

Caroline Rego Rodrigues
Universidade Estadual de Goiás (UEG)
rodrigues.caroline.r@gmail.com

Luiz Carlos da Cunha
Universidade Federal de Goiás

Lídia Andeu Guillo
Universidade Federal de Goiás



PANORAMA DOS NUTLINS COMO PROTÓTIPO PARA TERAPIA DO CÂNCER

PANORAMA OF NUTLINS AS A PROTOTYPE FOR CANCER THERAPY

RESUMO

A p53 é uma proteína supressora tumoral que atua na defesa da célula contra mutações deletérias e transformações cancerosas. A via de sinalização da proteína p53 encontra-se inativada em todos os tipos de câncer e este fato tem chamado a atenção de muitos pesquisadores no sentido do desenvolvimento de novas terapias farmacológicas baseadas no reestabelecimento dessa via. Os níveis de p53 na célula estão sob o rígido controle do regulador negativo MDM2 via ubiquitinação. A p53 também controla a transcrição do MDM2 gerando uma regulação por feedback em que as duas proteínas mutuamente controlam seus níveis celulares. Dessa forma, foi pensado que o bloqueio da interação p53-MDM2 poderia levar ao efeito farmacológico antitumoral e várias moléculas inibidoras foram testadas para este fim, dentre elas uma família de imidazolininas tetrassubstituídas, chamadas nutlins. Estes compostos podem ativar seletivamente a via de sinalização da p53 *in vitro* e *in vivo* em linhagens de tumores humanos que apresentam alta expressão de HDM2 (o tipo humano de MDM2) levando à inibição do crescimento celular e à apoptose. Os inibidores de MDM2 representam uma classe promissora de ativadores da p53 que podem se tornar fármacos efetivos no tratamento do câncer e também no diagnóstico por imagem.

Palavras-chave: nutlins, p53, MDM2, câncer.

ABSTRACT

p53 is a tumor suppressor protein that acts in cell defense against deleterious mutations and cancer transformations. The signaling pathway of p53 protein is inactivated in all types of cancer and this fact has attracted the attention of many researchers in order to develop new drug therapies based on the reestablishment of this pathway. The levels of p53 in the cell are under the strict control of the negative regulator MDM2 ubiquitination pathway. p53 also controls the transcription of MDM2 generating a feedback regulation that the two proteins mutually control their cellular levels. Thus, it was thought that blocking the MDM2-p53 interaction could lead to different pharmacological effects and antitumor inhibitory molecules have been tested for this purpose, among them a family of imidazoline tetrasubstituted called nutlins. These compounds can selectively activate the p53 signaling pathway *in vitro* and *in vivo* human tumor lines that show high expression of HDM2 (human type MDM2) leading to inhibition of cell growth and apoptosis. MDM2 inhibitors represent a promising class of activators of p53 that may become drugs effective in the treatment of cancer and also in diagnostic imaging.

Keywords: nutlins, p53, MDM2, cancer.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Endereço: BR-153 – Quadra Área
75.132-903 – Anápolis – revista.prp@ueg.br

Coordenação:

GERÊNCIA DE PESQUISA

Coordenação de Projetos e Publicações

Artigo Original

Recebido em: 03/10/2014

Aceito em: 04/12/2014

INTRODUÇÃO

A proteína p53 é um potente fator de transcrição nuclear cuja principal função é organizar a defesa da célula contra mutações deletérias e transformações cancerosas. Esta proteína pode ser ativada por meio da ação de agentes genotóxicos tais como irradiação ultravioleta (MALTZMAN; CZYZYK, 1984, KASTAN et al., 1991), agentes carcinogênicos (YAMAIZUMI; SUGANO, 1994, RAMET et al., 1995, MEPLAN et al., 1999), estresse oxidativo (TISHLER, 1993, MESSMER; BRUNE, 1996), drogas citotóxicas (FRITSCHKE et al., 1993, NELSON; KASTAN, 1994, MAGNELLI et al. 1995), inibidores da topoisomerase (TISHLER et al., 1993) ou mesmo por agentes não genotóxicos como hipóxia, hipertermia e depleção de ribonucleotídeos (PLUQUET; HAINAUT, 2001).

Em células sob condições normais, a p53 se encontra na sua forma latente, em níveis basais, não interferindo na progressão das fases do ciclo celular. No entanto, as condições citadas acima levam a uma rápida indução da sua forma ativa. Porém, a indução da p53 em resposta ao dano ao DNA consiste não apenas na ativação da p53, mas também na estabilização desta proteína (OREN, 1999, HAINAUT; HOLLSTEIN, 2000).

A estabilização da p53 é alcançada pela inibição da sua ligação com proteínas que promovem a sua degradação. Como exemplos destes inibidores podem-se citar anticorpos monoclonais ou peptídeos competidores que ocorrem nas células com a finalidade de facilitar a estabilização da p53 (BÖTTGER et al., 1997).

Uma vez ativada, a p53 coordena o sistema de reparo da célula ativando a expressão de proteínas como a p21, GADD45, Bax, Puma e Noxa, que podem levar à parada do ciclo celular, senescência ou, em casos mais graves, à apoptose (VOUSDEN; PRIVES, 2009). Dessa forma, a ativação da p53, decorrente da ativação de oncogenes, age no sentido de eliminar tumores nascentes, por senescência ou apoptose, formando uma barreira contra o desenvolvimento do tumor (CHEN et al., 2010, RAO et al., 2013, SAHA et al., 2013, Teoh; Chng, 2014). Por desempenhar um papel essencial na manutenção da integridade genômica, a proteína p53 passou a ser conhecida por “guardião do genoma” (LANE, 1992).

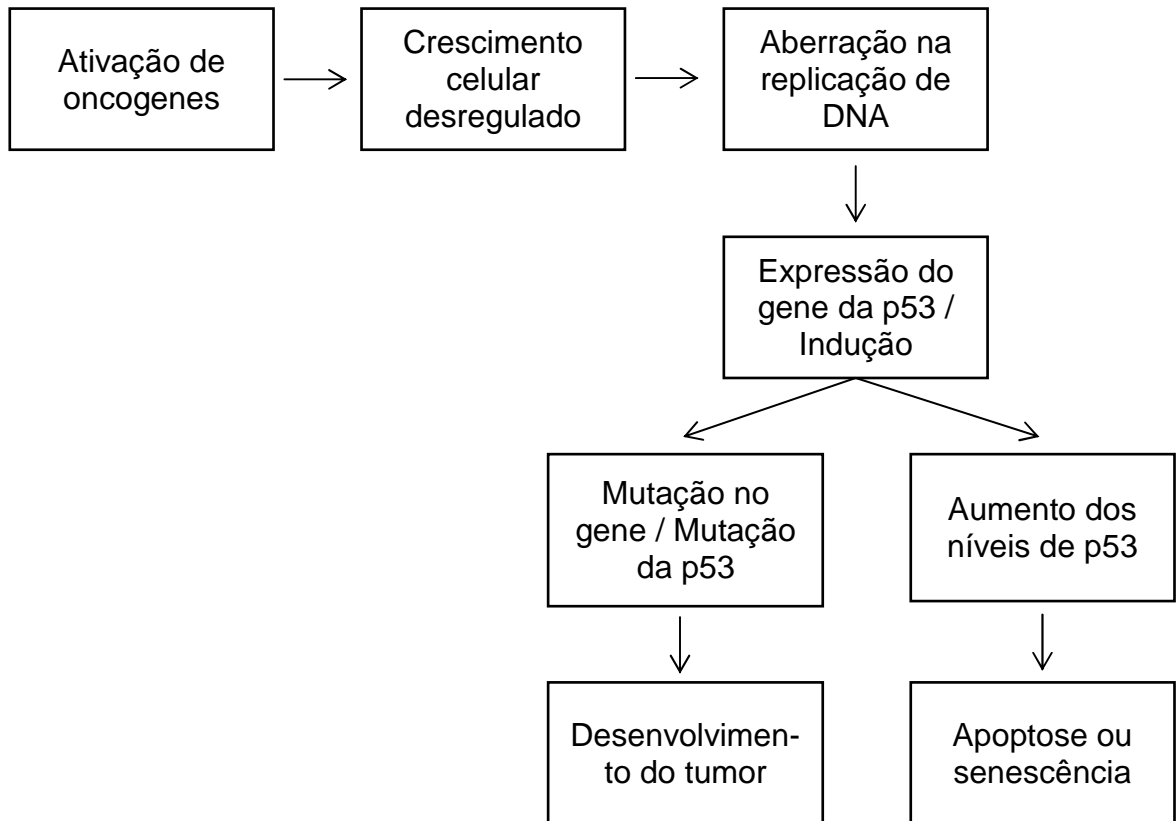


Figura 1 - Ação da proteína p53 na prevenção do desenvolvimento de tumores (Adaptação de Lane, 1992).

A senescência é um processo de parada do crescimento da célula que se mantém metabolicamente ativa, mas incapaz de sofrer divisão. Estas células sofrem mudanças em sua morfologia como alargamento e achatamento de sua forma e aumento na granulosidade e liberam fatores que afetam o crescimento das células vizinhas e sua organização tecidual. Por este motivo, este processo não consiste meramente no fim da vida de uma célula, mas sim num estado fisiológico determinado pelo programa homeostático de um organismo multicelular (RONINSON, 2003).

A senescência é resultado do encurtamento dos telômeros dos cromossomos, que acontece naturalmente com o tempo, ou de dano ao DNA. No último caso, o estímulo também pode decorrer da expressão de proteínas Ras ou Raf mutadas e por outras formas de sinalização (CAMPISI, 2001). Em ambos os casos, a parada do ciclo celular é iniciada pela expressão da p53 que tem múltiplos papéis na ativação de genes, em especial na ativação da p21, um inibidor

pleiotrópico de diferentes complexos ciclina/CDK (DOTTO, 2000). Altos níveis de p21 causam a parada do ciclo celular, sendo que depois de estabelecido o estado senescente, os níveis de p53 e p21 voltam ao normal. Porém, à medida que os níveis de p21 diminuem, os níveis de p16 aumentam, sugerindo que esta proteína possa ser responsável pelo impedimento do ciclo celular em células senescentes. Os dois sinais de senescência citados são processos anticarcinogênicos essenciais para as células (ALCORTA et al., 1996).

A apoptose é a morte celular programada que pode ser observada no tratamento clássico do câncer com radioterapia e quimioterapia. Neste evento há dano irreparável ao DNA das células em rápida divisão e este processo leva à morte celular programada por uma via p53 dependente (ELMORE, 2007). Algumas células expressam receptores Fas ou TNF que podem levar a apoptose via ligante. Outras células apresentam uma via da morte que deve ser bloqueada por fatores de sobrevivência como hormônios ou fatores de crescimento.

Em geral a apoptose é um evento coordenado e com gasto de energia que envolve a ativação de um grupo de cisteína proteases denominadas caspases e uma complexa cascata de eventos (ELMORE, 2007).

A via de sinalização da proteína p53 encontra-se inativada em todos os tipos de câncer e este fato tem chamado a atenção de muitos pesquisadores no sentido do desenvolvimento de novas abordagens farmacológicas baseadas no restabelecimento dessa via. Aproximadamente 50% dos pacientes diagnosticados com câncer apresentam mutações na p53 e os outros 50% possuem defeitos na modificação pós-traducional desta proteína (MOLL et al., 2005, VOUSDEN; LU, 2002).

Estudo de Ventura et al. (2007) demonstrou que o ambiente do tumor responde rapidamente à reintrodução da p53 ativa; esta por sua vez dispara os mecanismos de senescência ou apoptose, causando a regressão do tumor em camundongos.

Uma das vantagens da pesquisa de terapias cujos alvos envolvem a via de sinalização da p53 reside no fato de que células tumorais frequentemente expressam em altos níveis a proteína p53 mutada. Dessa forma, qualquer pequena molécula ou chaperonas que consigam estabilizar a conformação dessas proteínas modificadas poderão ativar a apoptose seletivamente em células tumorais. Soma-

se a isto o fato de que a quimioterapia precisa de uma via funcional da p53 para apresentar efeito terapêutico, portanto pequenos ativadores farmacológicos poderão aumentar a sensibilidade da quimioterapia e da radioterapia (EL-DEIRY, 2003).

REVISÃO DA LITERATURA

1.1 MDM2

A p53 é uma proteína com potente atividade apoptótica e anti-proliferativa e conseqüentemente, seus altos níveis em células normais podem causar danos irreversíveis. Por este motivo os níveis de p53 na célula estão sob o rígido controle do regulador negativo MDM2 (*murine/human double minute 2 and 4*) via ubiquitinação. A p53 também regula a transcrição do MDM2 gerando uma regulação por feedback em que as duas proteínas mutuamente controlam seus níveis celulares (FICHER; LANE, 2004).

A p53 se liga ao gene promotor do MDM2, um dos seus diversos alvos, e regula sua expressão. Conforme o nível de MDM2 aumenta, ele se liga na p53 bloqueando seu sítio de ligação ao gene anteriormente citado e ainda marcando a p53 para degradação via ubiquitina-proteassoma (MICHAEL; OREN, 2003). Além disso, o MDM2 também age como ubiquitina ligase e sua ligação facilita a proteólise da p53 (FREEDMAN et al., 1999).

A ubiquitinação é mais do que um simples mecanismo de marcação das proteínas deformadas ou obsoletas para degradação. De fato, a ubiquitinação é um mecanismo altamente regulado, flexível e reversível, que pode sinalizar múltiplas respostas, desde a degradação, à mudança de atividade e a realocização de proteínas (PASSMORE; BARFORD, 2004, HOCK; VOUSDEN, 2014).

A chave para a regulação da p53 é o controle da sua estabilidade feita por uma rede de reações de ubiquitinação. Além disso, há evidências da degradação da p53 pelo proteassoma independente da ubiquitinação. Aumentos nos níveis da p53 em células em crescimento podem ser detectados, mas não levam a uma total ativação da resposta da p53. Este sistema permite o crescimento celular sob condições normais e garante uma rápida reação ao estresse que poderia causar danos à célula e ao organismo como um todo (HOCK; VOUSDEN, 2014).

Partindo da regulação mútua da p53 e do MDM2, tem-se que a inibição do MDM2 pode levar à restauração da atividade da p53. Em resposta ao dano ao DNA, a habilidade da p53 de se ligar ao MDM2 fica bloqueada. Esta resposta também pode ser observada em consequência à quimioterapia e radioterapia. Por causa desta regulação por feedback negativo, a alta expressão de MDM2 está presente em todas as células tumorais. Assim, a prevenção da ligação p53-MDM2 oferece um novo método de restaurar seletivamente as funções pró-apoptóticas da p53 em células cancerosas com altos níveis de MDM2, como ocorre principalmente em tumores dos tecidos moles como osteossarcomas e carcinomas esofágicos (MOMAND et al., 1998).

1.2 INIBIDORES DE MDM2

Inicialmente, foi pensado que a supressão da função do MDM2 poderia ser alcançada ao se bloquear diretamente a atividade de ubiquitina ligase desta proteína, ou indiretamente, utilizando-se inibidores de proteassoma que poderiam prevenir a degradação da p53. No entanto, nenhuma dessas estratégias demonstrou ter seletividade (TOLEDO; WAHL, 2007).

A primeira evidência de que o bloqueio da interação p53-MDM2 poderia levar ao efeito farmacológico desejado, envolveu um octapeptídeo derivado da p53 (GARCIA-ECHEVERRI et al., 2000). Contudo, apesar da sua alta afinidade pelo MDM2, este peptídeo demonstrou baixa potência no ambiente celular, devido à sua baixa permeabilidade à membrana (CHENE et al., 2000). Similarmente, um metabólito de fungo chamado de clorofusina demonstrou capacidade de inibir a interação p53-MDM2 *in vitro*, mas não apresentou essa capacidade *in vivo* (DUNCAN et al., 2001).

Em 2001, um modelo experimental para a pesquisa de moléculas que mimetizam a p53 se tornou possível pela descoberta de que a sequência helicoidal anfipática da extremidade N-terminal da p53 insere sua face hidrofóbica em um sulco profundo do MDM2 (Figura 2). O fato de apenas 3 resíduos de aminoácidos (Phe19, Trp23 e Leu26) interferirem na interação p53-MDM2 permitiu o estabelecimento deste modelo (GALATIN; ABRAHAM, 2001).

Somente a partir do trabalho de Vassilev et al. (2004) foi possível inibir a interação p53-MDM2 utilizando moléculas farmacologicamente viáveis-

imidazolinas tetrassubstituídas chamadas nutlins. Estes compostos podem ativar seletivamente a via de sinalização da p53 *in vitro* e *in vivo* em linhagens de tumores humanos que apresentam alta expressão de HDM2 (o tipo humano de MDM2) levando à inibição do crescimento celular e apoptose. Além disso, os autores demonstraram que a administração oral de 200 mg kg⁻¹ da mistura racêmica do nutlin 3 (Figura 3), duas vezes ao dia, por três semanas, levaram à total parada do crescimento do tumor em camundongos (modelo representativo de osteossarcoma humano linhagem SJSa-1) (VASSILEV et al., 2004).

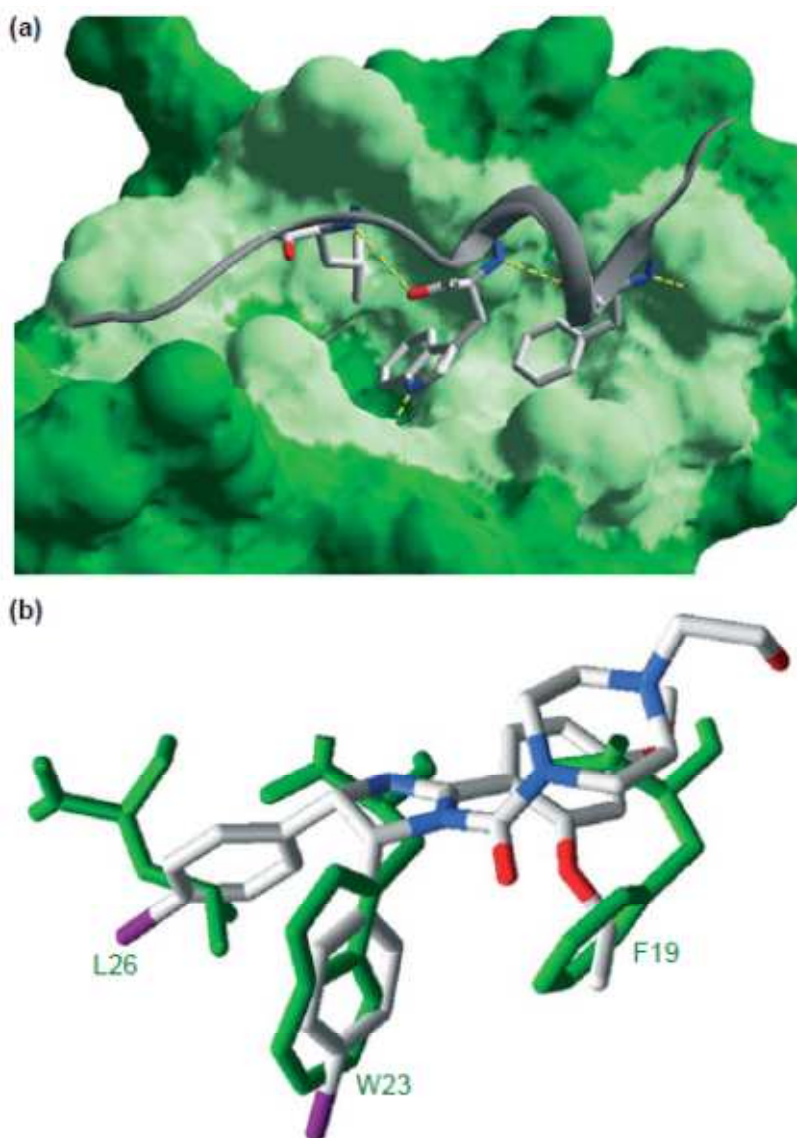


Figura 2 - Interação p53-HDM2. (a) A superfície da HDM2 é mostrada em verde; o sulco em que a ligação ocorre é definido pelos resíduos F19, W23 e L26 da p53 (cadeias laterais mostradas coloridas - C: cinza, N: azul, O: vermelho e Br: roxo). O peptídeo 17ETFSDLWKLLPEN29 da p53 é mostrado como uma fita cinza. Ligações de hidrogênio são indicadas por linhas amarelas pontilhadas. (b) O alinhamento do HDM2 com o nutlin, demonstra que este simula as interações naturais do HDM2 com a p53. Embora a ligação de hidrogênio da p53 W3 indol NH ao esqueleto carbônico do HDM2 L54 não seja mimetizado pelo nutlin 2, o grupo bromofenil correspondente ao indol, faz contato com o triptofano do HDM2 (FICHER; LANE, 2004).

Neste estudo, os nutlins demonstraram ser menos citotóxicos às linhagens celulares que contém a p53 mutante devido à sua seletividade particular à inibição da função supressora do MDM2 em contraste à inibição total da expressão desta proteína, como ocorre com outras substâncias testadas. Os efeitos farmacológicos dos nutlins sugerem que a inibição da interação p53-MDM2 poderá levar a terapias anticâncer seletivas (VASSILEV et al., 2004, VASSILEV, 2005).

1.3 NUTLINS

Nos últimos anos, vem aumentando o número de estudos em torno dos nutlins, pois estes protótipos podem deslocar a p53 do sítio de ligação do MDM2 *in vitro* em nanomols (IC_{50} = 90nM para o nutlin 3a, o enantiômero ativo do nutlin 3) (VASSILEV et al., 2004, GASPARINI et al., 2014, VAN MAERKEN et al., 2014).

Os nutlins se ajustam no sítio de ligação da p53 no inibidor MDM2 e inibe a interação das duas proteínas. Conseqüentemente, estas pequenas moléculas alcançaram o objetivo de inibir o crescimento de tumores em ratos. Alguns deles já estão em estudos clínicos fase 1 para tratar pacientes com neoplasias do sistema hematológico (VASSILEV et al., 2004, BARONE et al., 2014).

A inibição do antagonismo do MDM2 pelo nutlin-3a induz morte de células de meduloblastoma humano. Além de induzir apoptose nestas células, o nutlin-3a também potencializa a ativação da p53 e impede o crescimento de células tumorais quando combinado com o agente doxorubicina, um fármaco amplamente utilizado na quimioterapia (GHASSEMIFAR; MENDRYSA, 2012).

Porém a inibição do MDM2 não é o único mecanismo de ação dos nutlins. Shin et al. (2012) monitoraram a ligação do nutlin-3 com a família de proteínas antiapoptóticas Bcl-2 utilizando espectroscopia NMR. Os resultados deste estudo demonstraram que o nutlin-3 tem a capacidade de inibir diversas proteínas Bcl-2. A comparação estrutural feita fornece conhecimentos sobre o duplo mecanismo de ligação do nutlin-3 ao MDM2 e às proteínas Bcl-2 de modo semelhante.

Um estudo recente discute a relação do nutlin-3a com o sistema imune e demonstra que esta molécula afeta levemente os níveis do complexo principal de histocompatibilidade e estimula significativamente a produção de linfócitos T. Esta habilidade do nutlin-3a de estimular a proliferação de linfócitos representa

um mecanismo de ação adicional em que o nutlin exerce sua atividade de supressor tumoral (GASPARINI; TOMMASINI, 2012).

Apesar de vários estudos mostrarem a grande importância da regulação da p53 pelo MDM2, evidências sugerem que este inibidor pode não ser o único. Três outras proteínas PIRH2, COP1 e ARF-BP1 têm ação de p53 ubiquitina-ligase. PIRH2 foi identificada como uma proteína que contém o domínio RING-H2 e pode promover a ubiquitinação e degradação da p53 independente da MDM2 (LENG et al., 2003). Sua regulação pela p53 é semelhante ao feedback já descrito para a MDM2. A COP1 também demonstra capacidade de ubiquitinar e causar a degradação da p53 (DORNAN et al., 2004).

O papel dessas proteínas na regulação da p53 na presença de MDM2 ainda não está completamente entendida, porém pode-se afirmar que nenhuma dessas ubiquitina-ligases podem substituir o MDM2 na regulação da p53 (TOLEDO; WAHL, 2007).

As integrinas são entendidas hoje como responsáveis pela agressividade do tumor e resistência às terapias. A integrina $\alpha 5\beta 1$, um receptor de fibronectina, determina a malignidade do carcinoma de colon, que é uma das causas de morte relacionadas ao câncer mais importantes no mundo. Janouskova et al. (2013) evidenciaram que a reativação farmacológica da p53 pelo nutlin-3a inibe especificamente a expressão a subunidade $\alpha 5$ desta integrina. Inversamente, a repressão da integrina $\alpha 5$ modula a atividade da p53. Foi demonstrada uma clara relação entre a ativação da p53 pelo nutlin-3a, a repressão da $\alpha 5$ e a sobrevivência da célula.

Estudo de Hori et al. (2010) demonstrou que o nutlin-3 estimula a produção do fator de necrose tumoral relacionada com indutor de apoptose pelo aumento da regulação do receptor (DR5) em células HOS de sarcoma humano e cancro do cólon humano HCT-116.

A radiorresistência permanece como uma barreira fundamental que limita a eficácia da radioterapia no tratamento do câncer. Evidências recentes sugerem que a radiorresistência envolve várias vias de sinalização, incluindo a p53/MDM2. A radiação ionizante induz a via p53-MDM2 dependente da transcrição do gene que, por sua vez, inibe a atividade de transcrição de p53, favorecendo a sua exportação nuclear e estimulando a sua degradação. Resultados promissores

surgiram recentemente em estudos *in vitro* realizados em laringe, próstata e as linhas de células de cancro do pulmão de camundongos tratados com nutlin em combinação com radiação ionizante. Com base nestes resultados, acredita-se que a abordagem combinada nutlin/radiação ionizante deve ser investigada quanto à eficácia em ambos os tumores sólidos e doenças linfoproliferativas, bem como os efeitos secundários sobre as células e tecidos normais (LUO et al., 2013).

A radioterapia é utilizada rotineiramente para o tratamento de câncer de pulmão. No entanto, os mecanismos pelos quais a radiação induz a senescência e seu papel no tratamento do câncer de pulmão são fracamente entendidos. Luo et al. (2013) demonstram como a radiação ionizante suprime a proliferação de células cancerosas do pulmão por um mecanismo independente de apoptose e como a ativação farmacológica pelo nutlin-3a pode sensibilizar células tumorais pulmonares.

São vários os estudos que apontam como os nutlins demonstram eficácia contra linhagens tumorais específicas. Porém, um estudo recente de Ma et al. (2012) chama a atenção para uma possível limitação do poder antitumoral deste protótipo. A desregulação da fosforilação nas células tumorais pode limitar a eficácia das terapias baseadas na restauração da atividade da p53. Isto acontece porque a fosforilação da p53 em Ser46 (p53Ser46) é considerada uma modificação importante que regula a apoptose mediada por p53. O nutlin-3 falhou em induzir apoptose em células com fosforilação p53Ser46 deficiente. Este resultado indica que o nutlin-3 é inapto a induzir apoptose via p53 na ausência da fosforilação p53Ser46.

Os inibidores de MDM2 representam uma classe promissora de ativadores da p53 que podem se tornar fármacos efetivos no tratamento do câncer e também no diagnóstico por imagem (GHOSH et al., 2013).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os nutlins previnem a interação do MDM2 com a p53, impedindo a regulação negativa da p53 pelo MDM2. Prevenir esta interação é um desafio já que geralmente as interações proteína-proteína envolvem grandes superfícies de contato, difíceis de serem separadas por moléculas de baixa massa molecular.

Porém, no caso da interação do MDM2 com a p53, foi demonstrado que um pequeno número de resíduos de aminoácidos são essenciais para manter esta ligação e, por esta razão, os nutlins surgem como protótipos de alta eficácia no combate a células cancerosas.

REFERÊNCIAS

- ALCORTA, D. A.; XIONG, Y.; PHELPS, D.; HANNON, G.; BEACH, D.; BARRETT, J. C. Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, p. 13742–13747, 1996.
- BARONE, G.; TWEDDLE, D. A.; SHOHET, J. M.; CHESLER, L.; MORENO, L.; PEARSON, A. D. J.; VAN MAERKEN, T. MDM2-p53 Interaction in Paediatric Solid Tumours: Preclinical Rationale, Biomarkers and Resistance. **Current Drug Targets**, v. 15, p. 114-123, 2014.
- BÖTTGER, A.; BÖTTGER, V.; SPARKS, A.; LIU, W. L.; HOWARD, S. F.; LANE, D. P. Design of a synthetic Mdm2-binding mini protein that activates the p53 response in vivo. **Current Biology**, v. 07, n. 01, p. 860–869, 1997.
- CAMPISI, J. Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism. **Trends in Cell Biology**, v. 11, p. S27–S31, 2001.
- CHEN, F.; WANG, W.; EL-DEIRY, W. S. Current strategies to target p53 in cancer. **Biochemical Pharmacology**, v. 80, p. 724–730, 2010.
- CHENE, P.; FUCHS, I.; CARENA, P.; GARCIA-ECHEVERRIA, F.; GARCIA-ECHEVERRIA, C. A small synthetic peptide, which inhibits the p53–hdm2 interaction, stimulates the p53 pathway in tumour cell lines. **Journal of Molecular Biology**, v. 299, p. 245–253, 2000.
- DORNAN, D.; WERTZ, I.; SHIMIZU, H.; ARNOTT, D.; FRANTZ, G. D.; DOWD, P.; O'ROURKE, K.; KOEPPEN, H.; DIXIT, V. M. The ubiquitin ligase COP1 is a critical negative regulator of p53. **Nature**, v. 429, p. 86–92, 2004.
- DOTTO, G. P. p21(WAF1/Cip1): more than a break to the cell cycle? **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1471, p. M43–M56, 2000.
- DUNCAN, S. J.; GRUESCHOW, S.; WILLIAMS, D. H.; MCNICHOLAS, C.; PUREWAL, R.; HAJEK, M.; GERLITZ, M.; MARTIN, S.; WRIGLEY, S. K.; MOORE, M. Isolation and structure elucidation of chlorofusin, a novel p53-MDM2 antagonist from a *Fusarium* sp. **Journal of the American Chemical Society**, v. 123, p. 554–560, 2001.
- EL-DEIRY, W. S. The role of p53 in chemosensitivity and radiosensitivity. **Oncogene**, v. 22, p. 7486–95, 2003.
- ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicologic Pathology**, v. 35, n. 04, p. 495–516, 2007.
- FISCHER, P. M.; LANE, D. P. Small-molecule inhibitors of the p53 suppressor HDM2: have protein-protein interactions come of age as drug targets? **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 25, n. 07, p. 343–346, 2004.
- FREEDMAN, D. A.; WU, L.; LEVINE, A. J. Functions of the MDM2 oncoprotein. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 55, p. 96–107, 1999.
- FRITSCH, M.; HAESSLER, C.; BRANDNER, G. Induction of nuclear accumulation of the tumor-suppressor protein p53 by DNA damaging agents. **Oncogene**, v. 8, p. 307–318, 1993.
- GALATIN, P. S.; ABRAHAM, D. J. QSAR: hydrophobic analysis of inhibitors of the p53–MDM2 interaction. **Proteins**, v. 45, p. 169–175, 2001.
- GHASSEMIFAR, S.; MENDRYSA, S. M. MDM2 antagonism by nutlin-3 induces death in human medulloblastoma cells. **Neuroscience Letters**, v. 513, p. 106–110, 2012.

- GARCIA-ECHEVERRIA, C.; CHENE, P.; BLOMMERS, M. J.; FURET, P. Discovery of potent antagonists of the interaction between human doubleminute 2 and tumor suppressor p53. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, p. 3205–3208, 2000.
- GASPARINI, C.; CELEGHINI, C.; MONASTA, L.; ZAULI, G. NF- κ B pathways in hematological malignancies. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 71, p. 2083–2102, 2014.
- GASPARINI, C.; TOMMASINI, A. The MDM2 inhibitor Nutlin-3 modulates dendritic cell-induced T cell proliferation. **Human Immunology**, v. 73, p. 342–345, 2012.
- GHOSH, P.; ZHANG, J.; SHI, Z. Z.; LI, K. Synthesis and evaluation of an imidazole derivative–fluorescein conjugate. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 21, p. 2418–2425, 2013.
- HAINAUT, P. P.; HOLLSTEIN, M. p53 and human cancer: the first ten thousand mutations. **Advances in Cancer Research**, v. 77, p. 81–137, 2000.
- HOCK, A. K.; VOUSDEN, K. H. The role of ubiquitin modification in the regulation of p53. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1843, p. 137–149, 2014.
- HORI, T.; KONDO, T.; KANAMORI, M.; TABUCHI, Y.; OGAWA, R.; ZHAO, Q. L.; AHMED, K.; YASUDA, T.; SEKI, S.; SUZUKI, K.; KIMURA, T. Nutlin-3 enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis through up-regulation of death receptor 5 (DR5) in human sarcoma HOS cells and human colon cancer HCT116 cells. **Cancer Letters**, v. 287, p. 98–108, 2010.
- JANOUSKOVA H.; RAY, A. N.; NOULET, F.; LELONG-REBEL, I.; CHOULIER, L.; SCHAFFNER, F.; LEHMANN, M.; MARTIN, S.; TEISINGER, J.; DONTENWILL, M. Activation of p53 pathway by Nutlin-3a inhibits the expression of the therapeutic target $\alpha 5$ integrin in colon cancer cells. **Cancer Letters**, v. 336, p. 307–318, 2013.
- KASTAN, M. B.; ONYEKWERE, O.; SIDRANSKY, D.; VOGELSTEIN, B.; CRAIG, R. W. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. **Cancer Research**, v. 51, p. 6304–6311, 1991.
- LANE, D. P. p53, guardian of the genome. **Nature**, v. 358, p. 15–16, 1992.
- LENG, R. P.; LIN, Y.; MA, W.; WU, H.; LEMMERS, B.; CHUNG, S.; PARANT, J. M.; LOZANO, G.; HAKEM, R.; BENCHIMOL, S. Pirh2, a p53-induced ubiquitin-protein ligase, promotes p53 degradation. **Cell**, v. 112, p. 779–791, 2003.
- LUO, H.; YOUNTB, C.; LANGA, H.; YANGA, A.; RIEMERA, E. C.; LYONSB, K.; VANEKB, K. N.; SILVESTRIC, G. A.; SCHULTEA, B. A.; WANGA, G. Y. Activation of p53 with Nutlin-3a radiosensitizes lung cancer cells via enhancing radiation-induced premature senescence. **Lung Cancer**, v. 81, p. 167–173, 2013.
- MAGNELLI, L.; CINELLI, M.; CHIARUGI, V. Phorbol esters attenuate the expression of p53 in cells treated with doxorubicin and protect TS-P53/K562 from apoptosis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 215, p. 641–645, 1995.
- MALTZMAN, W.; CZYZYK, L. UV irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells. **Molecular and Cellular Biology**, v. 4, p. 1689–1694, 1984.
- MEPLAN, C.; MANN, K.; HAINAUT, P. Cadmium induces conformational modifications of wild-type p53 and suppresses p53 response to DNA damage in cultured cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 31663–31670, 1999.
- MESSMER, U. K.; BRUNE, B. Nitric oxide (NO) in apoptotic versus necrotic RAW 264.7 macrophage cell death: the role of NO-donor exposure, NAD 1 content, and p53 accumulation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 327, p. 1–10, 1996.
- MICHAEL, D.; OREN, M. The p53–Mdm2 module and the ubiquitin system. **Seminars in Cancer Biology**, v. 13, p. 49–58, 2003.
- MOLL, U. M.; WOLFF, S.; SPEIDEL, D.; DEPPERT, W. Transcription-independent pro-apoptotic functions of p53. **Curr. Opin. Cell Biology**, v. 17, p. 631–636, 2005.
- Momand, J.; Jung, D.; Wilczynski, S.; Niland, J. The MDM2 gene amplification database. **Nucleic Acids Research**, v. 26 p. 3453–3459, 1998.
- NELSON, W. G.; KASTAN, M. B. DNA strand breaks: the DNA template alterations that trigger p53- dependent DNA damage response pathways. **Molecular and Cellular Biology**, v. 14, p. 1815–1823, 1994.

- OREN, M. Regulation of the p53 tumor suppressor protein. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 36031–36034, 1999.
- PASSMORE, L. A.; BARFORD, D. Getting into position: the catalytic mechanisms of protein ubiquitylation. **Biochemical Journal**, v. 379, p. 513–525, 2004.
- PLUQUET, O.; HAINAUT, P. Genotoxic and non-genotoxic pathways of p53 induction. **Cancer Letters**, v. 174, p. 1–15, 2001.
- RAMET, M.; CASTREN, K.; JARVINEN, K.; PEKKALA, K.; TURPEENNIEMI-HUJANEN, T.; SOINI, Y.; PAAKKO, P.; VAHAKANGAS, K. p53 protein expression is correlated with benzo[a]pyrene-DNA adducts in carcinoma cell lines. **Carcinogenesis**, v. 16, p. 2117–2124, 1995.
- RAO, B.; LAIN, S.; THOMPSON, A. M. p53-Based cyclotherapy: exploiting the ‘guardian of the genome’ to protect normal cells from cytotoxic therapy. **British Journal of Cancer**, v. 109, p. 2954–2958, 2013.
- RONINSON, I. B. Tumor Cell Senescence in Cancer Treatment. **Cancer Research**, v. 63, p. 2705–2715, 2003.
- SAHA, M. N.; Qiu, L.; Chang, H. Targeting p53 by small molecules in hematological malignancies. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 6, n. 23, p. 1–9, 2013.
- SHIN, J. S.; HA, J. H.; HE, F.; MUTO, Y.; RYU, K. S.; YOON, H. S.; KANG, S.; PARK, S. G.; PARK, B. C.; CHOI, S. U.; CHI, S. W. Structural insights into the dual-targeting mechanism of Nutlin-3. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 420, p. 48–53, 2012.
- MA, T.; YAMADA, S.; ICHWAN, S. J. A.; ISEKI, S.; OHTANI, K.; OTSU, M.; IKEDA, M. A. Inability of p53-reactivating compounds Nutlin-3 and RITA to overcome p53 resistance in tumor cells deficient in p53^{Ser46} phosphorylation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 417, p. 931–937, 2012.
- TEOH, P. J.; CHNG, W. J. p53 Abnormalities and Potential Therapeutic Targeting in Multiple Myeloma. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–9, 2014.
- TISHLER, R. B.; CALDERWOOD, S. K.; COLEMAN, C. N.; PRICE, B. D. Increases in sequence specific DNA binding by p53 following treatment with chemotherapeutic and DNA damaging agents. **Cancer Research**, v. 53, p. 2212–2216, 1993.
- TOLEDO, F.; WAHL, G. M. MDM2 and MDM4: p53 regulators as targets in anticancer therapy. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p. 1476–1482, 2007.
- VAN MAERKEN, T.; RIHANI, A.; VAN GOETHEM, A.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F.; VANDESOMPELE, J. Pharmacologic activation of wild-type p53 by nutlin therapy in childhood cancer. **Cancer Letters**, v. 344, p. 157–165, 2014.
- VASSILEV, L. T. p53 Activation by Small Molecules: Application in Oncology. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, n. 14, 2005.
- VASSILEV, L.T.; VU, B.T.; GRAVES, B.; CARVAJAL, D.; PODLASKI, F.; FILIPOVIC, Z.; et al. In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. **Science**, v. 303, p. 844–8, 2004.
- VENTURA, A.; KIRSCH, D.G.; MCLAUGHLIN, M.E.; TUVESON D.A.; GRIMM, J.; LINTAULT, L.; et al. Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo. **Nature**, v. 445, p. 661–5, 2007.
- VOUSDEN, K.H.; LU, X. Live or let die: the cell’s response to p53. **Nature Reviews Cancer** v. 2, p. 594–604, 2002.
- VOUSDEN, K.H.; PRIVES, C. Blinded by the light: the growing complexity of p53. **Cell**, v. 137, p. 413–431, 2009.
- YAMAIZUMI, M.; SUGANO, T. Uv.-induced nuclear accumulation of p53 is evoked through DNA damage of actively transcribed genes independent of the cell cycle. **Oncogene**, v. 9, p. 2775–2784, 1994.