nobiletin induces apoptosis and potentiates the effects of the anticancer drug 5-fluorouracil in p53-mutated SNU-16 human gastric cancer cells. *Nutr Cancer* 65.2:286-95 <https://doi.org/10.1080/01635581.2013.756529>
- [45]. Siddiqui SS, Rahaman S, Rupasinghe HPV, Vazhappilly CG (2020) Dietary Flavonoids in p53—Mediated Immune Dysfunctions Linking to Cancer Prevention, *link Exp Biomedicines* 8:286 <https://doi.org/10.3390/biomedicines808028>

- [46]. Chang H, Lei L, Zhou Y, Ye F, Zhao G (2018) Dietary Flavonoids and the Risk of Colorectal Cancer: An Updated Meta-analysis of Epidemiological Studies. *Link Exp. Nutrients* 10.7:950. <https://doi.org/10.3390/nu10070950>
- [47]. Agnieszka K, Przybyszewska M, Swoboda P, Neska J, Miłoszewska J, Grygorowicz M.A, Kutner A, Markowicz S (2019) Imatinib inhibits the regrowth of human colon cancer cells after treatment with 5-FU and cooperates with vitamin D analogue PRI-2191 in the downregulation of expression of stemness-related genes in 5-FU refractory cells. *Link exp Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* S0960-0760(18)30334-0. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2019.02.003>
- [48]. Sae-lim S, Soontornworaiit B, Rotkruea P. (2019) Inhibition of Colorectal Cancer Cell Proliferation by Regulating Platelet-Derived Growth Factor B Signaling with a DNA Aptamer. *Exp. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 20(2):487-494. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2019.20.2.487>.
- [49]. Falcon B.L, Chintharlapalli S, Uhlik M.T, Pytowski B. (2016) Antagonist antibodies to vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR-2) as anti-angiogenic agentes. *Exp. Pharmacology & Therapeutics*. 126:204-225. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.06.001>
- [50]. Silva B.V, Horta B.A.C, Alencastro R.B, Pinto A.C. (2009) Kinase protein: structural features and chemical inhibitors. *Quim. Nova*, Vol. 32, No. 2, 453-462. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000200032>
- [51]. Xie<sup>1</sup> M, Yu<sup>1</sup> T, Jing<sup>1</sup> X, Ma<sup>1</sup> L, Fan Y, Yang F, Ma<sup>1</sup> P, Jiang<sup>1</sup> H , Wu<sup>1</sup> X, Shu Y, Xu<sup>1</sup> T. (2020) Exosomal circSHKBP1 promotes gastric cancer progression via regulating the miR582-3p/HUR/VEGF axis and suppressing HSP90 degradation. *Molecular Cancer* 19:112, <https://doi.org/10.1186/s12943-020-01208-3>
- [52]. Narayanankutty A. (2019). PI3K/ Akt/ mTOR Pathway as a Therapeutic Target for Colorectal Cancer: A Review of Preclinical and Clinical Evidence. *Current Drug Targets* 20:12.1217-1226 <https://doi.org/10.2174/1389450120666190618123846>.
- [53]. Allam L, Arrouchi H, Ghrifi F, Khazraji A.E, Kandoussi I, Bendahou M.A, Amri H.E, Absi M.E, Ibrahimi A. (2020) AKT1 Polymorphism (rs10138227) and Risk of Colorectal Cancer in Moroccan Population: A Case Control Study.

Exp. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention 11:3165-3170. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2020.21.11.3165>

[54]. Schatoff E.M, Goswami S, Zafra M.P, Foronda M.P, Shusterman M, Leach B.I, Katti A, Diaz B.J, Dow E.L. (2019) Distinct Colorectal Cancer-Associated APC Mutations Dictate Response to Tankyrase Inhibition. *Cancer Discovery* 10: 1358-1371. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-19-0289>

[55] Khan K, Valeri N, Dearman C, Rao S, Watkins D, Starling N, Chau I, Cunningham D. (2019) Targeting EGFR pathway in metastatic colorectal cancer- tumour heterogeneity and convergent Evolution. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 143:153-16



## ANEXO

Normas para a publicação na revista Current Computer-Aided Drug Design

### *MANUSCRIPT PREPARATION*

The manuscript should be written in English in a clear, direct and active style. All pages must be numbered sequentially, facilitating in the reviewing and editing of the manuscript.

### **MICROSOFT WORD TEMPLATE**

It is advisable that authors prepare their manuscript using the template available on the Web, which will assist in preparation of the manuscript according to Journal's Format. **Download the Template.**

### **SECTIONS IN MANUSCRIPTS**

Manuscripts submitted for research and review articles in the journal should be divided into the following sections:

- Title
- Title page
- Structured Abstract
- Graphical Abstract
- Keywords
- Text Organization
- Conclusion
- List of Abbreviations (if any)
- Consent for Publication
- Conflict of Interest
- Acknowledgements
- References
- Appendices
- Figures/Illustrations (if any)
- Chemical Structures (if any)
- Tables (if any)
- Supportive/Supplementary Material (if any)

### **Title**

The title of the article should be precise and brief and must not be more than 120 characters. Authors should avoid the use of non-standard abbreviations and question marks in titles. The first letter of each word should be in capital letters except for articles, conjunctions and prepositions.

As recommended by the Reporting guidelines information about the study should be a part of the title (particularly for systematic reviews and meta analyses).

Authors should also provide a 'running title'. Title, running title, byline, correspondent footnote and key words should be written as presented in original manuscripts.

### **Title Page**

Title page should include paper title, author(s) full name and affiliation, corresponding author(s) names complete affiliation/address, along with phone, fax and email.

### **Structured Abstract**

The abstract of an article should be its clear, concise and accurate summary, having no more than 250 words, and including the explicit sub-headings (as in-line or run-in headings in bold). Use of abbreviations should be avoided and the references should not be cited in the abstract.

All the original research articles, systematic reviews and meta analyses must be accompanied with a structured abstract. Ideally, each abstract should include the following sub-headings, but these may vary according to requirements of the article.

- Background
- Objective
- Methods
- Results
- Conclusion

The headings can vary, but must state the purpose of the study, details of the participants, measurements, methods, main findings and conclusion.

### **Graphical Abstract**

A graphic must be included with each manuscript for use in the Table of Contents (TOC). This must be submitted separately as an electronic file (preferred file types are EPS, PDF, TIFF, Microsoft Word, PowerPoint and CDX etc.). A graphical abstract, not exceeding 30 words along with the illustration, helps to summarize the contents of the manuscript in a concise pictorial form. It is meant as an aid for the rapid viewing of the journals' contents and to help capture the readers' attention. The graphical abstract may feature a key structure, reaction, equation, etc. that the manuscript elucidates upon. It will be listed along with the manuscript title, authors' names and affiliations in the contents page, typeset within an area of 5 cm by 17 cm, but it will not appear in the article PDF file or in print.

Graphical Abstracts should be submitted as a separate file (must clearly mention graphical abstract within the file) online via Bentham's Manuscript Processing System.

### **Keywords**

6 to 8 keywords must be provided. Choose important and relevant keywords that researchers in your field will be searching for so that your paper will appear in a database search. The keywords should be contained in the title and they should appear several times in the article. In biomedical fields, MeSH terms are

a good 'common vocabulary' source to draw keywords from <https://www.nlm.nih.gov/mesh/meshhome.html>.

### **Text Organization**

The main text should begin on a separate page and should be divided into title page, abstract and the main text. The text may be subdivided further according to the areas to be discussed, which should be followed by the Acknowledgement (if any) and Reference sections. The Review Article should mention any previous important old and recent reviews in the field and contain a comprehensive discussion starting with the general background of the field. It should then go on to discuss the salient features of recent developments. The authors should avoid presenting material which has already been published in a previous review. The authors are advised to present and discuss their observations in brief.

For Research Articles, the manuscript should begin with the title page and abstract followed by the main text, which must be structured into separate sections as **Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Conclusion, Ethics Approval and Consent to Participate, Human and Animal Rights, Conflict of Interest, Acknowledgements and References.**

The manuscript style must be uniform throughout the text and 10 pt Times New Roman font should be used. The full term for an abbreviation should precede its first appearance in the text unless it is a standard unit of measurement. The reference numbers should be given in square brackets in the text. Italics should be used for Binomial names of organisms (Genus and Species), for emphasis and for unfamiliar words or phrases. Non-assimilated words from Latin or other languages should also be italicized e.g. *per se*, *et al.* *etc.*

### **SECTION HEADINGS**

Section headings should be numbered sequentially, left aligned and have the first letter capitalized, starting with the introduction. Sub-section headings however, should be in lower-case and italicized with their initials capitalized. They should be numbered as 1.1, 1.2, *etc.*

### **INTRODUCTION**

The Introduction section should include the background and aims of the research in a comprehensive manner.

### **MATERIALS AND METHODS**

This section provides details of the methodology used along with information on any previous efforts with corresponding references. Any details for further modifications and research should be included. Sufficient details should be provided to the reader about the original data source in order to enable the analysis, appropriateness and verification of the results reported in the study.

It is important for the Method Section should be sufficiently detailed in respect of the data presented, and the results produced from it. This section should include all the information and protocol gathered for the study at the time when it was being written. If the study is funded or financially supported by an organization to conduct the research, then it should be mentioned in the Method Section. Methods must be result-oriented. The statement regarding the approval by an independent local, regional or national review committee (e.g.

name of ethic committee and institutional review board) should be part of the Methods Section.

## **EXPERIMENTAL**

Repeated information should not be reported in the text of an article. A calculation section must include experimental data, facts and practical development from a theoretical perspective.

### **Experimental Validation**

The authors are required to submit supportive material of research papers submitted to Current Computer Aided Drug Design, in which in silico models are validated through relevant experimental data either from the author's own lab or through citation of a suitable experimental data available in the published literature.

For QSAR studies, when the number of cases or data points ( $n$ ) is smaller than the number of predictors ( $p$ ), ordinary least square (OLS) is not the right statistical method; robust methods like principal component analysis (PCA), partial least square (PLS), ridge regression (RR) must be used. The authors should also carry out two-deep cross validation to obtain the correct (true)  $q^2$ , not naïve (wrong)  $q^2$ .

## **RESULTS**

Results should be precise.

## **DISCUSSION**

This should explore the significance of the results of the work, present a reproducible procedure and emphasize the importance of the article in the light of recent developments in the field. Extensive citations and discussion of published literature should be avoided.

The Results and Discussion may be presented together under one heading of "Results and Discussion". Alternatively, they may be presented under two separate sections ("Results" section and "Discussion" Sections). Short sub-headings may be added in each section if required.

## **CONCLUSION**

A small paragraph summarizing the contents of the article, presenting the final outcome of the research or proposing further study on the subject, may be given at the end of the article under the Conclusion section.

## **FUNDING**

The authors need to declare the funding sources of their manuscripts clearly by providing the name of the funding agency or financial support along with allotted grant/award number in round brackets (if applied), for instance, "This work was financially supported by [Name of the funding agency] (Grant number XXX).

Similarly, if a paper does not have any specific funding source, and is part of the employment of the authors, then the name of the employer will be required. Authors will have to clearly state that the funder was involved in writing, editing, approval, or decision to publish the article.

### **Greek Symbols and Special Characters**

Greek symbols and special characters often undergo formatting changes and get corrupted or lost during preparation of manuscript for publication. To ensure

that all special characters used are embedded in the text, these special characters should be inserted as a symbol but should not be a result of any format styling (*Symbol* font face) otherwise they will be lost during conversion to PDF/XML.

Authors are encouraged to consult reporting guidelines. These guidelines provide a set of recommendations comprising a list of items relevant to their specific research design. Chemical equations, chemical names, mathematical usage, unit of measurements, chemical and physical quantity & units must conform to SI and Chemical Abstracts or IUPAC.

All kinds of measurements should be reported only in International System of Units (SI).

### **Appendices**

In case there is a need to present lengthy, but essential methodological details, appendices must be used, which can be a part of the article. An appendix must not exceed three pages (Times New Roman, 10 point fonts, 900 max. words per page). The information should be provided in a condensed form, ruling out the need of full sentences. A single appendix should be titled APPENDIX, while more than one can be titled APPENDIX A, APPENDIX B, and so on.

### **Supportive/Supplementary Material (if any)**

We do encourage to append supportive material, for example a PowerPoint file containing a talk about the study, a PowerPoint file containing additional screenshots, a Word, RTF, or PDF document showing the original instrument(s) used, a video, or the original data (SAS/SPSS files, Excel files, Access Db files etc.) provided it is inevitable or endorsed by the journal's Editor.

Supportive/Supplementary material intended for publication must be numbered and referred to in the manuscript but should not be a part of the submitted paper. In-text citations as well as a section with the heading "Supportive/Supplementary Material" before the "References" section should be provided. Here, list all Supportive/Supplementary Material and include a brief caption line for each file describing its contents.

Any additional files will be linked to the final published article in the form supplied by the author, but will not be displayed within the paper. They will be made available in exactly the same form as originally provided only on our Web site. Please also make sure that each additional file is a single table, figure or movie (please do not upload linked worksheets or PDF files larger than one sheet). Supportive/Supplementary material must be provided in a single zipped file not larger than 4 MB.

Authors must clearly indicate if these files are not for publication but meant for the reviewers'/editors' perusal only.

### **List of Abbreviations**

If abbreviations are used in the text either they should be defined in the text where first used, or a list of abbreviations can be provided.