



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS
NÚCLEO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS
LABORATÓRIO DE FARMACOGENÉTICA

JULIO PAULINO DANIEL

**ESTUDO *IN SILICO* E *IN VITRO* DO REDIRECIONAMENTO FARMACOLÓGICO
DE UM BENZIMIDAZOL PARA O TRATAMENTO DE LEUCEMIA MIELÓIDE
CRÔNICA QUIMIORRESISTENTE**

FORTALEZA

2021

JULIO PAULINO DANIEL

ESTUDO *IN SILICO* E *IN VITRO* DO REDIRECIONAMENTO FARMACOLÓGICO
DE UM BENZIMIDAZOL PARA O TRATAMENTO DE LEUCEMIA MIELÓIDE
CRÔNICA QUIMIORRESISTENTE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas. Área de concentração: Biomedicina.

Orientador: Profa. Dra. Raquel Carvalho Montenegro.

Coorientador: Prof. Dr. Geancarlo Zanatta.

FORTALEZA

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

D185e Daniel, Julio Paulino.

Estudo in silico e in vitro do redirecionamento farmacológico de um benzimidazol para o tratamento de Leucemia Mielóide Crônica quimiorresistente / Julio Paulino Daniel. – 2021.
62 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Fortaleza, 2021.

Orientação: Prof. Dr. Raquel Carvalho Montenegro.

Coorientação: Prof. Dr. Geancarlo Zanatta.

1. Reposicionamento de Medicamentos. 2. Benzimidazóis. 3. Antineoplásicos. I. Título.

CDD 610

JULIO PAULINO DANIEL

ESTUDO *IN SILICO* E *IN VITRO* DO REDIRECIONAMENTO FARMACOLÓGICO
DE UM BENZIMIDAZOL PARA O TRATAMENTO DE LEUCEMIA MIELÓIDE
CRÔNICA QUIMIORRESISTENTE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas. Área de concentração: Biomedicina.

Aprovada em: ___ / ___ / ____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Raquel Carvalho Montenegro (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Caroline de Fátima Aquino Moreira Nunes
Centro Universitário Christus (Unichristus)

Prof. Dr. Pedro Filho Noronha de Souza
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

A minha família.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, por sempre estar comigo em todos os momentos e por me permitir concluir o mestrado. A Igreja e a Obra Lumen por me ajudarem a estar mais perto d'Ele e me ajudar a ser um homem melhor.

A minha avó, Hermisa, minha mãe, Jaquelline, meus tios, Cesar e Joselita, minha irmã, Clara, e minha namorada, Lorena, por serem apoio e razão.

A Profa. Dra. Raquel Carvalho Montenegro, pela orientação e por todo apoio e dedicação para que eu tivesse acesso as melhores oportunidades, e ao Prof. Dr. Geancarlo Zanatta, pela parceria e coorientação do projeto.

Ao Prof. Dr. Pedro Filho Noronha de Souza e a Profa. Dra. Caroline de Fátima Aquino Moreira Nunes, pelo precioso tempo e dedicação ao participar da banca de avaliação do projeto.

À CAPES, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio, e ao Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM), a unidade multiusuário e seus colaboradores por todo esforço e suporte nos experimentos.

A todos os membros e colegas do Laboratório de Farmacogenética, por tudo que me ensinaram e por todos os momentos de alegria durante a rotina do laboratório. Dra. Caroline, Felipe, Emerson, Luina, Lais, Adrhyann, Aline, Livia e Beatriz, vocês tornaram os dias do mestrado mais agradáveis.

“É justo que muito custe o que muito vale
- Santa Teresa D'Ávila

RESUMO

A Leucemia Mielóide Crônica (LMC) é uma neoplasia dentre as mais comuns para pacientes adultos e a quimioterapia dessa doença enfrenta a problemática da quimiorresistência. O redirecionamento e a combinação de fármacos são ferramentas poderosas nesse contexto e que trazem atenção para famílias de compostos como os benzimidazóis, conhecida pelo efeito antiparasitário, mas que já possui estudos para algumas neoplasias. Assim, o presente trabalho tem como objetivo atestar o potencial citotóxico de um derivado de benzimidazol isolado e em combinação com fármacos usados no tratamento da LMC sensível e resistente. Vale destacar que o nome do composto em estudo será mantido em sigilo até a obtenção de sua proteção legal, permanecendo sobre o acrônimo de BNZ para tanto. Dessa forma, foi realizado o ensaio de viabilidade celular por *Alamar blue* dos tratamentos, além da avaliação da integridade de membrana celular e potencial de membrana mitocondrial, pela dupla marcação IP/Rho123, e a análise de ciclo célula por citometria. Ademais, foi feita a busca *in silico* das características farmacocinéticas e farmacodinâmicas, com os servidores admetSAR, Molinspiration e SwissTarget Prediction, bem como a ancoragem molecular com o Autodock 4.2.6. O BNZ isolado apresentou IC₅₀ de 106 nM para a linhagem sensível (K562) e 1917 nM para a resistente (FEPS). A combinação com o Imatinibe proporcionou um índice de redução de dose de 6 vezes para o fármaco isolado, demonstrando a eficácia dessa combinação. A citometria revelou que o BNZ isolado e sua combinação com Imatinibe reduziu a porcentagem de células nas fases G0/G1, sugerindo um araste para a fase Sub-G1. Além disso, o ensaio de dupla marcação evidenciou uma redução na quantidade de células viáveis e um aumento na população de células em apoptose tardia/necrose para os tratamentos com BNZ. Os ensaios *in silico* revelaram a proteína ABL1 como um alvo potencial do BNZ. O *docking* molecular frente a 3 estruturas da ABL1 depositadas no banco de dados de estruturas de proteínas (PDBID: 2GQG, 2HYY e 5MO4), por meio do Autodock 4.2.6, apresentou melhores resultados para o sítio alostérico (2GQG: -7,04 kcal/mol; 2HYY: -8,9 kcal/mol; 5MO4: -6,98 kcal/mol). Essa metodologia também destacou os resíduos Ala433, Glu462 e Gly463 como os principais para a interação com o BNZ no sítio alostérico. Portanto, até o presente momento os achados desse trabalho sugerem o potencial anticâncer do BNZ na LMC por meio da sua interação com a proteína ABL1, bem como seu efeito sinérgico na combinação com o Imatinibe e Dasatinibe.

Palavras-chave: Reposicionamento de Medicamentos. Benzimidazóis. Antineoplásicos.

ABSTRACT

Chronic Myeloid Leukemia (CML) is a neoplasm among the most common for adult patients and the chemotherapy of this disease faces the problem of chemoresistance. Redirection and drug combination are powerful tools in this context and bring attention to families of compounds such as benzimidazoles, known for their antiparasitic effect, but which has already been studied for some neoplasms. Thus, the present work aims to attest to the cytotoxic potential of a benzimidazole derivative isolated and in combination with drugs used in the treatment of sensitive and resistant CML. It is worth mentioning that the name of the compound under study will be kept confidential until obtaining its legal protection, remaining on the acronym of BNZ for that purpose. Thus, the cell viability assay by *Alamar blue* of the treatments was carried out, in addition to the assessment of cell membrane integrity and mitochondrial membrane potential, by double marking IP / Rho123, and the analysis of cell cycle by cytometry. In addition, an *in silico* search for pharmacokinetic and pharmacodynamic characteristics was carried out, with the servers admetSAR, Molinspiration and SwissTarget Prediction, as well as molecular anchoring with Autodock 4.2.6. The isolated BNZ showed an IC₅₀ of 106 nM for the sensitive strain (K562) and 1917 nM for the resistant strain (FEPS). The combination with Imatinib provided a 6-fold dose reduction index for the drug alone, demonstrating the effectiveness of this combination. Cytometry revealed that the isolated BNZ and its combination with Imatinib reduced the percentage of cells in the G₀ / G₁ phases, suggesting a washer for the Sub-G₁ phase. In addition, the double label assay showed a reduction in the number of viable cells and an increase in the population of cells in late apoptosis / necrosis for treatments with BNZ. *In silico* assays revealed the ABL1 protein as a potential target for BNZ. Molecular docking against 3 ABL1 structures deposited in the protein structure database (PDBID: 2GQG, 2HYY and 5MO4), using Autodock 4.2.6, presented better results for the allosteric site (2GQG: -7.04 kcal / mol; 2HYY: -8.9 kcal / mol; 5MO4: -6.98 kcal / mol). This methodology also highlighted residues Ala433, Glu462 and Gly463 as the main ones for the interaction with BNZ at the allosteric site. Therefore, to date, the findings of this study suggest the anticancer potential of BNZ in CML through its interaction with ABL1 protein, as well as its synergistic effect in combination with Imatinib and Dasatinib.

Keywords: Drug Repositioning. Benzimidazoles. Antineoplastic Agents.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Característica fisiológicas do câncer.....	16
Figura 2 – Ciclo celular	17
Figura 3 – Vias da apoptose.....	18
Figura 4 – Estimativa do número de pessoas com leucemia até 2040.	20
Figura 5 – Inibidores de tirosina-quinase para o tratamento da LMC.....	24
Figura 6 – Benzimidazóis com potencial antileucêmico.	26
Figura 7 – Predição de alvos moleculares segundo o servidor SwissTarget Prediction.	43
Figura 8 – Estruturas da proteína ABL1 utilizadas durante as simulações de ancoramento molecular.	44
Figura 9 – Posição final dos ligantes gerada pelo software autodock 4.2.1 para o sítio alostérico e o sítio de ligação ao ATP das estruturas selecionadas.	45

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 2 – Fragmentação e ciclo celular da linhagem K562 após o tratamento com BNZ e TKI's isolados e em combinação após 72h.....	37
Gráfico 3 – Fragmentação e ciclo celular da linhagem FEPS após o tratamento com BNZ e TKI's isolados e em combinação após 72h.....	38
Gráfico 4 – Efeitos do BNZ, TKI's e suas combinações na membrana plasmática e função mitocondrial da linhagem K562.....	39
Gráfico 5 – Efeitos do BNZ, TKI's e suas combinações na membrana plasmática e função mitocondrial da linhagem FEPS.	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentração inibitória (IC_{50}) e o índice de resistência (RI) dos derivados e dos TKI's isolados e em combinação nas linhagens K562 e FEPS após 72h.	36
Tabela 2 – Índice de combinação (CI) e índice de redução de dose (DRI) para as combinações nas linhagens K562 e FEPS.	37
Tabela 3 – Características farmacocinéticas segundo o admetSAR 2.0.	41
Tabela 4 – Predição da função biológica pelo servidor Molinspiration.	42
Tabela 5 – Coordenadas do grid box para o Autodock 4.2.1	45
Tabela 6 – Valores de energia de ligação (ΔG) e IC_{50} dos dockings para o sítio de ligação ao ATP da proteína ABL1.	46
Tabela 7 – Valores de energia de ligação (ΔG) e IC_{50} dos dockings para o sítio alostérico da proteína ABL1.	46
Tabela 8 – Potenciais ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas entre o BNZ e o sítio alostérico da proteína ABL1	47
Tabela 9 – Consenso dos resíduos das ligações de hidrogênio envolvidas com o controle e o BNZ.	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Å	Angstrom
ADMET	Absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade
ALB	Albendazol
ASC	Asciminibe
BNZ	Derivado de benzimidazol
CADD	<i>Computer-aided Drug Design</i>
Casp	Caspase
CI	Índice de combinação
DAS	Dasatinibe
<i>decoy</i>	Ligante falso positivo
DMSO	Dimetilsufóxido
<i>docking</i>	Ancoragem molecular
DR	Receptores de morte
DRI	Índice de redução de dose
EBI	<i>European Bioinformatics Institute</i>
Fa 0,5	Fração referente a IC ₅₀
FEPS	Linhagem de LMC quimiorresistente
G0	Quiescência
G1	Pré-síntese
G2	pré-mitótica
h	Horas
IC ₅₀	Concentração Inibitória em 50% da atividade
IMA	Imatinibe
IP	Iodeto de propídeo
ITKs	Inibidores de tirosina quinase
K562	Linhagem de LMC sensível
kcal	Quilocaloria
LLA	Leucemia Linfóide Aguda
LLC	Leucemia Linfóide Crônica
LMA	Leucemia Mieloide Aguda
LMC	Leucemia Mieloide Crônica

LNCC	Laboratório Nacional de Computação Científica
M	Mitótica
MBZ	Mebendazol
mL	Mililitro
mol	Mol
NCBI	<i>National Center of Biotechnology Information</i>
nM	Nanomolar
nm	Nanometro
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
pro-Casp	Pró-caspase
QSAR	<i>Quantitative structure-activity relationships</i>
Rho123	Rodamina 123
RI	Índice de resistência
S	Síntese de DNA
SIB	<i>Swiss Institute of Bioinformatics</i>
ug	Micrograma
uM	Micromolar
ΔG	Energia de ligação em kcal/mol

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	16
1.1	Leucemia Mieloide Crônica	19
1.1.1	<i>Fatores genéticos</i>	20
1.1.2	<i>Linhagens celulares</i>	22
1.1.3	<i>Inibidores de tirosina quinase</i>	23
1.2	Reposicionamento farmacológico	25
1.3	Ferramentas computacionais	27
1.3.1	<i>Farmacocinética e farmacodinâmica</i>	28
2	OBJETIVOS	30
2.1	Objetivo Geral	30
2.2	Objetivos Específicos	30
3	MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1	Compostos estudados	31
3.2	Avaliação <i>in silico</i> do perfil farmacocinético e farmacodinâmico	31
3.3	Obtenção das estruturas moleculares	31
3.4	Preparação das estruturas moleculares	32
3.5	Ancoragem molecular	32
3.6	Linhagens celulares e cultivo	33
3.7	Ensaio de viabilidade por <i>Alamar Blue</i>	33
3.8	Análise da resistência e das combinações	33
3.9	Avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo	34
3.10	Avaliação da integridade da membrana celular e potencial da membrana mitocondrial	34
3.11	Análise estatística	35
4	RESULTADOS	36
4.1	Citotoxicidade <i>in vitro</i>	36

4.2	Avaliação da fragmentação e alterações no ciclo celular	37
4.3	Avaliação da integridade da membrana celular e potencial da membrana mitocondrial.....	38
4.4	Predição das propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas.....	40
4.5	Estudo <i>in silico</i> via ancoramento molecular	43
4.	DISCUSSÃO	49
5.	CONCLUSÕES.....	53
	ANEXO I – SUMÁRIO DE INTERAÇÕES DO ASC E A PROTEÍNA ALB1	59
	ANEXO II – SUMÁRIO DE INTERAÇÕES DO BNZ E A PROTEÍNA ABL1	61

1. INTRODUÇÃO

Câncer é o conjunto de doenças em que células do corpo perderam a capacidade de controlar o crescimento e a divisão celular, tendendo a se espalhar em tecidos ou órgãos vizinhos (HANAHAN; WEINBERG, 2000, 2011). Causas extrínsecas, relacionadas ao ambiente, hábito e costumes socioculturais, juntamente com causas intrínsecas, associadas a mutações genéticas, alterações imunológicas e metabólicas, acarretam mudanças em genes responsáveis pelas características celulares normais, prejudicando seu funcionamento normal (BLACKADAR, 2016; OMS, 2014).

Geralmente caracterizadas como doenças genéticas, no câncer, células saudáveis adquirem novas características, que levam ao desenvolvimento tumoral (*Figura 1*). A autossuficiência nos fatores de crescimento e insensibilidade aos seus inibidores, bem como a evasão da apoptose, progressão da angiogênese, invasão tecidual e metástase, e potencial de replicação ilimitado, são características chave (HANAHAN; WEINBERG, 2000). Além disso, a instabilidade genética, juntamente com a inflamação tumoral, alterações no metabolismo e evasão de mecanismos imunológicos, contribuem para um microambiente propício ao desenvolvimento tumoral (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Figura 1 – Características fisiológicas do câncer



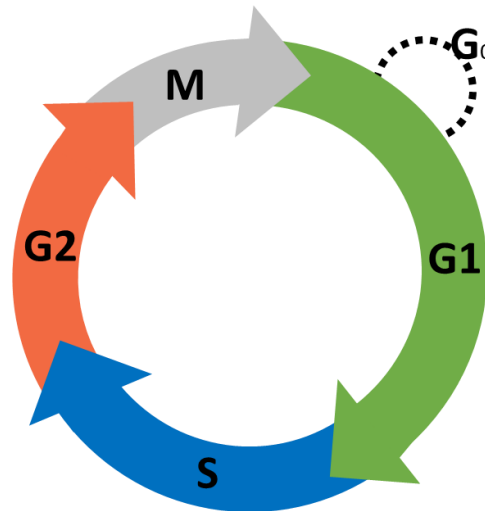
Fonte: Adaptado de Hanahan e Weinberg, 2011.

A carcinogênese possui diversas etapas, que podem ser divididas em 3 estágios principais: a iniciação, com atuação de agentes cancerígenos sobre os genes, provocando mutações; a promoção, em que as células transformadas lentamente se tornam malignas devido a ação dos oncopromotores; e a progressão, com a multiplicação desordenada das células

mutantes refletindo na lesão pré-maligna e o desenvolvimento da metástase, onde as células se disseminam a partir do tumor primário (BALMAIN; YUSPA, 2014; MOOLGAVKAR; LUEBECK, 2003).

A multiplicação desordenada é uma característica das alterações que ocorrem no ciclo celular (Figura 2), que juntamente com a instabilidade genômica levam a aquisição de novas características pelas células tumorais. O ciclo é composto pelas fases G1 (pré-síntese), S (síntese de DNA), G2 (pré-mitótica) e M (mitótica), que em situações de homeostase são regulados por proteínas de checagem (proteínas *checkpoints*), responsáveis por reportar erros à maquinaria de morte celular durante todo processo de divisão (OTTO; SICINSKI, 2017). Além disso, células podem não estar em divisão, em uma fase chamada G0 (quiescência), podendo entrar no ciclo celular diante de algum estímulo. Assim, no câncer estímulos podem forçar células quiescentes a entrarem no ciclo celular, bem como mutações vão se acumulando e alterando a expressão de genes necessários para manutenção da ordem do ciclo e reparo, ocasionando a sobrevivência de células com as novas características (ABBAS, 2012; WILLIAMS; STOEBER, 2012)

Figura 2 – Ciclo celular

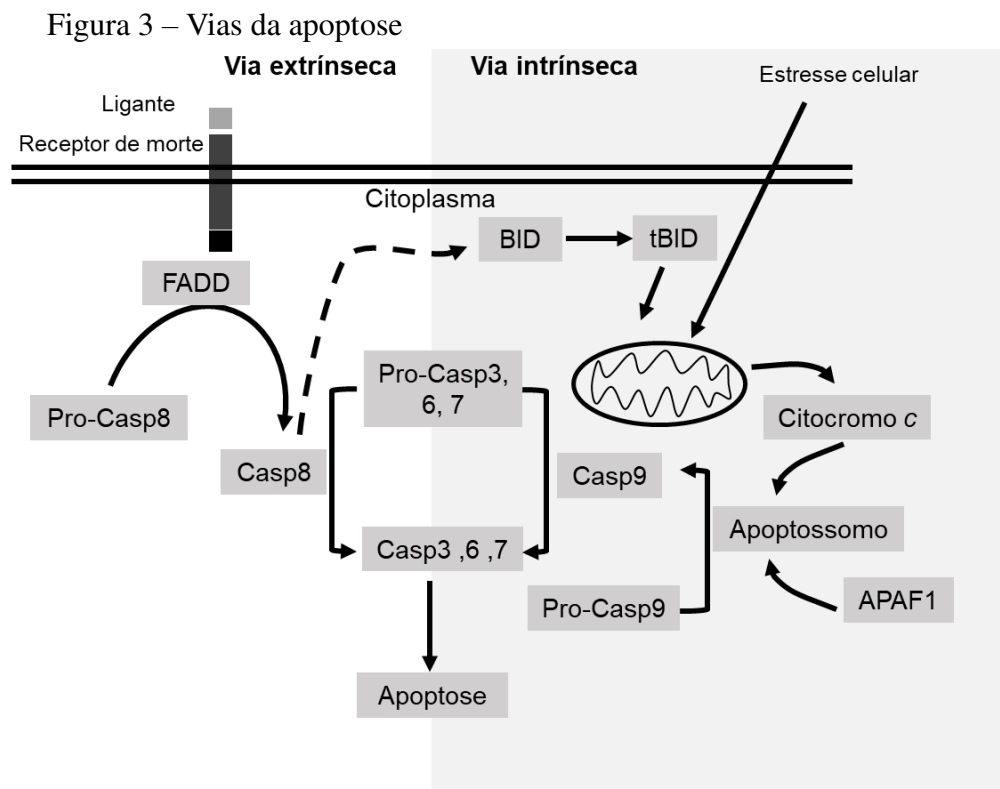


Fonte: Adaptado de Abbas, 2012.

O mecanismo de morte celular programada é fundamental para o controle da homeostase e eliminação do tumor. Historicamente, as alterações morfológicas permitiram classificar a morte celular principalmente em 3 tipos: tipo I ou apoptose, marcado pelo encolhimento citoplasmático, condensação da cromatina e extravasamento do conteúdo celular, formando pequenas vesículas (corpos apoptóticos); tipo II ou autofagia, com formação de grandes vacúolos e degradação lisossomal; e o tipo III ou necrose, reunindo características das

fases finais do tipo I, com desorganização completa da membrana plasmática, e do tipo II, sem atividade fagocítica e lisossomal. Estudos mais recentes apontam um quarto tipo de morte, a entose, como uma das principais modalidades de morte celular programada, definida como do tipo IV. Essa morte é uma forma de canibalismo celular que ocorre em células saudáveis e malignas, envolvendo o engolfamento de células viáveis por células não fagocíticas, seguido, em alguns casos da morte das células internalizadas. Outros casos de morte podem ser definidos como um subgrupo atípico, como é o caso da *anoikis*, piropitose e pironecrose (GALLUZZI *et al.*, 2018; KALKAVAN; GREEN, 2018).

A apoptose é o mecanismo de manutenção homeostática que ocorre durante o desenvolvimento e envelhecimento das células, bem como em defesa a danos celulares. Esse processo é caracterizado pela ativação de uma série de endoproteases, conhecidas como caspases (Casp), a partir de versões inativas, as procaspases (pro-Casp), proteínas que regulam mecanismos de morte e inflamação (MCILWAIN; BERGER; MAK, 2015). No geral, durante o processo de morte por apoptose, as caspases medeiam a inibição do crescimento e divisão celular, para que ele ocorra por 2 vias distintas (Figura 3), as vias intrínseca e extrínseca (GALLUZZI *et al.*, 2018).



Fonte: Adaptado de Mcilwain *et al.*, 2013 e D'Arcy, 2019.

A via intrínseca é iniciada pela célula em resposta a uma variedade de estímulos intracelulares que provocam a alteração da permeabilidade da membrana mitocondrial, liberando proteínas pro-apoptóticas no meio intracelular. Uma dessas proteínas é o citocromo c, que induz a apoptose interagindo com a proteína APAF1, por meio da indução da alteração conformacional, o que resulta na fosforilação e oligomerização, formando o apoptossomo. Esse complexo recruta e converte as pro-Casp9 em Casp9, proteína capaz de ativar a pro-Casp3 em Casp3, induzindo completamente a apoptose (D'ARCY, 2019; MCILWAIN; BERGER; MAK, 2015).

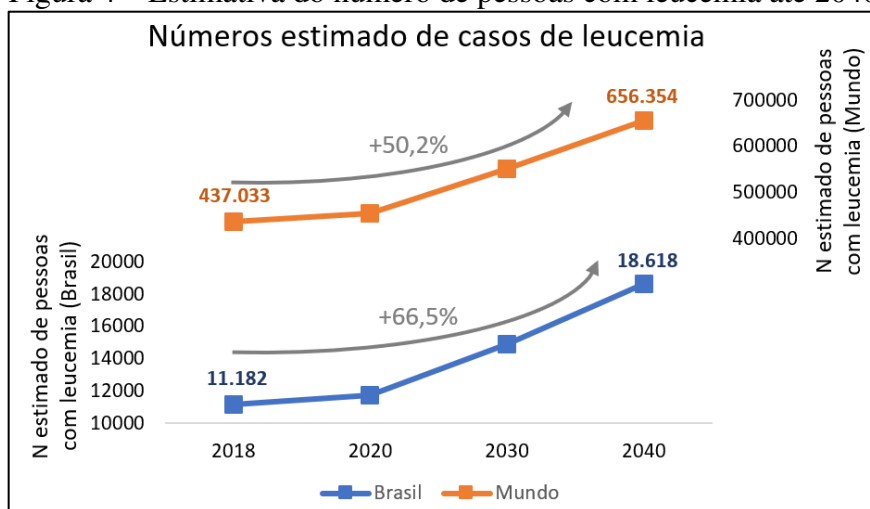
Já a via extrínseca ocorre por meio dos receptores de morte (DR, do inglês *death receptor*), ativados por ligantes expressos por macrófagos ou células NK. Com a ativação dos DR, principalmente os DR4 e 5, a proteína TRAIL promove a formação do complexo DISC, que promove a apoptose, pela ativação direta da Casp3 pela Casp8, ou indireta, pela clivagem da proteína Bid em tBid e a fase de amplificação do sinal pela mitocôndria (D'ARCY, 2019).

1.1 Leucemia Mieloide Crônica

As leucemias são um conjunto de neoplasias malignas que resultam de falhas na hematopoese, com um comprometimento no desenvolvimento e funcionamento normal das células sanguíneas, ocasionado pela proliferação e acúmulo excessivo de células imaturas (WEINBERG, 2013). No Brasil, para cada ano do triênio 2020-2022, estima-se mais de 10.800 novos casos de leucemia entre homens e mulheres, número que tende a aumentar em 66.3% até 2040, dado alarmante quando comparado com a estimativa global de 50.2% para o mesmo período (Figura 4), principalmente visto que a doença já está entre as 10 mais incidentes nas regiões Norte e Nordeste do país (INCA, 2020; GLOBOCAN, 2019)

Os 4 subtipos principais de leucemias são a leucemia linfóide aguda (LLA) e crônica (LLC) e leucemias mieloide aguda (LMA) e crônica (LMC). Esses subtipos surgem a partir de danos em linhagens progenitoras mieloides (que dão origem aos eritrócitos, plaquetas, neutrófilos, eosinófilos e basófilos) ou linfóides (comprometendo os linfócitos), em que o curso da doença pode se desenvolver de maneira rápida (leucemias agudas) ou lenta (crônicas) (INCA, 2017).

Figura 4 – Estimativa do número de pessoas com leucemia até 2040.



Fonte: Adaptado de Globocan 2019.

As leucemias mieloides representam quase 50% dos novos casos de leucemia no mundo, com a leucemia mieloide crônica possuindo uma incidência de 1 a 2 casos para cada 100.000 adultos e aproximadamente 15% dos novos casos de leucemia diagnosticados em adultos (JABBOUR; KANTARJIAN, 2018; GLOBOCAN, 2019). Nesses pacientes, a LMC geralmente se encontra em sua fase crônica (90 a 95% dos casos), com sinais de anemia e esplenomegalia. Nos casos restantes os indivíduos são classificados na fase acelerada, com uma piora do quadro de anemia e aumento do baço, bem como infiltração nos órgãos, ou na fase blástica, com leucemia aguda e sintomas piores de febre, sangramentos e infecção (JABBOUR; KANTARJIAN, 2018).

1.1.1 Fatores genéticos

A patogênese da LMC é caracterizada principalmente pela translocação do cromossomo 9 com o 22, resultando em um cromossomo aberrante chamado de Filadélfia (Ph⁺), que possui a fusão entre os genes *BCR* e *ABL1* (*BCR-ABL*). Na maioria dos casos, essa fusão ocorre no segundo ou terceiro exon do gene *BCR*, resultando nos transcritos b2a2 ou b3a2, codificando respectivamente proteínas de 210 ou 190 kDa. (WEINBERG, 2013).

O gene *ABL1* é um homólogo humano do oncogene carregado pelo Vírus da Leucemia Murina de Abelson, codificando uma proteína tirosina quinase não receptora, enzima com 3 domínios homólogos ao SRC (SH1-SH3) na extremidade N-terminal, domínios ricos em prolina no centro, e 2 domínios de ligação na parte C-terminal, um ao DNA e outro a actina. Já o gene *BCR* possui 3 domínios principais: domínio serina/treonina-quinase, domínio GEF central e o domínio C-terminal GAP (DEININGER; GOLDMAN; MELO, 2000).

Com a formação da proteína quimérica BCR-ABL, a proteína ABL1, que em condições normais atua entre o núcleo e o citoplasma, tem sua atividade presente constitutivamente e retida no citoplasma, interagindo com diversas proteínas envolvidas na via oncogênica da LMC. A justaposição do BCR também favorece a autofosforilação dos resíduos de fosfotirosina do domínio SH1, da porção derivada do gene *ABL1*, promovendo a interação com domínios de outras proteínas. Em termos funcionais, a proteína BCR-ABL modula a adesão, apoptose e proliferação da linhagem mieloide, fenômeno observado por meio da associação com diversas proteínas intracelulares, principalmente relacionadas às vias *MEK/ERK*, *PI3K/Akt* e *JAK/STAT* (MARLEY; GORDON, 2005).

A interação com as vias relacionadas ao gene *Ras* são complexas e envolvem a formação de uma estrutura da BCR-ABL com a proteína adaptadora GRB2, que recruta o ativador SOS, estimulando a conversão do Ras-GDP em Ras-GTP (versão ativa da proteína) e ativação da proteína GAB2. O complexo formado com a última proteína (GRB2/GAB2/SOS) resulta na ativação constitutiva da via *downstream* a RAS, ativando as quinases MEK1/2 e MAPK, resultando em uma atividade proliferativa desordenada e constitutiva que contribui para a patogênese da LMC (CILLONI; SAGLIO, 2012).

Permanecendo constitutivamente ativa nas células de LMC, a sinalização da via PI3K/AKT, que já é conhecida pelo papel na proliferação, sobrevivência e diferenciação das células normais, também é regulada pela proteína BCR-ABL. Essa via confere vantagens para a expansão de células da LMC pela supressão de fatores de transcrição como BAX, BCL-2, BAD e FOXO, e ativação da mTOR e reguladores do ciclo celular como a p27 (DANISZ; BLASIAK, 2013). Outro fato de importância dessa via para o progresso da leucemia mieloide crônica é sua ativação por mutações na porção quinase da proteína BCR-ABL. Assim a ativação dessa via possui influência negativa na resposta tumoral a tratamentos convencionais LMC (OKABE et al., 2014).

A sinalização BCR-ABL também interage com outros fatores de transcrição, como os da família STAT. Associada a domínios citoplasmáticos de diferentes citocinas e receptores de fatores de transcrição da família STAT, a JAK2 é uma tirosina quinase que inicia uma cascata de ativação de vários genes (ROCCA et al., 2018). Na célula BCR-ABL1+, mesmo sem a presença de mutações na JAK2, ou seja, ainda que indiretamente, ocorre a hiperativação da STAT5, o que favorece a sobrevivência celular, e da STAT3, que promove a diferenciação celular. (WEI et al., 2020).

1.1.2 Linhagens celulares

A cultura de linhagens celulares derivadas de tumores humanos é um modelo essencial para auxiliar o entendimento da biologia do câncer, função dos oncogenes e respostas terapêuticas em estudos de fármacos. As terapias alvo direcionadas são particularmente beneficiadas por esse modelo que, mesmo com a resposta clínica variando substancialmente, inibidores de tirosina quinase (ITK's), como Imatinibe e Dasatinibe, chegaram a 76 e 52% de resposta objetiva após a aprovação do fármaco para o alvo específico (SHARMA; HABER; SETTLEMAN, 2010).

No contexto da leucemia, a linhagem K562 foi o primeiro modelo para LMC estabelecido *in vitro*, a partir da infusão pleural de uma paciente de 53 anos, diagnosticada com LMC há 4 anos e em fase de crise blástica mielóide (LOZZIO; LOZZIO, 1975). Outras linhagens de pacientes Ph⁺ também foram descritas desde então, como a NALM-1, célula com característica pré-B, de uma paciente de 3 anos em crise blástica linfóide (MINOWADA *et al.*, 1977); KCL-22, primeira linhagem estabelecida de um paciente com 2 cromossomos Ph (KUBONISHI; MIYOSHI, 1983); KYO-1, linhagem mielóide indiferenciada (YOSHIDA, 1985); e a LAMA-84, com marcadores megacariocíticos e eritróides e características granulocíticas (BLOM *et al.*, 1996).

A presença da translocação *BCR-ABL1* nas células de LMC proporcionaram o entendimento da iniciação da fase crônica e os benefícios de utilizar a terapia-alvo direcionada, mas a progressão da doença afeta o resultado dessas terapias por meios dependentes e independentes da *BCR-ABL1* (RUMJANEK; VIDAL; MAIA, 2013). Assim, modelos de células de LMC com perfil de resistência a múltiplos fármacos (MDR, *Multi Drug Resistance*) se tornaram essenciais, sendo então desenvolvidos a partir da exposição das linhagens de LMC a doses crescentes de quimioterápicos como vincristina e daunorrubicina (TSURUO *et al.*, 1983).

A linhagem K562-Lucena 1, por exemplo, é uma dessas linhagens com características MDR, conferida pela superexpressão de proteínas de efluxo de fármacos, sendo resistente ao fármaco vincristina e derivada da K562 (RUMJANEK *et al.*, 2001). Outra linhagem, mais resistente que a Lucena-1, é a FEPS, também estabelecida a partir da K562, resistente tanto a vincristina, como a daunorrubicina (DAFLON-YUNES *et al.*, 2013). Dessa forma, a utilização das linhagens com perfil sensível e quimiorresistente auxilia tanto no desenvolvimento de novos fármacos, como na melhoria dos inibidores de tirosino quinase tradicionais.

1.1.3 Inibidores de tirosina quinase

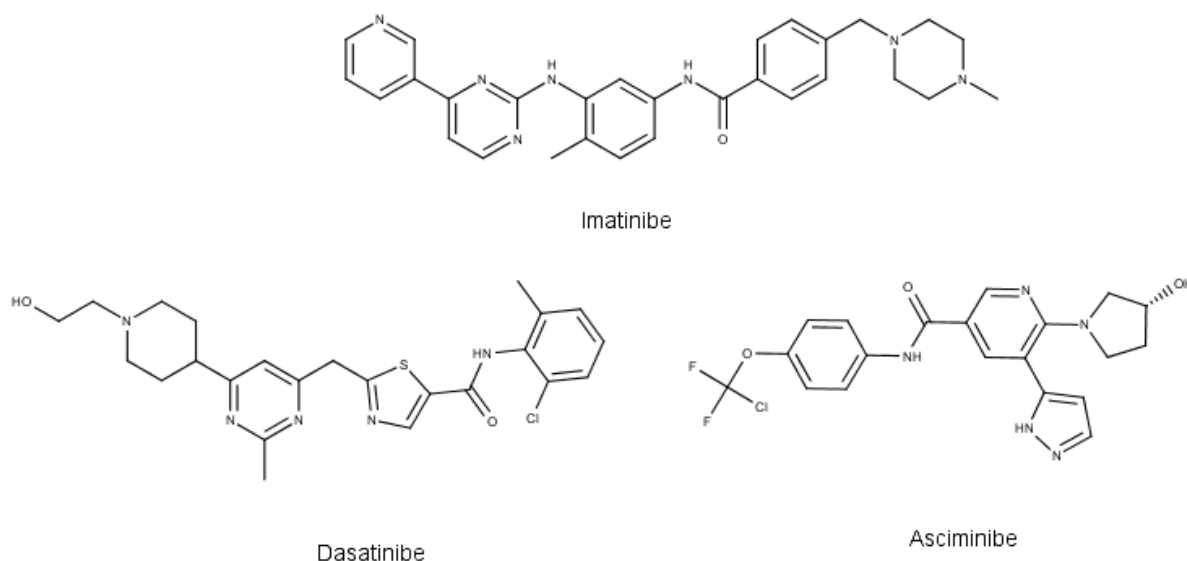
Para a LMC, a radioterapia foi utilizada inicialmente como terapia padrão por mais de 50 anos, mas com a reincidência da doença no curto ou médio prazo (CHISESI; CAPNIST; FIOR, 1991). Alguns quimioterápicos, como bussulfan e hidroxiureia, surgiram aproximadamente em 1960 e trouxeram alguns benefícios, mesmo que insuficientes para alterar o curso natural da doença. Mais tarde, com o transplante de células-troncos hematopoiéticas foi possível encontrar a primeira abordagem curativa, com melhor sobrevida e baixa reincidência dos pacientes. Entretanto, a eficácia do transplante está intimamente relacionada com a identificação de um doador altamente compatível, sob o risco de desenvolver graves efeitos negativos, como a “doença do enxerto contra o hospedeiro”, além de ser indicado somente para pacientes com menos de 50 anos (BOLLMANN; GIGLIO, 2011).

Com a descoberta do cromossomo Ph⁺, característica em 95% dos pacientes com LMC e de 15 a 30% dos pacientes com LLA, bem como das terapias alvo, o uso de substâncias químicas, isoladas ou em combinação, voltadas a inibição da onco-proteína BCR-ABL1 resultante passou a constituir um ponto central do tratamento e o foco de pesquisas durante o tratamento, principalmente por meio das pequenas moléculas inibidoras de tirosino quinase (WU; NIELSEN; CLAUSEN, 2015).

Tradicionalmente, os ITK's são descritos como competidores do ATP no sítio de ligação do domínio catalítico de diversas tirosinas quinases oncogênicas. Além disso, essas moléculas são caracterizadas pela absorção oral, perfil de segurança favorável e facilidade de combinação com outros quimioterápicos e radioterapia (ARORA; SCHOLAR, 2005).

Um dos primeiros inibidores de tirosina quinase foi o Imatinibe (Figura 5), desenhado a partir da estrutura conhecida do sítio de ligação ao ATP da proteína ABL1, atuando na competição do sítio e inibindo a atividade quinase tanto dessa proteína, como da oncoproteína BCR-ABL, em escala de 25 a 38 nM para o ensaio com a enzima isolada (DRUKER et al., 1996). Ainda hoje o Imatinib é tido como um modelo para o desenvolvimento de outros TKI's e para a terapia alvo em geral, sendo um fármaco utilizado na primeira linha do tratamento da LMC (ARORA; SCHOLAR, 2005).

Figura 5 – Inibidores de tirosina-quinase para o tratamento da LMC.



Mesmo com a alta efetividade do Imatinib no tratamento da LMC, a alta taxa de recorrência da doença ainda persiste em pacientes em fase avançada ou em crise blástica devido ao desenvolvimento de mutações na porção quinase da proteína BCR-ABL (WEISBERG et al., 2007). Assim, fármacos de segunda geração foram produzidos com o objetivo de tratar pacientes com resistência ao Imatinibe, como o Nilotinibe, mais potente que o Imatinibe (10-50x) e capaz de inibir a proliferação e atividade quinase de linhagens celulares com diversas mutações na porção ABL1. Além disso, o Nilotinibe apresenta inibição moderada das tirosinas quinases KIT e PDGFR. Outro fármaco de segunda geração é o Dasatinibe (Figura 5), também efetivo contra diversas mutações na proteína alvo e com atividade moderada para KIT, PDGFR e SFK (diferente do Nilotinibe) (MELO; CHUAH, 2008).

A pesar de serem funcionais contra diversas mutações que causam resistência ao Imatinibe, tanto o Nilotinibe como o Dasatinibe são inefetivos contra a mutação T315I que tende a ocorrer na BCR-ABL. Assim, surgem os fármacos de terceira geração, como o Ponatinibe, inibidor útil para pacientes resistentes ou intolerantes ao Nilotinibe ou Dasatinibe, bem como para aqueles com a mutação T315I (ZHOU et al., 2011).

Além de serem classificados como de primeira, segunda ou terceira geração, é possível classificar os inibidores pela conformação do sítio de ligação ao ATP proteína BCR-ABL. Os inibidores do tipo I são aqueles que tem como alvo a conformação ativa, como é o caso do Dasatinibe. Por outro lado, os inibidores tipo II têm como alvo a conformação inativa da proteína, em que se enquadra o Imatinibe, Nilotinibe e o Ponatinibe. Uma terceira classe, tipo

III, inclui inibidores que não possuem o sítio de ligação ao ATP como alvo principal, mas sim o sítio de domínio regulatório que promove a inibição da atividade quinase, o sítio alostérico (KHATRI; WANG; PENDERGAST, 2016).

Os inibidores alostéricos possuem como vantagem uma maior seletividade da quinase inibida, em contraste aos inibidores do sítio de ligação ao ATP que tem múltiplas quinases como alvo. O ITK Asciminibe (Figura 5) é um desses inibidores alostéricos seletivos para a quinase ABL1 e que se beneficia por não compartilhar mecanismos de resistência com os inibidores tradicionais. Além disso, o mecanismo de ação favorece o uso da combinação desse inibidor com os que possuem o outro sítio de ligação como alvo (WYLIE et al., 2017). O Asciminibe isolado e em combinação com outros ITK's é o único inibidor alostérico em estudo clínico, atualmente em fase 2 (<https://clinicaltrials.gov/ct2/home>, código de acesso: NCT03906292). Assim, o estudo de novos inibidores, tradicionais e alostéricos, da BCR-ABL ainda é necessário diante das alternativas disponíveis e do número crescente de pacientes com LMC, bem como de outras doenças Ph⁺ que poderiam ser beneficiadas.

1.2 Reposicionamento farmacológico

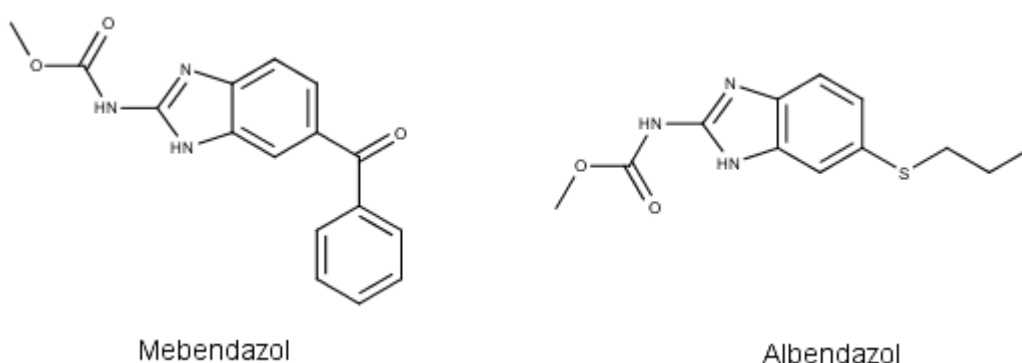
A prospecção e desenho de novas moléculas com atividade antineoplásica e alta especificidade é um processo caracterizado por ser laborioso, multiprofissional e que demanda anos de pesquisa, passando por vários compostos candidatos até chegar a um composto líder. Assim, o número de fármacos aprovados por ano vem diminuindo, com estimativas da necessidade de 15 anos a um custo médio que supera 1 bilhão de dólares para implementação de novos medicamentos (HODOS et al., 2016).

Diante da dificuldade encontrada na descoberta e desenvolvimento de novos quimioterápicos frente a complexidade do metabolismo tumoral, o uso de fármacos já aprovados pelos órgãos de regulamentação, como o FDA (órgão de regulamentação americano), por meio do reposicionamento é reconhecido como uma estratégia mais rápida e econômica de alcançar a demanda dos pacientes por tratamento. Ademais, por se estudar fármacos já aprovados, já se possui mais informações relacionadas à segurança, efeitos colaterais, administração e distribuição da molécula no organismo, ainda que não completamente (ANDRESEN; GJERTSEN, 2017).

Nesse contexto, a família dos benzimidazóis, um grupo de moléculas utilizadas para o tratamento de infecções por nematódeos intestinais vem sendo avaliado para efeitos antitumorais, com atenção especial para efeitos antileucêmicos (ANDRESEN; GJERTSEN,

2017). O mecanismo de ação tradicional dessa família atua por meio da ligação à β -tubulina e inibição da formação microtubular, o que leva a despolimerização dos microtúbulos e danos no metabolismo da glicose de alguns parasitas intestinais humanos. Um dos membros dessa família é o Mebendazol (MBZ, Figura 6), composto com atividade potencial *in vitro* para glioblastoma (BAI *et al.*, 2011), câncer de cólon (NYGREN *et al.*, 2013) e, mais recentemente, câncer gástrico, por meio da sua capacidade de inibir o crescimento, migração e invasão das células cancerígenas (PINTO *et al.*, 2015).

Figura 6 - Benzimidazóis com potencial antileucêmico.



Atualmente existem pelo menos 6 estudos clínicos ativos em que o MBZ aparece com potencial aplicação para o câncer, sendo a maioria deles para tumores cerebrais, um para câncer gástrico e outro para o estudo da segurança, tolerância e eficácia de combinações metabólicas no tratamento do câncer (códigos de identificação: NCT01837862, NCT02201381, NCT02366884, NCT02644291, NCT03628079 e NCT03925662; acesso em: <https://clinicaltrials.gov/>).

Mesmo já citada em alguns trabalhos, a atividade anticâncer do MBZ foi pouco explorada no contexto da leucemia. Em um trabalho para o redirecionamento do MBZ com foco no tratamento do câncer de cólon, um ensaio de triagem para 97 quinases destacou a afinidade do Albendazol (ABZ, Figura 6) e do MBZ para a ABL1 selvagem e mutante para E255K e T315I. Além disso, vale destacar que nesse mesmo trabalho o MBZ foi triado contra o painel de 60 linhagens de tumores diferentes e as linhagens leucêmicas se mostraram sensíveis (NYGREN *et al.*, 2013). Por fim, um estudo recente comprovou a atividade citotóxica em linhagens de leucemia mielóide aguda, em que o MBZ induziu apoptose nas células cancerígenas (U937 e K562), e efeito inibitório mínimo nas células periféricas mononucleares normais, reforçando o potencial antileucêmico dos benzimidazóis (HE *et al.*, 2018).

Uma estratégia poderosa para estudos de reposicionamento de fármacos – e muito utilizada atualmente no combate ao SARS-CoV-2 – consiste no uso de metodologias computacionais para avaliação da especificidade de interação entre fármacos e novos alvos terapêuticos, acelerando a descoberta e reduzindo custos. Assim, abordagens modernas aliam conhecimentos teóricos a métodos computacionais para predição de alvos e estudo da interação entre compostos de interesse, um fármaco já aprovado, e a estrutura de uma proteína responsável pelo fenótipo de uma doença (MACALINO *et al.*, 2015).

1.3 Ferramentas computacionais

O uso de ferramentas computacionais para aliar conhecimentos físicos, químicos e biológicos com a matemática, estatística e tecnologia da informação teve crescimento exponencial nos últimos anos, o que permite que seja cada vez mais prático simular e avaliar sistemas biológicos complexos por meio da área de conhecimento da bioinformática (VERLI, 2014).

Atualmente, poderosos algoritmos computacionais aplicam conceitos físicos, químicos e biológicos para modelar alvos terapêuticos (no exemplo da modelagem por homologia), estudar impactos de mutações, identificar agonistas e antagonistas moleculares (por meio do aprendizado de máquina), acelerar o processo de triagem de novos compostos e reposicionamento de fármacos aprovados (ancoramento molecular e triagem virtual), e até mesmo, mimetizar seu comportamento em ambiente fisiológico por meio de simulações determinísticas em escala temporal cada vez mais próxima da realidade (dinâmica molecular). Com esses esforços, é possível obter informações sobre geometria (comprimento de ligação e ângulo de ligação e torção), energia (energia de ligação) além de propriedades eletrônicas, espectroscópicas, volume, área de superfície, entre outras (ZANATTA, 2014).

O desenho de fármacos auxiliado por computador (ou CADD, do inglês *Computer-aided Drug Design*) vem cada vez mais se consolidando como uma disciplina que coleta informações desses algoritmos com o objetivo de descobrir, projetar e desenvolver novos compostos com propriedades terapêuticas. Essa abordagem já teve sucesso na descoberta ou otimização de inibidores de tirosina quinase como o Imatinibe e o Dasatinibe. Além disso, somada às abordagens clássicas, o CADD está participando das novas tendências para descoberta de fármacos, sendo o redirecionamento de fármacos um dos principais campos beneficiados pelo desenvolvimento dessa disciplina (PRIETO-MARTÍNEZ *et al.*, 2019).

De forma mais específica, a relação quantitativa entre estrutura e atividade (ou QSAR, do inglês *Quantitative structure-activity relationships*) é a base da maioria das abordagens dessa disciplina. Juntamente com a similaridade molecular, essa relação permite identificar estruturas básicas dos ligantes responsáveis por características farmacológicas, pelo método conhecido como *Ligand-based*. Alternativamente, métodos *Structure-based*, que dependem da estrutura tridimensional do alvo, são utilizados para caracterização sítios de ligação, elucidação de mecanismos de ação e acesso a cinética e termodinâmica do reconhecimento alvo-ligante (PRIETO-MARTÍNEZ *et al.*, 2019).

Atualmente, o uso dessas metodologias não é limitado a grandes empresas ou grupos de pesquisa. Ferramentas colaborativas e de livre acesso, bem como servidores de busca e predição, são disponibilizados *on-line* por institutos de pesquisa internacionais como o *National Center of Biotechnology Information* (NCBI, Estados Unidos da América), *Swiss Institute of Bioinformatics* (SIB, Suíça), *European Bioinformatics Institute* (EBI, Inglaterra) e Laboratório Nacional de Computação Científica (LNCC, Brasil) (ALVES *et al.*, 2018).

1.3.1 Farmacocinética e farmacodinâmica

Uma contribuição importante da bioinformática para o desenvolvimento de novos fármacos é o estudo da farmacocinética e da farmacodinâmica dos compostos, o que também é útil para o redirecionamento. Para a farmacocinética, é possível utilizar servidores que relacionam o perfil de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET) com parâmetros físico-químicos estruturais. Propriedades farmacocinéticas desfavoráveis já foram responsáveis pela falha de moléculas candidatas em estágios posteriores do processo de desenvolvimento, trazendo um impacto financeiro negativo no custo da indústria farmacêutica (BUTINA; SEGALL; FRANKCOMBE, 2002). Assim, o acesso a essas informações pode influenciar o processo de desenvolvimento de novas terapias, bem como pode fornecer dados importantes para o redirecionamento.

Desde as contribuições de Lipinski para a identificação das características em comum dos fármacos com atividade e boa absorção oral, o perfil *drug-like* passou a ser definido. Dentre essas características vale citar: coeficiente de partição octanol-água ≤ 5 , peso molecular ≤ 500 , quantidade de aceptores e doadores ≤ 10 e 5 , respectivamente, área de superfície polar $\leq 140 \text{ \AA}^2$ e quantidade de ligações rotacionais ≤ 10 (LIPINSKI, 2004; VEBER *et al.*, 2002). Além disso, por meio da similaridade bi- e tridimensional entre compostos em um banco de dados, com

informações de resultados experimentais, é possível calcular as propriedades ADMET teóricas de uma molécula em estudo (CHENG *et al.*, 2012).

Com o objetivo de compreender o efeito do fármaco no organismo, seu mecanismo de ação e sua relação entre concentração e efeito no tecido alvo, a abordagem clássica da farmacodinâmica busca estudar o fármaco frente proteínas alvo, isoladas ou em tecidos/organismos (RANG *et al.*, 2014). Como não poderia ser diferente, as contribuições da bioinformática também beneficiam o estudo de farmacodinâmica, permitindo, por exemplo, calcular a probabilidade de novos alvos moleculares e o perfil de atividade biológica para diferentes classes de ligantes, por meio de metodologias que também estão relacionadas ao princípio da similaridade estrutural, bem como estudar a interação de proteínas e ligantes (GFELLER *et al.*, 2014).

Nesse contexto, a ancoragem (*docking*) molecular é uma técnica capaz de identificar e explorar novos sítios de ligação, caracterizando a interação entre o fármacos e proteínas-alvo com rapidez e acurácia, evidenciando características moleculares fundamentais para a especificidade e afinidade da ligação (MORRIS *et al.*, 2009). De forma simples, o *docking* aplica um algoritmo para a busca da melhor posição/interação de um ligante, que pode ser desenhado por meio de programas como o MarvinSketch (ChemAxon), frente ao espaço tridimensional contendo a estrutura de uma proteína, geralmente obtida a partir de experimentos como difração de raios-X e disponível em bancos de dados de estruturas, como o *Protein Data Bank* (VERLI, 2014).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Atestar o potencial citotóxico de um derivado de benzimidazol isolado e em combinação com fármacos usados no tratamento da LMC sensível e resistente.

2.2 Objetivos Específicos

- Analisar a atividade citotóxica do BNZ isolado ou em combinação com os inibidores de tirosina quinase (ITKs) em linhagens de LMC sensíveis e resistentes à quimioterapia;
- Investigar os possíveis mecanismos de morte celular provocado pelo BNZ isolado ou em combinação com os ITKs em linhagens de LMC sensíveis e resistentes à quimioterapia;
- Investigar o perfil farmacodinâmico *in silico* do BNZ na Leucemia Mielóide Crônica;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Compostos estudados

O composto de estudo BNZ foi dissolvido em dimetilsufóxido (DMSO) e armazenado a -20 °C, assim como o Albendazol (400 mg - Medley) e os quimioterápicos tradicionalmente utilizados na LMC, Imatinibe (Gleevec® 400mg - Novartis) e Dasatinib (Sprycel® 20mg – Bristol Myers Squibb).

3.2 Avaliação *in silico* do perfil farmacocinético e farmacodinâmico

Para as análises, o banco de dados PubChem foi utilizado como fonte do código SMILES dos fármacos. A partir desse código, foram avaliadas informações sobre propriedades de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade relacionadas aos fármacos pelo servidor admetSAR (disponível em: <http://lmmd.ecust.edu.cn/admetSar2/>), com no mínimo 70% de acurácia (ROMAN et al., 2018)

O servidor Molinspiration (<http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>) foi utilizado para calcular um escore de atividade biológica para as seis classes de fármacos mais importantes: ligantes de GPCR; inibidores de quinase; moduladores de canais de íon; ligantes de receptores nucleares; inibidores de protease e inibidores enzimáticos.

Os possíveis alvos terapêuticos da molécula foram avaliados por meio da predição com o servidor SwissTarget Prediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>). Esse servidor compara a similaridade dos compostos com uma biblioteca de 280.000 compostos ativos, em mais de 2.000 alvos farmacológicos, em organismos diferentes (GFELLER et al., 2014). Assim, os alvos preditos foram classificados segundo uma função de probabilidade própria do sistema.

3.3 Obtenção das estruturas moleculares

Inicialmente, o *Protein Data Bank* (PDB) (<https://www.rcsb.org/>) foi utilizado para a busca e download dos arquivos contendo as coordenadas das estruturas do alvo no formato “.pdb”. Dessa forma, foram selecionadas 3 estruturas referentes à porção quinase, co-cristalizadas com ligantes, identificadas pelo PDBID 2HYY, 2GQG e 5MO4, com resolução de 2.4Å, 2.4Å e 2.17Å respectivamente. Dentre as mesmas, as estruturas 2HYY e 2GQG representam os resíduos da posição 228 a 500, e a 5MO4 da posição 27 a 515, além dessa última

conter as mutações T334I e D382N. No sítio de ligação ao ATP dessas estruturas estava co-cristalizado, os ligantes Imatinibe (PDBID: 2HYY), Dasatinibe (2GQG) e Nilotinibe (5MO4), enquanto que a estrutura 5MO4 também se encontra complexada com o ligante Asciminibe, no sítio alostérico.

3.4 Preparação das estruturas moleculares

Com o auxílio do programa PyMol 2.3.0 as estruturas proteicas foram visualizadas e manipuladas, a fim de remover moléculas de água, separar os ligantes nativos e retirar outros reagentes presentes no modelo tridimensional. A ferramenta online PDB2PQR 2.1.1 foi utilizado para protonação das estruturas proteicas na faixa de pH fisiológico, com o campo de força AMBER, gerando os arquivos “.pqr” para cada estrutura. Já no AutoDock Tools 1.5.6, esses arquivos foram convertidos para o formato “.pdbqt”, utilizado na metodologia de ancoragem, contendo somente os átomos de hidrogênio polares e as cargas dos resíduos calculadas segundo o modelo Kollman presente na ferramenta.

A partir dos ligantes nativos dos arquivos PDB selecionados, foram obtidos ligantes falso positivo (*decoy*) por meio da ferramenta *DUDE generate* (<http://dude.docking.org/generate>). O estado de protonação dos ligantes foi estabelecido para o pH de cristalização da proteína alvo, utilizando o programa Avogadro versão 1.2.0 (Avogadro Chemistry). A estrutura dos ligantes foi minimizada com a ferramenta “*optimize geometry*”, configurada para 10.000 passos, campo de força MMFF94 e o algoritmo “*steepest descent*”. Já a atribuição das cargas foi feita pela interface gráfica AutoDock Tools 1.5.6, segundo o modelo Gasteiger, e os arquivos foram posteriormente convertidos em “.pdbqt”.

3.5 Ancoragem molecular

A ancoragem molecular foi executada com o Autodock 4.2.6, utilizando o algoritmo genético Lamarkiano, configurado para 2.500.000 avaliações de energia por corrida, 150 indivíduos na população e no máximo 27.000 gerações por corrida. O algoritmo foi executado 6 vezes e os 900 resultados para cada ensaio foram agrupados com uma tolerância de RMSD de 2,0 Å, utilizando o AutoDock Tools 1.5.6 para inspecionar o representante do *cluster* mais populoso e com menor energia de interação. O *software* Discovery Studio Visualizer 19.1.0 também foi utilizado para visualização das interações, classificação e identificação dos resíduos participantes, bem como geração das figuras.

3.6 Linhagens celulares e cultivo

Foi utilizada a linhagem leucêmica K562 e sua derivada quimioressistente FEPS. Ambas foram cedidas pela Prof^a Dr^a Vivian Rumjanek, da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). As linhagens foram cultivadas em meio RPMI, suplementado com 10% de soro bovino fetal e 1% dos antibióticos estreptomicina e penicilina. Diferente da K562, o meio para cultivo da FEPS foi suplementado com daunorrubicina para uma concentração final de 466 nM, fármaco de seleção da linhagem e que mantém seu perfil de resistência. Dessa forma, as culturas foram mantidas em câmara de CO₂ à 37 °C e constantemente acompanhadas em microscópio invertido, bem como o meio de cultura foi trocado sempre que consumido.

3.7 Ensaio de viabilidade por *Alamar Blue*

As linhagens celulares foram semeadas em placas de 96 poços na densidade de 1x10⁶ de células por mL, mantidas na estufa com atmosfera de 5% de CO₂. Em seguida, as células foram tratadas com uma curva concentração-resposta (0 a 20 nM) para determinar a concentração inibitória em 50% de atividade (IC₅₀) dos benzimidazóis e dos inibidores Imatinibe e Dasatinibe, de forma isolada e em combinação com o BNZ. Ao final do tratamento, foi adicionado à solução de Alamar Blue (1:20 em meio de cultura RMPI sem SBF) e a placa incubada na estufa de cultivo por 3h. Assim, as placas foram lidas no espectrofotômetro de placa a um comprimento de onda de 465/540 nm e os dados coletados para análise estatística.

3.8 Análise da resistência e das combinações

O índice de resistência (RI) foi calculado pela razão entre a IC₅₀ de cada substância isolada ou em combinação na linhagem resistente FEPS e a IC₅₀ da amostra na linhagem sensível K562, conforme a fórmula abaixo:

$$RI = \frac{IC_{50 \text{ linhagem FEPS}}}{IC_{50 \text{ linhagem K562}}}$$

Um RI na combinação inferior ao do fármaco tradicional isolado indica uma reversão parcial da resistência na linhagem quimiorresistente (DOHSE et al., 2010).

Além desse índice, o índice de combinação (CI) foi calculado pelo software CompuSyn (Biosoft, Cambridge, U.K.). Para cada combinação o valor de CI inferior, igual ou superior a 1 indica efeito sinérgico, aditivo ou antagonista, respectivamente. Os resultados

foram então mensurados por meio dos valores de CI para a fração referente a inibição de 50% da viabilidade celular (Fa 0,5). Pelo mesmo software, também é calculado o índice de redução de dose (DRI), que indica a proporção em que a concentração de um determinado fármaco pode ser reduzida pela combinação para alcançar efeito comparável ao do fármaco usado individualmente (CHOU, 2006).

3.9 Avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo

As células foram cultivadas em placas de 12 poços em uma densidade de 1×10^5 células/mL e mantidas por 24 horas na estufa com atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C para ambientação. Após esse período, foi realizado o tratamento com o BNZ e os inibidores quimioterápicos IMA e DAS isolados e em associação nas concentrações baseadas na CI₅₀ por 72 horas.

Com o término do tratamento, as células foram fixadas com álcool 70% a 4°C em tubos de 1,5 mL. Após o período “*overnight*” em armazenamento a -20 °C, as células foram centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos para retirada de sobrenadante e incubação com solução 0,1% Triton-X (Sigma-Aldrich) por 10 minutos a temperatura ambiente. Com uma nova centrifugação e remoção do sobrenadante, as células foram incubadas em solução de RNase livre de DNA (100 µg/mL) por 20 minutos a 37°C. No final desse tempo, o iodeto de propídio foi adicionado diretamente na solução de RNase de modo que a concentração final fosse de 50 µg/mL. Após 1h de incubação, as células foram novamente centrifugadas para remoção do sobrenadante e ressuspensão das células em solução de PBS 1x. Assim, dez mil eventos foram analisados por citometria de fluxo (BD FACSverse™).

3.10 Avaliação da integridade da membrana celular e potencial da membrana mitocondrial

Para a avaliação da integridade de membrana celular e do potencial da membrana mitocondrial foram utilizados, respectivamente, os marcadores rodamina 123 (Rho123) e iodeto de propídio (IP). A utilização desses dois corantes pode ser utilizada para diferenciação do padrão de morte celular, uma vez que as células que possuem a membrana celular intacta não permitem a passagem do IP, marcando as células com dados na membrana com IP (IP+). Além disso, o fluorocromo catiônico Rho123 atravessa a membrana plasmática intacta e acumula na membrana mitocondrial, com a ausência/ redução dessa marcação sendo um

indicativo da despolarização da membrana mitocondrial, um indício de dano dessa organela (DARZYNKIEWICZ; LI; GONG, 1994).

Após o tratamento das células com os fármacos isolados ou em combinação, as mesmas foram transferidas para tubos de 1,5 mL, centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos e o sobrenadante desprezado. Com isso, foi adicionado em cada tubo uma solução com concentrações finais de 10 µg/mL de Rho123 e 5 µg/mL de IP em meio RPMI completo. Nesse meio, as células foram incubadas durante 35 min e câmara de CO₂. Após o tratamento, as células foram centrifugadas e ressuspensas em solução de PBS 1x. Dessa forma, também foram analisados dez mil eventos por amostra em citômetro de fluxo (BD FACSVerserTM) em um total de 10.000 eventos por amostra. Além das amostras experimentais, células sem marcação (branco), marcadas apenas com IP (5 µg/mL) e com R123 (5 µg/mL) foram utilizadas para calibração e compensação de fluorescência (sobreposição de espectros de excitação/emissão) para aquisição dos dados.

3.11 Análise estatística

Os dados quantitativos dos experimentos *in vitro* celulares e moleculares foram analisados a partir da média e do desvio padrão de três experimentos independentes. Para verificar a ocorrência de diferença significativa os diferentes grupos e condições experimentais, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Bonferroni/Tukey, ou seus correspondentes não paramétricos, com nível de significância de 95% ($p < 0,05$) utilizando o programa estatístico GraphPad Prism® 8.0

4 RESULTADOS

4.1 Citotoxicidade *in vitro*

A fim de determinar o potencial citotóxico do BNZ para células de leucemia mieloide crônica, decorrente da utilização isolada ou em associação com fármacos tradicionais (Imatinib e Dasatinib), bem como comparar seu efeito frente a outro benzimidazol (Albendazol), inicialmente foi feita a triagem em células de LMC sensível à quimioterapia (K562) e quimiorresistente (FEPS)

Quando comparado ao fármaco da mesma família, o BNZ mostrou ser altamente citotóxico após 72h de tratamento, com valores de IC₅₀ na escala de nano molar e 4x menor que o do Albendazol, o que nos levou a excluir esse último fármaco da triagem na FEPS. Outro dado importante foi o resultado para a linhagem resistente, em que o BNZ apresentou IC₅₀ de 1917 nM (*Tabela 1*).

Tabela 1 - Concentração inibitória (IC₅₀) e o índice de resistência (RI) dos derivados e dos TKI's isolados e em combinação nas linhagens K562 e FEPS após 72h.

Fármaco	IC ₅₀ nM		RI
	CI 95%*		
	K562	FEPS	
BNZ	104,3	1917,0	18
	60,28 - 180,5	953,0 - 3857,0	
Albendazole	486,4	-**	-**
	199,0 - 1189,0		
Imatinib	134,6	9661,0	72
	71,62 - 252,9	1101 - 84780	
Dasatinib	0,15	33,54	224
	0,06905 - 0,3239	6,606 - 170,3	
Imatinib + BNZ	49,74	591,1	12
	25,46 - 97,19	326,1 - 1072,0	
Dasatinib + BNZ	0,06	411,3	7*10³
	0,01414 - 0,2234	138,7 - 1219	

* Intervalo de confiança de 95% (CI 95%)

** Ensaio não realizado

O índice de resistência (RI) para os fármacos isolados e em combinação também foi avaliado. Mais uma vez, o BNZ ganha destaque quando comparado ao Imatinibe, com RI inferior, sugerindo uma menor resistência da linhagem FEPS (*Tabela 1*). Enquanto a combinação do BNZ com o Dasatinibe evidenciou um aumento na atividade citotóxica na linhagem K562 (IC₅₀ da combinação < IC₅₀ fármacos isolados), a associação com o Imatinibe resultou em atividades mais potentes, tanto na K562 como na FEPS, bem como o RI dessa combinação foi inferior aos RI das demais.

O efeito das combinações nas duas linhagens também foi avaliado pelo cálculo do índice de combinação (CI) e do índice de redução de dose (DRI). Confirmando o resultado do RI da tabela anterior, a combinação do BNZ com o Imatinib apresentou CI significativo, com valores abaixo de 1 na fração referente a inibição de 50% da viabilidade celular (Fa 0,5), indicando efeito sinérgico nas duas linhagens, enquanto que para a combinação com Dasatinib a sinergia foi observada somente para a linhagem K562. Além disso, o cálculo do DRI evidenciou uma redução de dose do Imatinibe em 3 vezes e 6 vezes para as linhagens sensível e resistente, respectivamente, e do Dasatinibe em 16 vezes para a linhagem sensível (Tabela 2).

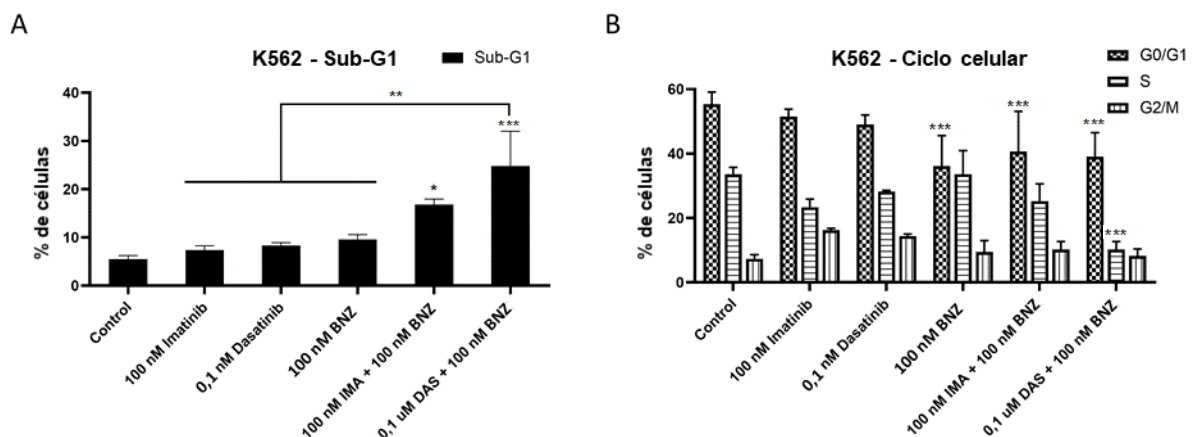
Tabela 2 – Índice de combinação (CI) e índice de redução de dose (DRI) para as combinações nas linhagens K562 e FEPS.

Combinação	K562		FEPS	
	CI (Fa 0,5)	DRI	CI (Fa 0,5)	DRI
Imatinibe + BNZ	0,37	3,71	0,27	6,46
Dasatinibe + BNZ	0,06	16,69	2,21	0,46

4.2 Avaliação da fragmentação e alterações no ciclo celular

As combinações com Imatinibe e Dasatinibe utilizadas na K562 apresentaram diferença estatística ($p \leq 0,01$ e $p \leq 0,0001$) na quantidade de células com perfil de fragmentação quando comparadas ao grupo controle. Da mesma forma, a combinação DAS + BNZ também foi diferente estatisticamente dos tratamentos com os fármacos isolados ($p \leq 0,001$). Quanto ao ciclo celular, o BNZ isolado e sua combinação com Imatinibe reduziu a porcentagem de células nas fases G0/G1, sugerindo um araste para a fase Sub-G1, assim como a combinação com o DAS, que também reduziu a quantidade de células na fase S ($p \leq 0,0001$, Gráfico 1).

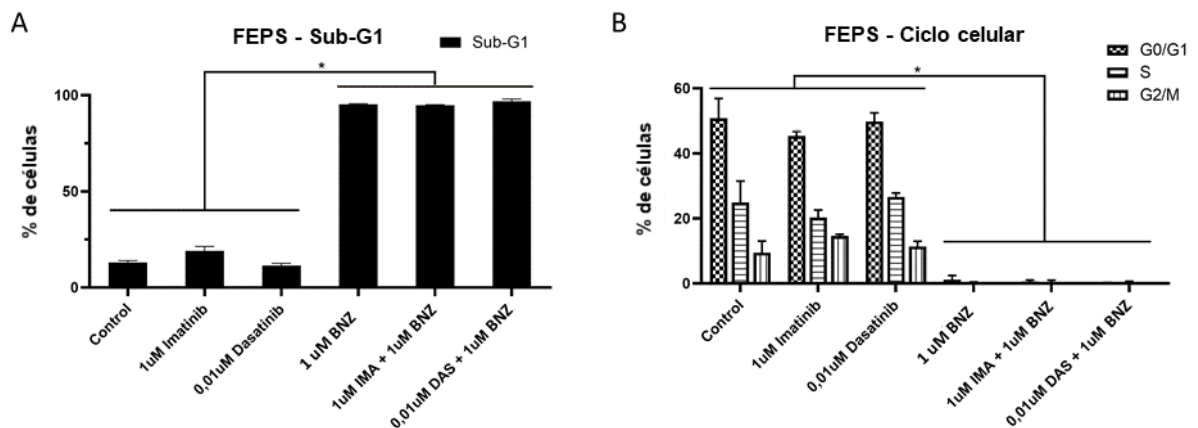
Gráfico 1 – Fragmentação e ciclo celular da linhagem K562 após o tratamento com BNZ e TKI's isolados e em combinação após 72h.



Legenda: A) Gráfico da % de células marcadas com IP inferior a concentração N de DNA (fase Sub-G1), indicando fragmentação celular. B) Gráfico da % de células em cada fase do ciclo celular. As barras representam a média \pm desvio padrão da média de 3 experimentos independentes analisadas estatisticamente segundo a metodologia. Diferença significativa: * $p \leq 0,01$; ** $p \leq 0,001$; e *** $p \leq 0,0001$.

De maneira similar, para a FEPS, a porcentagem de células fragmentadas no tratamento com o BNZ isolado e para as combinações foram estatisticamente diferentes ($p \leq 0,0001$) do controle e dos inibidores de tirosina quinase isolados. Nesse caso, a fragmentação foi tão alta que praticamente não foi possível determinar a fração de células nas diferentes fases do ciclo celular (Gráfico 2).

Gráfico 2 – Fragmentação e ciclo celular da linhagem FEPS após o tratamento com BNZ e TKI's isolados e em combinação após 72h.



Legenda: A) Gráfico da % de células marcadas com IP inferior a concentração N de DNA (fase Sub-G1), indicando fragmentação celular. B) Gráfico da % de células em cada fase do ciclo celular. As barras representam a média \pm desvio padrão da média de 3 experimentos independentes analisadas estatisticamente segundo a metodologia. Diferença significativa: * $p \leq 0,0001$.

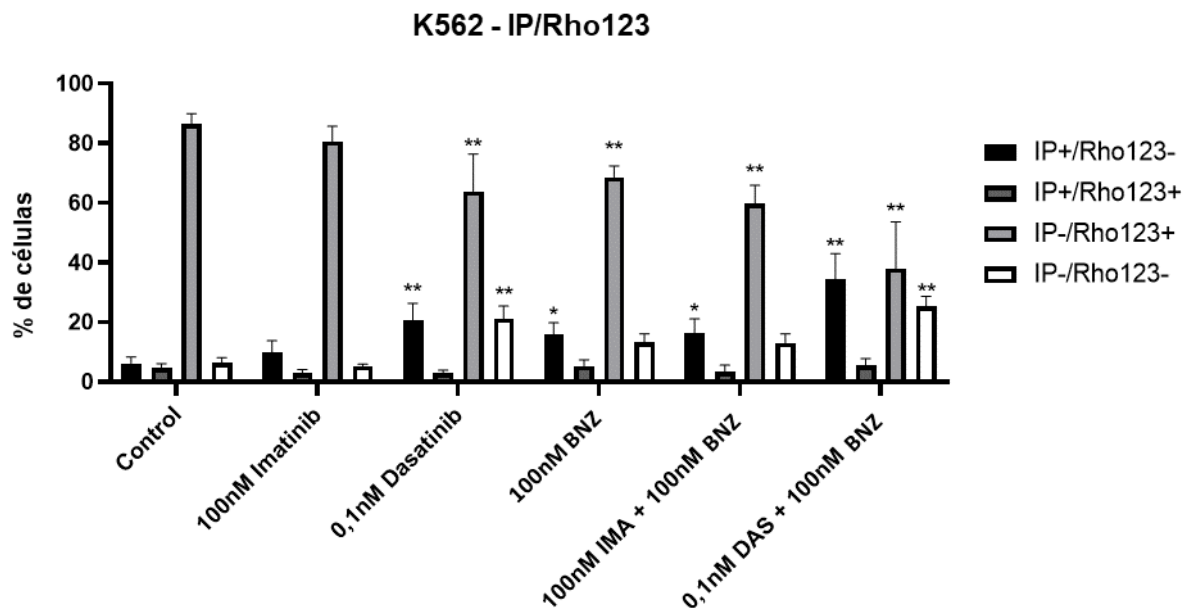
4.3 Avaliação da integridade da membrana celular e potencial da membrana mitocondrial

A fim de compreender o possível mecanismo de morte induzido BNZ nas linhagens leucêmicas K562 e FEPS, o ensaio de dupla marcação com Rodamina 123 e Iodeto de Propídio permitiu analisar simultaneamente a permeabilidade da membrana plasmática e a atividade mitocondrial das células tratadas. As células marcadas somente com Rho123 (IP-/Rho123+) são classificadas como viáveis, enquanto que as marcadas somente com IP são células em apoptose tardia ou necrose (IP+/Rho123-). As células em apoptose inicial são classificadas

como em perda inicial da função mitocondrial (IP-/Rho123-) ou perda inicial da integridade de membrana plasmática (IP+/Rho123+).

As células K562 frente ao tratamento com Dasatinibe e BNZ isolados, bem como a todas as combinações, tiveram redução de aproximadamente 22% e 18% da marcação IP-/Rho123+ ($p \leq 0,0001$), indicando redução do perfil viável. Para o BNZ isolado e sua combinação com Imatinibe essa diminuição ocorre por um aumento próximo a 10% das células em apoptose tardia/necrose ($p \leq 0,001$). Já Para o Dasatinibe isolado e sua combinação com o BNZ, essa redução ocorre tanto pelo aumento na porcentagem de células em apoptose tardia/necrose (próximo a 14% e 28%, respectivamente, $p \leq 0,0001$), como pelo aumento de células com a mitocôndria despolarizada (próximo a 15% e 19%, Gráfico 3).

Gráfico 3 – Efeitos do BNZ, TKI's e suas combinações na membrana plasmática e função mitocondrial da linhagem K562.



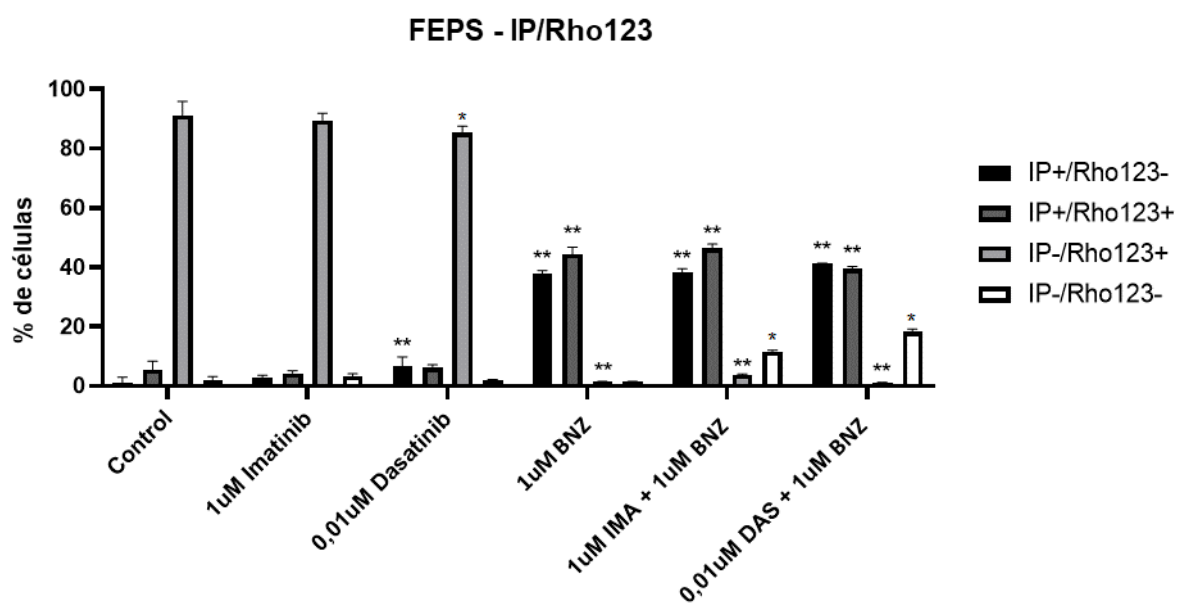
Legenda: Gráfico da % de células marcadas com IP e/ou Rho123 com barras representam a média \pm desvio padrão da média de 3 experimentos independentes analisadas estatisticamente segundo a metodologia. Diferença significativa: * $p \leq 0,001$ e ** $p \leq 0,0001$.

Para linhagem FEPS, assim como para a K562, os tratamentos com Dasatinibe e BNZ isolados e as combinações, incluindo a com Imatinibe, provocaram a redução de células com perfil viável (respectivamente, ~6%, $p \leq 0,01$; 89%, 87% e 90%, $p \leq 0,0001$). Para o tratamento com o Dasatinibe, essa redução ocorreu pelo aumento, mesmo que pequeno (5,5%, $p \leq 0,0001$), da quantidade de células IP+/Rho123-, indicando apoptose tardia/necrose. Já para o BNZ isolado a quantidade de células com perfil apoptótico foi significativamente superior (~37%) assim como para as duas outras combinações (38% e 39%, respectivamente para combinação

com IMA e DAS, $p \leq 0,0001$), mas que também possuem um aumento na quantidade de células com perda da função mitocondrial (11% e 18%, $p \leq 0,0001$,

Gráfico 4).

Gráfico 4 – Efeitos do BNZ, TKI's e suas combinações na membrana plasmática e função mitocondrial da linhagem FEPS.



Legenda: Gráfico da % de células marcadas com IP e/ou Rho123 com barras representam a média \pm desvio padrão da média de 3 experimentos independentes analisadas estatisticamente segundo a metodologia. Diferença significativa: * $p \leq 0,01$ e ** $p \leq 0,0001$.

4.4 Predição das propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas

A fim de compreender as características farmacocinéticas dos fármacos, o servidor *admetSAR 2.0* foi utilizado para a predição de algumas propriedades. Os dados com probabilidade igual ou superior a 70%, segundo o servidor, foram resumidos na *Tabela 3*.

Tabela 3 – Características farmacocinéticas segundo o admetSAR 2.0.

Propriedade	Fármaco				
Absorção	BNZ	ALB	IMA	DAS	ASC
Absorção Intestinal	+	+	+	+	+
Linhagem Caco-2 (permeabilidade)		-	-	-	-
Biodisponibilidade Oral		-	+		
Distribuição	BNZ	ALB	IMA	DAS	ASC
Barreira Hematoencefálica (permeabilidade)	+	+	+	+	+
Glicoproteína-P (inibição)		-	+	+	+
Glicoproteína-P (substrato)	-	-	+		+
Proteínas do plasma (% de ligação)	0,90%	1,15%	1%	1%	1,00%
Metabolismo	BNZ	ALB	IMA	DAS	ASC
OATP2B1 (inibição)	-	-		-	
OATP1B1 (inibição)	+	+	+	+	+
OATP1B3 (inibição)	+	+	+	+	+
MATE1 (inibição)	-	-			-
OCT2 (inibição)	-	-			-
BSEP (inibição)	+	-	+	+	+
CYP3A4 (substrato)				+	+
CYP2C9 (substrato)	-	+	-	-	-
CYP2D6 (substrato)	-	-	-	-	-
CYP3A4 (inibição)	-	-	-	+	
CYP2C9 (inibição)	-	-	-	+	
CYP2C19 (inibição)	-	-	-		
CYP2D6 (inibição)	-	-	-	-	-
CYP1A2 (inibição)	+	+			-
CYP (promiscuidade inibição)	-	-	-	+	
Receptor de Estrógeno (ligação)	+	+	+	+	
Receptor de Andrógeno (ligação)	+	+	+	+	
Receptor de Tireoide (ligação)		+			+
Receptor de Glicocorticoide (ligação)	+	+		+	
Aromatase (ligação)	+	+		+	
PPAR gamma (ativação)	+	+	+	+	+
Toxicidade	BNZ	ALB	IMA	DAS	ASC
Carcinogênico	-	-	-	-	-
Corrosão ocular	-	-	-	-	-
Irritação ocular	-	-		-	-
Micronúcleo	+	+	+	+	+
Hepatotoxicidade	+	+	+	+	+
Toxicidade Oral Aguda	III	III	III	III	
Toxicidade a abelha		+	-	-	-
Biodegradação	-	-	-	-	-
Toxicidade a peixe	+	+	+	+	+

Legenda: Os espaços em branco são referentes a informações de baixa confiança (probabilidade calculada pelo servidor inferior a 70%).

Além das moléculas estudadas *in vitro* a molécula Asciminibe (ASC) também foi avaliada, por se tratar de uma molécula co-cristalizada com uma das estruturas utilizadas no ancoramento molecular (PDBID: 5MO4). Mesmo se tratando de moléculas já aprovadas por órgãos de regulamentação, ou em estudo clínico, a análise *in silico* das propriedades farmacocinéticas pode nos ajudar a compreender melhor as atividades nos experimentos *in vitro* bem como identificar informações de estudos mais atuais.

Dentre as informações que puderam ser comparadas entre as moléculas, por apresentar probabilidade da predição adequada para análise ($\geq 70\%$), as seguintes informações foram as mesmas para as 5: passivamente absorvidas pelo intestinal humana, permeabilidade à barreira hematoencefálica, inibição das proteínas OATP1B1 e OATP1B3, substrato e inibição da enzima CYP2D6, ausência de potencial carcinogênico e de corrosão ocular, hepatotoxicidade e danos pelo ensaio do micronúcleo, ausência de biodegradação e potencial de toxicidade a peixe.

Além da predição das características farmacocinéticas, também foi possível utilizar outros servidores para estudar o perfil farmacodinâmico dos compostos. O servidor Molinspiration permite utilizar a função de predição da atividade biológica, classificando as moléculas como inativa (escore $< -0,5$), moderada ($-0,5 \leq \text{escore} < 0,0$) e ativa (escore $\geq 0,0$) para cada classificação.

A Tabela 4 resume os valores calculados para cada um dos fármacos estudados. Com exceção do Albendazol, todas as moléculas apresentaram perfil ativo para inibição de quinases. Os fármacos Imatinibe e Dasatinibe também apresentaram atividade como inibidor enzimático e ligante de GPCR. O Albendazol e o Dasatinibe apresentaram perfil inativo para ligante de receptor nuclear. Para as outras classificações, as moléculas foram caracterizadas com atividade moderada.

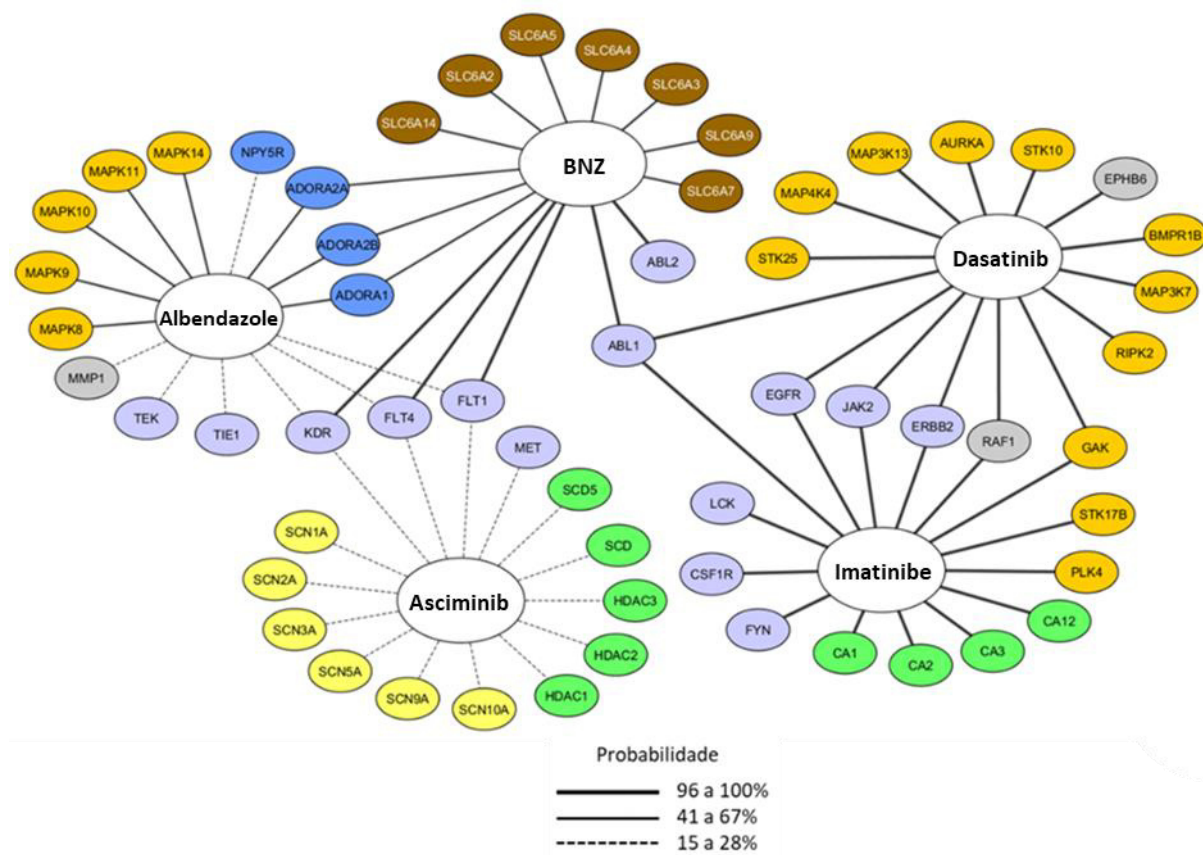
Tabela 4 – Predição da função biológica pelo servidor Molinspiration.

Bioatividade	ALB	BNZ	IMA	DAS	ASC
Inibidor de quinase	-0,04	0,14*	0,59*	0,62*	0,68*
Inibidor enzimático	-0,02	-0,05	0,07*	0,05*	-0,09
Inibidor de proteases	-0,18	-0,29	-0,08	-0,28	-0,06
Ligante de GPCR	-0,11	-0,12	0,10*	0,01*	-0,02
Ligante de receptor nuclear	-0,62	-0,23	-0,40	-0,59	-0,46
Modulador de canal iônico	-0,10	-0,29	-0,09	-0,23	-0,20

Para buscar identificar possíveis alvos biológicos que auxiliem na compreensão do redirecionamento, foi feita a predição de alvos farmacodinâmicos por meio do servidor SwissTarget Prediction. A Figura 7 compila os alvos preditos, sua probabilidade, classificação

e permite identificar os alvos em comum para as moléculas estudadas além do BNZ.

Figura 7 – Predição de alvos moleculares segundo o servidor SwissTarget Prediction.



Legenda: A espessura da linha representa a probabilidade do alvo predito ser um alvo conhecido e cor ao redor da identificação a classe, respectivamente: roxo – tirosino-quinase; laranja – serina/treonina quinase; verde – enzima; azul – receptor de membrana; marrom – transportador; amarelo – canal iônico; cinza – outros.

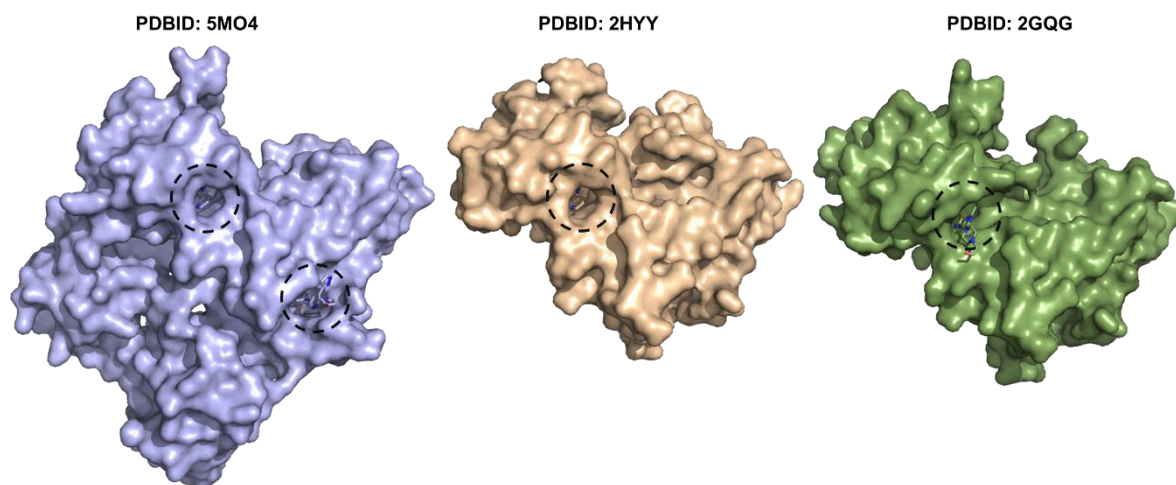
O perfil dos alvos moleculares preditos pelo servidor coincidiu com a predição de bioatividade do servidor Molinspiration, com 30 dos 59 possíveis alvos classificados como quinases. Desses, vale destacar a proteína ABL1 como um alvo importante para o BNZ no contexto da leucemia mieloide crônica.

4.5 Estudo *in silico* via ancoramento molecular

Diante do potencial da proteína ABL1 ser um alvo molecular do BNZ, foi realizado o estudo de ancoramento molecular para estudar a viabilidade da interação com a molécula. Dessa forma, foram selecionadas 3 estruturas do Protein Data Bank para representar as conformações ativa (PDBID: 2GQG) e inativa (PDBID: 2HYY), e uma terceira estrutura apresentando a mutação T315I (PDBID:5MO4), a qual é associada a resistência tanto ao Imatinib, como ao

Dasatinib (Figura 8).

Figura 8 – Estruturas da proteína ABL1 utilizadas durante as simulações de ancoramento molecular.



Legenda: os círculos listrados destacam regiões com ligantes co-cristalizados na estrutura depositada no PDB.

Após a seleção e preparo de todas as estruturas, afim de identificar o possível sítio de ligação do BNZ, foram selecionados dois sítios de ligação da proteína ABL1 para realizar o estudo de ancoragem. O primeiro deles foi o sítio de ligação ao ATP, com moléculas co-cristalizadas nas 3 estruturas selecionadas, o que permitiu o *re-docking* dessas moléculas em suas respectivas posições para a parametrização do Autodock 4.2.1.

Para a definição do sítio alostérico, a estrutura 5MO4, com o fármaco Albendazol co-cristalizado, que permitiu o *cross-docking* nas outras 2 estruturas, foi girada manualmente pelo PyMol para gerar uma melhor posição do desenho do *grid box* no Autodock Tools. A mesma posição final pode ser obtida aplicando o seguinte comando, pelo PyMol, à estrutura 5MO4:

```
cmd.transform_object("5MO4", [0.667938232421875, 0.5703688859939575,
, -0.4780563414096832, -22.541687516368967, -
0.6487796902656555, 0.7609749436378479, 0.0014468592125922441, -
24.245908976353512, 0.3646141290664673, 0.30918681621551514, 0.87832
79657363892, 11.068624364312086, 0.0, 0.0, 0.0, 1.0])
```

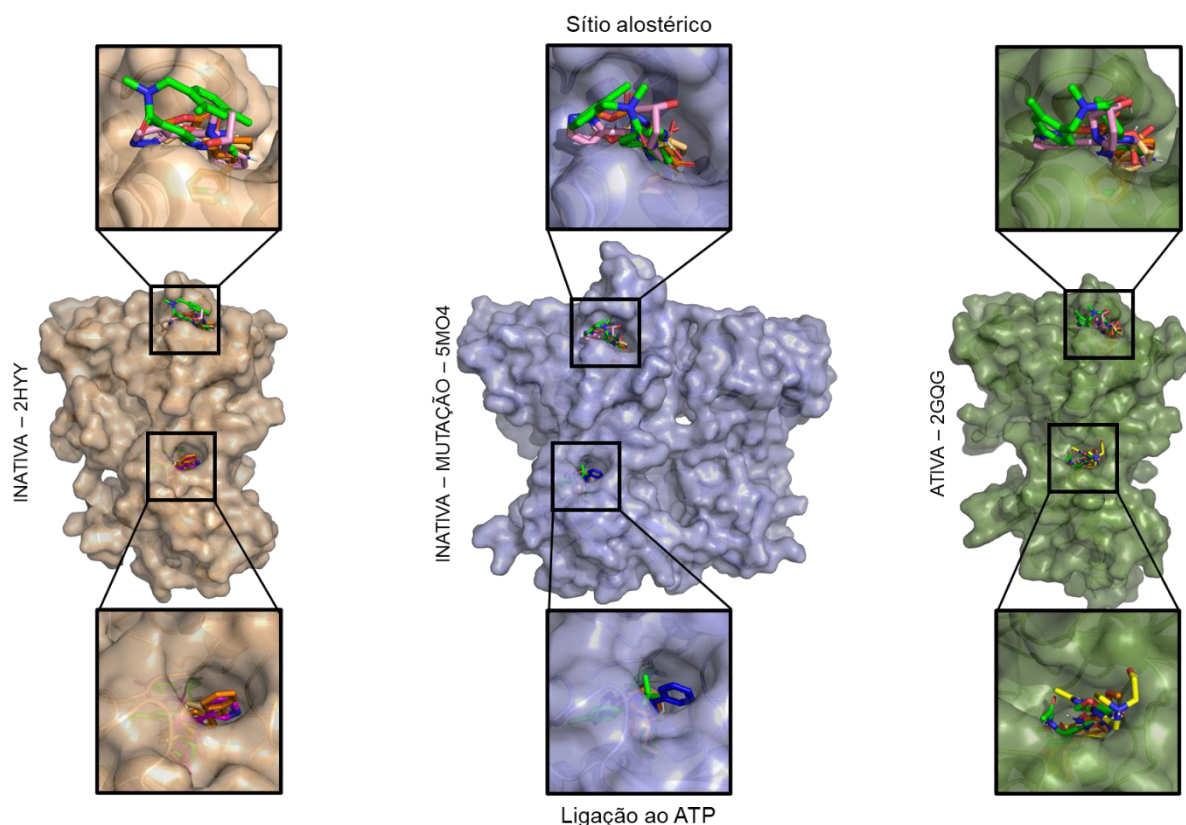
Dessa forma, a Tabela 5 resume as coordenadas da *grid box* definida para o sítio de ligação ATP, após o alinhamento espacial com a estrutura 5MO4, e as coordenadas para o sítio alostérico, após girar a 5MO4 manualmente e alinhar as estruturas na nova posição.

Tabela 5 – Coordenadas do *grid box* para o Autodock 4.2.1

Sítio de ligação	Coordenadas do centro			Dimensões do tamanho		
	x	y	z	x	y	z
Ligação ao ATP	-44.882	20.781	-16.173	34	74	44
Alostérico	-44.555	21.178	8.170	48	20	10

Com a finalidade de auxiliar na parametrização e avaliação da ancoragem, foi utilizado o servidor DUDE-E para obter um conjunto de estruturas moleculares representando falsos ligantes positivo (*decoys*) para cada sítio de ligação das estruturas co-cristalizadas. Dessa forma, um resultado favorável seria aquele com energia de ligação (em kcal/mol) mais favorável (mais negativo) que o do *decoy*. Assim, foram obtidas 900 por ligante para cada sítio de ligação e o resultado do melhor *cluster* foi selecionado para inspeção visual (Figura 9).

Figura 9 – Posição final dos ligantes gerada pelo software autodock 4.2.1 para o sítio alostérico e o sítio de ligação ao ATP das estruturas selecionadas.



A Tabela 6 e 7 resumem os resultados para o *docking* no sítio de ligação ao ATP e no sítio alostérico, respectivamente. O valor de RMSD para a parametrização das estruturas foi inferior a 2Å quando comparado às estruturas co-cristalizadas, evidenciando que os parâmetros

favoreceram a adequação da simulação.

Tabela 6 – Valores de energia de ligação (ΔG) e IC_{50} dos *dockings* para o sítio de ligação ao ATP da proteína ABL1.

PDB	Ligante	ΔG (kcal/mol)	IC_{50} (μM)	RMSD (Å)
2HYY	Imatinibe	-11,95	0,00174	1,015
	<i>Decoy1</i>	-7,06	6,65	-
	BNZ	-7,44	3,54	-
	<i>Albendazol</i>	-6,09	34,51	-
5MO4	Nilotinibe	-11,25	0,0057	0,363
	<i>Decoy2</i>	-8,98	0,25956	-
	BNZ	-7,10	6,29	-
	<i>Albendazol</i>	-6,88	9,44	-
2GQG	Dasatinibe	-8,49	0,60278	1,513
	<i>Decoy3</i>	-5,84	52,32	-
	BNZ	-6,17	30,16	-
	<i>Albendazol</i>	-5,37	116,61	-

Para o sítio de ligação ao ATP (Tabela 6), quando comparado ao ligante controle (aquele utilizado para o cálculo do RMSD), tanto o BNZ como o Albendazol apresentaram energia de ligação menos favorável (ou seja, mais positiva). Além disso, para esse sítio de ligação, os benzimidazóis testados apresentaram resultados próximos ao do ligante falso positivo.

Tabela 7 – Valores de energia de ligação (ΔG) e IC_{50} dos *dockings* para o sítio alostérico da proteína ABL1.

PDB	Ligante	ΔG (kcal/mol)	IC_{50} (μM)	RMSD (Å)
2HYY	Asciminibe	-8,86	0,31931	1,750
	<i>Decoy4</i>	-5,5	85,49	-
	BNZ	-8,9	0,295	-
	<i>Albendazol</i>	-7,35	4,11	-
5MO4	Asciminibe	-6,08	34,88	1,479
	<i>Decoy4</i>	-4,62	411,88	-
	BNZ	-6,98	7,69	-
	<i>Albendazol</i>	-6,14	31,84	-
2GQG	Asciminibe	-5,97	42,08	1,395
	<i>Decoy4</i>	-3,84	1530	-
	BNZ	-7,04	6,95	-
	<i>Albendazol</i>	-6,08	34,93	-

Já para o sítio alostérico (Tabela 7), os benzimidazóis conseguiram um valor de energia

de interação mais favorável que o *decoy* (ou seja, mais negativa). Além disso, o BNZ apresentou os resultados mais favoráveis. Quando essa região das estruturas 2HYY, 5MO4 e 2GQG foi utilizada para as simulações de docking, foi possível observar que o BNZ tem a capacidade de ligar ao sítio alostérico com energia mais favorável (2GQG: -7,04 kcal/mol; 2HYY: -8,9 kcal/mol; 5MO4: -6,98 kcal/mol) que o próprio inibidor alostérico Asciminibe (2GQG: -5,97 kcal/mol; 2HYY: -8,86 kcal/mol; 5MO4: -6,08 kcal/mol).

Para estudar as possíveis interações a nível molecular entre sítio alostérico da proteína ABL1 e o BNZ, também foi investigado a presença ou ausência de interações proteína-ligante a partir dos resultados obtidos das simulações pelo Autodock 4.2. O programa Discovery Studio facilitou a descrição dessas interações e a entender como as mesmas estão estabelecidas, bem como quais os resíduos da proteína que estão envolvidos (Tabela 8).

Tabela 8 – Potenciais ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas entre o BNZ e o sítio alostérico da proteína ABL1

A				B			
PDB	Interação Receptor-Ligante	Distância (Å)	Categoria	PDB	Interação Receptor-Ligante	Distância (Å)	Categoria
2HYY	BNZ:H2N2 - ALA433:O	1,95	Ligação de H	5MO4	BNZ:H - ALA452:O	2,99	Ligação de H
	BNZ:H1C6 - GLU462:O	2,28	Ligação de H		BNZ:H - GLU481:O	2,07	Ligação de H
	BNZ - TYR435	5,75	Hidrofóbica		ALA356:HA - :BNZ:O	2,82	Ligação de H
	BNZ - LEU340	4,85	Hidrofóbica		BNZ:H12 - GLU481:O	2,5	Ligação de H
	BNZ - ALA433	4,7	Hidrofóbica		VAL487:CG1 - BNZ	4	Hidrofóbica
	BNZ - ALA337	4,57	Hidrofóbica		CYS483:SG - BNZ	5,43	Outra
	BNZ - LEU340	4,3	Hidrofóbica		LEU359:C.O:LEU360:N - BNZ	4,63	Hidrofóbica
	BNZ - ALA433	5	Hidrofóbica		BNZ - ALA452	5,47	Hidrofóbica
	BNZ - CYS464	5,3	Hidrofóbica		BNZ - VAL525	4,7	Hidrofóbica
	BNZ - PRO465	4,84	Hidrofóbica		BNZ - ALA356	5,46	Hidrofóbica
	BNZ - LEU340	5,31	Hidrofóbica		BNZ - LEU359	5,38	Hidrofóbica
	BNZ - ALA344	4,56	Hidrofóbica		BNZ - ALA452	4,32	Hidrofóbica
	BNZ - LEU429	5,2	Hidrofóbica		BNZ - VAL525	4,8	Hidrofóbica
	BNZ - ILE432	4,72	Hidrofóbica		BNZ - ALA363	4,59	Hidrofóbica
BNZ - ALA433	4,59	Hidrofóbica	BNZ - ILE451	5,26	Hidrofóbica		
BNZ - VAL468	4,12	Hidrofóbica	BNZ - ALA452	4,92	Hidrofóbica		
C							
PDB	Interação Receptor-Ligante	Distância (Å)	Categoria				
2GQG	BNZ:H - ALA433:O	1,85	Ligação de H				
	GLY463:HA2 - BNZ:O	2,28	Ligação de H				
	BNZ:H13 - GLU462:O	2,66	Ligação de H				
	BNZ:H13 - GLU462:OE1	3,01	Ligação de H				
	CYS464:SG - BNZ	5,36	Outra				
	BNZ - ALA337	5,41	Hidrofóbica				
	BNZ - LEU340	4,88	Hidrofóbica				
	BNZ - ALA433	4,89	Hidrofóbica				
	BNZ - ALA337	4,42	Hidrofóbica				
	BNZ - LEU340	4,57	Hidrofóbica				
	BNZ - ALA433	5,13	Hidrofóbica				
	BNZ - CYS464	5,14	Hidrofóbica				
	BNZ - PRO465	4,69	Hidrofóbica				
	BNZ - ALA344	4,66	Hidrofóbica				
	BNZ - LEU429	4,84	Hidrofóbica				
	BNZ - ILE432	5,06	Hidrofóbica				
	BNZ - ALA433	4,36	Hidrofóbica				
	BNZ - VAL468	4,28	Hidrofóbica				

Os parâmetros estabelecidos puderam ser validados pelo *redcoking* do Asciminibe na ABL1, com RMSD variando de 1.39 a 1.75Å para o ligante co-cristalizado. Dentre as interações do Asciminibe com a estrutura, vale destacar as ligações de hidrogênio (convencionais ou de carbono) com os resíduos Gln333, Ala337, Leu341, Tyr435 e Cys464 (Anexo I). Para a metodologia de ancoragem que foi aplicada nesse trabalho, tanto para o Asciminibe, como para o *docking* do BNZ, houve o consenso para as ligações de H com os resíduos Ala433 e Glu462. A ancoragem do BNZ também apresentou, esse tipo de interação com o resíduo Gly463, bem como os presentes no Anexo II. A distância entre as interações ficou entre 1.80 e 3.07 angstroms. Além disso, o RMSD entre os resíduos envolvidos nas interações ficou entre 0.43 e 2 Å para as 3 estruturas selecionadas do PDB e entre (Tabela 9).

Tabela 9 – Consenso dos resíduos das ligações de hidrogênio envolvidas com o controle e o BNZ

A				B			
ASC				BNZ			
PDB	Interação	Receptor-Ligante	Distância (Å)	PDB	Interação	Receptor-Ligante	Distância (Å)
2HYY	ASC:H18	- ALA433:O	2,14	2HYY	BNZ:H2N2	- ALA433:O	1,95
	ARG332:HD1	- ASC:O23	2,66		BNZ:H1C6	- GLU462:O	2,28
	LEU341:HA	- ASC:F	2,52	5MO4	BNZ:H	- ALA452:O	2,99
	CYS464:HA	- ASC:O15	2,62		BNZ:H	- GLU481:O	2,07
	ASC:H1	- TYR435:OH	3,07		ALA356:HA	- :BNZ:O	2,82
5MO4	ASC:H16	- ALA452:O	2,12	BNZ:H12	- GLU481:O	2,5	
	ASC:H18	- GLU481:O	1,8	2GQG	BNZ:H	- ALA433:O	1,85
	LEU360:HA	- ASC:F29	2,51		GLY463:HA2	- BNZ:O	2,28
LEU360:HA	- ASC:F30	2,33	BNZ:H13		- GLU462:O	2,66	
ASC:H18	- GLU462:O	1,99	BNZ:H13		- GLU462:OE1	3,01	
2GQG	ALA337:HA	- ASC:O15	2,48				
	LEU341:HA	- ASC:F	2,09				
	ASC:H7	- GLU462:OE1	2,78				
	ASC:H8	- GLU462:OE1	2,6				

4. DISCUSSÃO

A leucemia mieloide crônica é uma neoplasia que representa uma parcela significativa dos novos casos de leucemia em adultos, casos estes que tendem a crescer em mais de 60% até 2040 segundo estimativas globais (GLOBOCAN, 2020). Somado ao aumento de casos, o tratamento da LMC é um desafio complexo frente a quimiorresistência aos fármacos de primeira geração (como Imatinibe e Dasatinibe) (JABBOUR; KANTARJIAN, 2020). Diante dessa problemática, a descoberta e o desenvolvimento de novas terapias ainda são necessários para atender aos pacientes que sofrem de LMC.

O desenvolvimento de novos fármacos já é conhecido por ser um processo que pode demandar anos e investimentos que podem alcançar a escala de bilhões de dólares. Durante o ano de 2020, com a pandemia do vírus SARS-CoV-2, surgiu a urgência de encontrar fármacos eficazes mais em um espaço de tempo muito curto (WENG *et al.*, 2020). Nesse cenário, o redirecionamento de fármacos veio como uma estratégia atrativa para essa busca, e a utilização de ferramentas computacionais uma técnica que permite obter informações valiosas para esse fim (ALTAY *et al.*, 2020).

No presente trabalho, foram analisadas informações obtidas a partir de técnicas *in silico* e *in vitro*, visando o redirecionamento de um derivado de benzimidazol para o tratamento da LMC. Para esse fim, foram utilizadas linhagens de leucemia mieloide crônica sensível, K562, e quimiorresistente, FEPS (LOZZIO; LOZZIO, 1975; RUMJANEK; VIDAL; MAIA, 2013). Paralelamente, os servidores admetSAR (<http://lmm.d.ecust.edu.cn/admetSAR2/>), molinspiration (<http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>) e SwissTarget Prediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) também forneceram dados que guiaram o trabalho.

A união de técnicas *in silico* e *in vitro* para a abordagem de redirecionamento de fármacos tem representado uma das principais áreas de atividade da descoberta de novas terapias, em que instituições e grupos de pesquisa estão cada vez mais obtendo espaço (OPREA *et al.*, 2011). Além disso, é importante ressaltar que trabalhos anteriores já tiveram sucesso em encontrar evidências para o redirecionamento de benzimidazóis, para outros tipos de câncer, por meio da união dessas técnicas (JUBIE *et al.*, 2018).

Os resultados de citotoxicidade dos derivados de benzimidazol apresentados na literatura já foram encontrados para alguns tipos de câncer e apresentam um consenso quanto ao ampla inefetividade nos modelos de linhagem de células não malignas (NYGREN *et al.*, 2013; PINTO *et al.*, 2015). Vale destacar que membros dessa família provocaram inibição de

50% do crescimento celular em concentrações $\sim 0,4 \mu\text{M}$ para células H460, A549 e H1299 de carcinoma de pulmão (SASAKI *et al.*, 2002); concentrações $\sim 0,5 \mu\text{M}$ para células HCT116, RKO, HT-29, HT-8 e SW626 de câncer de cólon (NYGREN *et al.*, 2013); e $\sim 0,5 \mu\text{M}$ para células AGP01 de câncer gástrico (PINTO *et al.*, 2015). Entretanto, esse é o primeiro trabalho a mostrar resultados de um derivado dessa família em LMC.

Como mostrado no ensaio de citotoxicidade, o composto de estudo desse trabalho (BNZ) foi identificado como citotóxico contra a linhagem de leucemia mieloide crônica do tipo sensível (K562) com IC_{50} de 104,3 nM, e a linhagem resistente FEPS (1.917,0 nM), informação relevante considerando o resultado inferior de outro membro da mesma família (Albendazol, ALB) frente a linhagem K562. Este é um resultado importante, considerando que as células aqui utilizadas representam uma ferramenta indispensável na seleção de novos fármacos para LMC, além de possuírem características que dão origem ao modelo tumoral da doença *in vivo* (DE OLIVEIRA SALES *et al.*, 2019).

Além da proposta de redirecionamento, a combinação do derivado com inibidores de tirosina quinase também é uma inovação desse trabalho. Segundo os dados obtidos, teoricamente a combinação do derivado com os inibidores testados parece promover um índice de redução de até 16x, para a combinação com Dasatinibe na linhagem sensível, e de 6x combinado com o Imatinibe, para a linhagem resistente.

Para confirmar o efeito citotóxico do BNZ nas linhagens de LMC, foi feita a análise de citometria. O aumento da quantidade de células fragmentadas e a redução de células na fase G0/G1 sugere que o BNZ (isolado e em combinação) em concentrações nanomolares é capaz de promover um arraste para a fase sub-G1 do ciclo celular da K562. Resultado similar ao mecanismo de derivados de benzimidazol descrito para células de câncer de pulmão e câncer de fígado (SRIDHAR GOUD *et al.*, 2020; YOUSSEF *et al.*, 2012). Da mesma forma, o BNZ parece sensibilizar a linhagem FEPS ao Imatinibe, provocando grande acúmulo na fragmentação.

Juntamente com a citometria, o ensaio de dupla marcação com IP/Rho123 também foi proposto para avaliar a capacidade do BNZ induzir efeitos pró-apoptóticos nas células de LMC. Assim, o tratamento dessas células com o BNZ em concentrações nanomolares permitiu observar um acúmulo de células marcadas com Iodeto, indicando desestabilização da membrana celular, sem acúmulo de Rodamina 123, sinal de despolarização da membrana mitocondrial, características da apoptose por via intrínseca (D'ARCY, 2019; DARZYNKIEWICZ; LI; GONG, 1994)

Em paralelo, os resultados *in silico* forneceram informações que agregaram valor ao

trabalho. A investigação em servidores que revelam propriedades farmacocinéticas ajudou a confirmar características ADMET já conhecidas para o composto estudado, como boa absorção intestinal e permeabilidade à barreira hematoencefálica, baixa toxicidade; além de informações que podem ajudar a compreender um pouco mais os resultados *in vitro*. Aqui, vale destacar o a informação do BNZ não ser identificado como substrato da glicoproteína-p, característica que pode contribuir para maior citotoxicidade frente a células com perfil de resistência a múltiplos fármacos (MDR) (KRÁLOVÁ *et al.*, 2013).

Da mesma maneira, a investigação farmacodinâmica, por meio dos servidores e da técnica de ancoragem molecular, é um esforço para iniciar o entendimento do efeito molecular do BNZ nas células. A identificação do BNZ com perfil de inibição de quinase pelo servidor molinspiration, juntamente com a predição da proteína ABL1 como principal alvo pelo servidor SwissTarget Prediction, são resultados em sinergia, unindo servidores cuja base de dados soma mais de 300.000 compostos com atividade molecular (MOLINSPIRATION, 2011; GFELLER *et al.*, 2014).

Diante das evidências relacionadas a proteína ABL1, foi realizado o estudo de ancoragem (*docking*) molecular entre o BNZ e esse alvo. Como já se sabe que a proteína ABL1 adota as conformações ativa e inativa, coube a esse trabalho investigar a interação do BNZ ao sítio de ligação ao ATP nessas diferentes situações, por meio das estruturas 2GQG e 2HYY, respectivamente. Além disso, como a mutação T315I que ocorre nessa região é responsável por prejudicar a eficácia dos fármacos, a estrutura depositada com o código 5MO4 foi selecionada para o *docking*, representando a proteína resistente. Essas proteínas também já serviram de material para descoberta de novos inibidores em trabalhos anteriores (SCHOEPFER *et al.*, 2018; XU *et al.*, 2014).

Para a energia de ligação (ΔG) entre o ligante e a proteína alvo, resultados similares entre o inibidor conhecido e a nova molécula podem indicar que a molécula em estudo compartilha aquele alvo, fato que já indicou duas moléculas aprovadas pelo FDA como candidatas para inibição da ABL1 T315I (XU *et al.*, 2014). Neste trabalho, o BNZ não apresentou tais resultados com respeito a interação no sítio da proteína ABL1 selvagem e mutante, excluindo inicialmente a possibilidade desse sítio de interação.

Além da mutação T315I, existem outras mutações que podem surgir durante o tratamento com moléculas competitivas do sítio de ATP da proteína, prejudicando a eficácia desses fármacos. Assim, fármacos que tem como alvo o sítio alostérico da proteína ABL1 seriam capazes de manter a atividade frente a essas mutações, além de possuírem uma especificidade de quinase superior (SCHOEPFER *et al.*, 2018). Esse parece ser o caso do

composto estudado nesse trabalho, que apresentou resultados favoráveis de *docking* molecular, com ΔG semelhante (ou melhor) ao do ligante nativo do sítio alostérico, para as 3 estruturas estudadas.

A interação do BNZ com os resíduos Ala433, Glu462 e Gly463 da proteína ABL1 encontradas neste trabalho, parecem ser essenciais para o efeito citotóxico nas linhagens de LMC, visto que a importância desses resíduos está de acordo com outros trabalhos. Por exemplo, em resultados preliminares do ensaio clínico de fase I do Asciminibe, a mutação da Gly463 foi responsável por anular a sensibilidade ao inibidor alostérico (MANLEY; BARYS; COWAN-JACOB, 2020). Entretanto, assim como para mutação da Ala433, essas são mutações possuem baixíssima frequência, e que precisam acumular com outras em resíduos próximos para reduzir a resistência do inibidor alostérico (EIDE et al., 2019). Assim, a presença de ligações de hidrogênio entre o BNZ e esses resíduos também parece essencial para o efeito alostérico, como já foi descrito para a interação com a Glu462 investigada para outro ligante (SCHOEPFER *et al.*, 2018).

A baixa frequência da mutação dos resíduos, unida ao fato de quando presente não provocar efeito na sensibilidade dos inibidores do sítio de ligação ao ATP (como o Imatinibe e Dasatinibe), indica que possíveis inibidores alostéricos como o BNZ podem ser utilizados em combinação para superar as mutações de resistência que tendem a ocorrer com inibidores do tipo I e tipo II (SCHOEPFER *et al.*, 2018). No presente trabalho, pelo menos para o Imatinibe, a combinação frente a linhagem resistente produziu resultados favoráveis, gerando perspectiva para trabalhos futuros com outros inibidores de tirosina quinase, bem como ajuste de concentração para a combinação com o Dasatinibe.

Também vale destacar que, as conformações do BNZ preditas pelo *docking* podem ser uma etapa inicial para estudos posteriores de bioquímica quântica, como a aplicação da Teoria Funcional da Densidade em combinação com o Fracionamento Molecular com *Caps* Conjugados, para estudar o perfil de interação entre o ligante e os resíduos do sítio de interação (ZANATTA, 2014).

Portanto, até o presente momento, foi possível avaliar o potencial anticâncer do BNZ frente linhagens de Leucemia Mieloide Crônica sensível e resistente. Esse potencial também foi avaliado para a combinação com os fármacos Imatinibe e Dasatinibe. Além disso, foi utilizada uma abordagem com ferramentas computacionais, como um esforço para compreender melhor alguns resultados.

5. CONCLUSÕES

O presente trabalho mostrou que o BNZ, fármaco derivado da família dos benzimidazóis, possui potencial anticâncer frente as linhagens de leucemia mieloide crônica sensível (K562) e resistente (FEPS). Além disso, a combinação desse fármaco com o Imatinibe (IMA) ou Dasatinibe (DAS) também foi favorável, principalmente pelo efeito sinérgico da combinação com o IMA para a linhagem resistente, o que pode representar uma nova estratégia para uma resposta mais eficiente da quimioterapia em casos de resistência.

Esse composto produziu um arraste das células em G0/G1 para sub-G1 em ambas as linhagens testadas, assim como em combinação. A dupla marcação IP/Rho123 revelou células com membrana celular fragmentadas e mitocôndrias despolarizadas, indicando atuação do BNZ pela via de apoptose intrínseca, ainda que mais estudos sejam necessários para estudar esse mecanismo de morte.

Os resultados *in silico* revelam características farmacocinéticas favoráveis do BNZ, o que já era esperado, mas a identificação desse ligante como não sendo um substrato das proteínas de efluxo chamou atenção. Além disso, a proteína ABL1 pode ser reconhecida como principal alvo de atuação do BNZ, com destaque para interação por meio do sítio alostérico e a participação dos resíduos Ala433, Glu462 e Gly463 como fundamental.

A possibilidade do BNZ como inibidor alostérico está alinhado como o resultado favorável das combinações aqui utilizadas e pode ser a base para estudos posteriores de novas combinações. Um passo importante para a continuidade desse trabalho será a realização de técnicas mais avançadas de bioinformática, como a bioquímica quântica, e a compreensão da regulação de genes relacionados a leucemogênese.

REFERÊNCIAS

- ABBAS. **Imunologia - Abbas 7^a ed.** [s.l: s.n.].
- ALVES, V. M. et al. Cheminformatics: An introduction. **Quimica Nova**, v. 41, n. 2, p. 202–212, 2018.
- ANDRESEN, V.; GJERTSEN, B. T. Drug Repurposing for the Treatment of Acute Myeloid Leukemia. **Frontiers in Medicine**, v. 4, n. November, p. 1–11, 2017.
- ARORA, A.; SCHOLAR, E. M. Role of tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 315, n. 3, p. 971–979, 2005.
- BAI, R. Y. et al. Antiparasitic mebendazole shows survival benefit in 2 preclinical models of glioblastoma multiforme. **Neuro-Oncology**, v. 13, n. 9, p. 974–982, 2011.
- BALMAIN, A.; YUSPA, S. H. Milestones in Skin Carcinogenesis: The Biology of Multistage Carcinogenesis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 134, n. September, p. E2–E7, 2014.
- BLACKADAR, C. B. Historical review of the causes of cancer. **World Journal of Clinical Oncology**, v. 7, n. 1, p. 54–86, 2016.
- BLOM, T. et al. Characterization of a human Basophil-like cell line (LAMA-84). **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 44, n. 1, p. 54–61, 1996.
- BOLLMANN, P. W.; GIGLIO, A. DEL. Leucemia mieloide crônica: passado, presente, futuro. **Revendo Ciências Básicas**, v. 9, n. 11, p. 236–243, 2011.
- BUTINA, D.; SEGALL, M. D.; FRANKCOMBE, K. Predicting ADME properties in silico: Methods and models. **Drug Discovery Today**, v. 7, n. 11, p. 83–88, 2002.
- CHENG, F. et al. AdmetSAR: A comprehensive source and free tool for assessment of chemical ADMET properties. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 52, n. 11, p. 3099–3105, 2012.
- CHISESI, T.; CAPNIST, G.; FIOR, S. D. Splenic irradiation in chronic lymphocytic leukemia. **European Journal of Haematology**, v. 46, n. 4, p. 202–204, 24 abr. 1991.

- CHOU, T. C. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. **Pharmacological Reviews**, v. 58, n. 3, p. 621–681, 2006.
- CILLONI, D.; SAGLIO, G. Molecular pathways: BCR-ABL. **Clinical Cancer Research**, v. 18, n. 4, p. 930–937, 2012.
- D'ARCY, M. S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. **Cell Biology International**, v. 43, n. 6, p. 582–592, 2019.
- DAFLON-YUNES, N. et al. Characterization of a multidrug-resistant chronic myeloid leukemia cell line presenting multiple resistance mechanisms. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 383, n. 1–2, p. 123–135, 2013.
- DANISZ, K.; BLASIAK, J. Role of anti-apoptotic pathways activated by BCR/ABL in the resistance of chronic myeloid leukemia cells to tyrosine kinase inhibitors. **Acta Biochimica Polonica**, v. 60, n. 4, p. 503–514, 2013.
- DARZYNKIEWICZ, Z.; LI, X.; GONG, J. Assays of Cell Viability: Discrimination of Cells Dying by Apoptosis. **Methods in Cell Biology**, v. 41, n. C, p. 15–38, 1994.
- DE OLIVEIRA SALES, L. et al. Comparison of BCR-ABL transcript variants between patients with chronic myeloid leukaemia and leukaemia cell lines. **In Vivo**, v. 33, n. 4, p. 1119–1125, 2019.
- DEININGER, M. W. N.; GOLDMAN, J. M.; MELO, J. V. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. **Blood**, v. 96, n. 10, p. 3343–3356, 2000.
- DOHSE, M. et al. Comparison of ATP-Binding Cassette Transporter Interactions with the Tyrosine Kinase Inhibitors Imatinib , Nilotinib , and Dasatinib ABSTRACT : v. 38, n. 8, p. 1371–1380, 2010.
- DRUKER, B. J. et al. Effects of a selective inhibitor of the Ab1 tyrosine kinase on the growth of Bcr-Ab1 positive cells. **Nature Medicine**, v. 2, n. 5, p. 561–566, 1996.
- EIDE, C. A. et al. Combining the Allosteric Inhibitor Asciminib with Ponatinib Suppresses Emergence of and Restores Efficacy against Highly Resistant BCR-ABL1 Mutants. **Cancer Cell**, v. 36, n. 4, p. 431- 443.e5, 2019.

GALLUZZI, L. et al. Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. **Cell Death and Differentiation**, v. 25, n. 3, p. 486–541, 2018.

GFELLER, D. et al. SwissTargetPrediction: A web server for target prediction of bioactive small molecules. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. W1, p. 32–38, 2014.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57–70, 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HE, L. et al. Mebendazole exhibits potent anti-leukemia activity on acute myeloid leukemia. **Experimental Cell Research**, v. 369, n. 1, p. 61–68, 2018.

HODOS, R. A. et al. In silico methods for drug repurposing and pharmacology. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine**, v. 8, n. 3, p. 186–210, 2016.

INCA. **Estimativa 2020 – Incidência de Câncer no Brasil**. [s.l: s.n.]. v. 1

INCA, I. N. DE C. J. A. G. DA S. **Estimativa 2018: Incidência de câncer no Brasil**. [s.l: s.n.]. v. 293

JABBOUR, E.; KANTARJIAN, H. Chronic myeloid leukemia: 2018 update on diagnosis, therapy and monitoring. **American Journal of Hematology**, v. 93, n. 3, p. 442–459, 2018.

JABBOUR, E.; KANTARJIAN, H. Chronic myeloid leukemia: 2020 update on diagnosis, therapy and monitoring. **American Journal of Hematology**, v. 95, n. 6, p. 691–709, 2020.

JUBIE, S. et al. Early stage repurposing of benzimidazole scaffolds towards breast cancer through in-silico tools. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 10, n. 10, p. 2419–2423, 2018.

KALKAVAN, H.; GREEN, D. R. MOMP, cell suicide as a BCL-2 family business. **Cell Death and Differentiation**, v. 25, n. 1, p. 46–55, 2018.

KHATRI, A.; WANG, J.; PENDERGAST, A. M. Multifunctional Abl kinases in health and disease. **Journal of Cell Science**, v. 129, n. 1, p. 9–16, 2016.

KRÁLOVÁ, V. et al. Antiproliferative effect of benzimidazole anthelmintics albendazole, ricobendazole, and flubendazole in intestinal cancer cell lines. **Anti-Cancer Drugs**, v. 24, n. 9, p. 911–919, 2013.

KUBONISHI, I.; MIYOSHI, I. Establishment of a Ph1 chromosome-positive cell line from chronic myelogenous leukemia in blast crisis. **The International Journal of Cell Cloning**, v. 1, n. 2, p. 105–117, 1983.

LIPINSKI, C. A. Lead- and drug-like compounds: The rule-of-five revolution. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 1, n. 4, p. 337–341, 2004.

LOZZIO, C.; LOZZIO, B. Human With Chronic Positive. **Blood**, v. 45, n. 3, p. 321–334, 1975.

MANLEY, P. W.; BARYS, L.; COWAN-JACOB, S. W. The specificity of asciminib, a potential treatment for chronic myeloid leukemia, as a myristate-pocket binding ABL inhibitor and analysis of its interactions with mutant forms of BCR-ABL1 kinase. **Leukemia Research**, v. 98, p. 106458, 2020.

MARLEY, S. B.; GORDON, M. Y. Chronic myeloid leukaemia: Stem cell derived but progenitor cell driven. **Clinical Science**, v. 109, n. 1, p. 13–25, 2005.

MCILWAIN, D. R.; BERGER, T.; MAK, T. W. Caspase functions in cell death and disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 7, n. 4, 2015.

MELO, J. V.; CHUAH, C. Novel agents in CML therapy: tyrosine kinase inhibitors and beyond. **Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program**, p. 427–435, 2008.

MINOWADA, J. et al. A non T, non B human leukemia cell line (NALM 1): establishment of the cell line and presence of leukemia associated antigens. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 59, n. 1, p. 83–87, 1977.

MOOLGAVKAR, S. H.; LUEBECK, E. G. Multistage Carcinogenesis and the Incidence of Human Cancer. **Genes Chromosomes and Cancer**, v. 38, n. 4, p. 302–306, 2003.

MORRIS, G. M. et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. **Journal of Computational Chemistry**, v. 30, n. 16, p. 2785–2791, dez.

2009.

NYGREN, P. et al. Repositioning of the anthelmintic drug mebendazole for the treatment for colon cancer. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 139, n. 12, p. 2133–2140, 2013.

OKABE, S. et al. Efficacy of the dual PI3K and mTOR inhibitor NVP-BEZ235 in combination with nilotinib against BCR-ABL-positive leukemia cells involves the ABL kinase domain mutation. **Cancer Biology and Therapy**, v. 15, n. 2, p. 207–215, 2014.

OMS, O. M. DE S. World cancer report 2014. **World Health Organization**, v. 202, p. 1–2, 2014.

OTTO, T.; SICINSKI, P. **Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy** *Nature Reviews Cancer* Nature Publishing Group, , 2017.

PINTO, L. C. et al. The anthelmintic drug mebendazole inhibits growth, migration and invasion in gastric cancer cell model. **Toxicology in Vitro**, v. 29, n. 8, p. 2038–2044, 2015.

PRIETO-MARTÍNEZ, F. D. et al. Computational Drug Design Methods—Current and Future Perspectives. **In Silico Drug Design**, n. 3, p. 19–44, 2019.

RANG, H. P. et al. **Rang & Dale Pharmacology**. 8th. ed. [s.l.] Elsevier Health Sciences, 2014.

ROCCA, S. et al. Targeting few to help hundreds: JAK, MAPK and ROCK pathways as druggable targets in atypical chronic myeloid leukemia. **Molecular Cancer**, v. 17, n. 1, p. 1–12, 2018.

ROMAN, M. et al. Computational Assessment of Pharmacokinetics and Biological Effects of Some Anabolic and Androgen Steroids. **Pharmaceutical Research**, v. 35, n. 2, 2018.

RUMJANEK, V. M. et al. Multidrug resistance in tumour cells: Characterisation of the multidrug resistant cell line K562-Lucena 1. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 73, n. 1, p. 56–69, 2001.

RUMJANEK, V. M.; VIDAL, R. S.; MAIA, R. C. Multidrug resistance in chronic myeloid leukaemia: How much can we learn from MDR-CML cell lines? **Bioscience Reports**, v. 33,

n. 6, p. 875–888, 2013.

SASAKI, J. I. et al. The anthelmintic drug mebendazole induces mitotic arrest and apoptosis by depolymerizing tubulin in non-small cell lung cancer cells. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 1, n. 13, p. 1201–1209, 2002.

SCHOEPFER, J. et al. Discovery of Asciminib (ABL001), an Allosteric Inhibitor of the Tyrosine Kinase Activity of BCR-ABL1. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 61, n. 18, p. 8120–8135, 2018.

SHARMA, S. V.; HABER, D. A.; SETTLEMAN, J. Cell line-based platforms to evaluate the therapeutic efficacy of candidate anticancer agents. **Nature Reviews Cancer**, v. 10, n. 4, p. 241–253, 2010.

SRIDHAR GOUD, N. et al. Novel benzimidazole-triazole hybrids as apoptosis inducing agents in lung cancer: Design, synthesis, 18F-radiolabeling & galectin-1 inhibition studies. **Bioorganic Chemistry**, v. 102, n. June, p. 104125, 2020.

TSURUO, T. et al. Establishment and properties of vincristine-resistant human myelogenous leukemia K562. **Gan**, v. 74, n. 5, p. 751–8, out. 1983.

VEBER, D. F. et al. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 12, p. 2615–2623, 2002.

VERLI, H. **Bioinformática da Biologia à Flexibilidade Molecular**. [s.l: s.n.]. v. 53

WEI, L. et al. A Small Molecule Inhibitor, OGP46, Is Effective against Imatinib-Resistant BCR-ABL Mutations via the BCR-ABL/JAK-STAT Pathway. **Molecular Therapy - Oncolytics**, v. 18, n. September, p. 137–148, 2020.

WEINBERG, R. A. **The Biology of Cancer**. Second ed. [s.l: s.n.]. v. 53

WEISBERG, E. et al. Second generation inhibitors of BCR-ABL for the treatment of imatinib-resistant chronic myeloid leukaemia. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 5, p. 345–356, 2007.

WILLIAMS, G. H.; STOEBER, K. The cell cycle and cancer. **Journal of Pathology**, n. October 2011, p. 352–364, 2012.

WU, P.; NIELSEN, T. E.; CLAUSEN, M. H. FDA-approved small-molecule kinase inhibitors. **Trends in Pharmacological Sciences**, p. 1–18, 2015.

WYLIE, A. A. et al. The allosteric inhibitor ABL001 enables dual targeting of BCR-ABL1. **Nature**, v. 543, n. 7647, p. 733–737, 2017.

XU, H. L. et al. In silico identification of novel kinase inhibitors targeting wild-type and T315I mutant ABL1 from FDA-approved drugs. **Molecular BioSystems**, v. 10, n. 6, p. 1524–1537, 2014.

YOSHIDA, Y. A NOVEL PH⁺ CHROMOSOME POSITIVE ESTABLISHED FROM A PATIENT WITH CHRONIC LEUKEMIA IN BLASTIC CRISIS *. v. 9, n. 1, p. 921–926, 1985.

YOUSSEF, A. M. et al. Synthesis and anticancer activity of novel benzimidazole and benzothiazole derivatives against HepG2 liver cancer cells. **Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 2, p. 151–162, 2012.

ZANATTA, G. **Análise da ligação dos Antipsicóticos Eticloprida , Haloperidol e Risperidona no Receptor Dopaminérgico D3: Uma Abordagem por Ancoramento Molecular , Bioquímica Quântica e Dinâmica Molecular** . [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2014.

ZHOU, T. et al. Structural Mechanism of the Pan-BCR-ABL Inhibitor Ponatinib (AP24534): Lessons for Overcoming Kinase Inhibitor Resistance. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 77, n. 1, p. 1–11, 2011.

ANEXO I – SUMÁRIO DE INTERAÇÕES DO ASC E A PROTEÍNA ALB1

PDB	Interação Receptor-Ligante	Distância (Å)	Categoria	Tipo de Interação	De	Para		
2HYY	ASC:H18 - ALA433:O	2,14	Ligação de H	Convencional	ASC:H18	<i>H-Donor</i>	ALA433:O	H-Acceptor
	ARG332:HD1 - ASC:O23	2,66	Ligação de H	Carbônica	ARG332:HD1	<i>H-Donor</i>	ASC:O23	H-Acceptor
	LEU341:HA - ASC:F	2,52	Ligação de H; Halógeno	Carbônica; Halógeno (F)	LEU341:HA	<i>H-Donor;Halogen Acceptor</i>	ASC:F	H-Acceptor;Halogen
	CYS464:HA - ASC:O15	2,62	Ligação de H	Carbônica	CYS464:HA	<i>H-Donor</i>	ASC:O15	H-Acceptor
	ASC:H1 - TYR435:OH	3,07	Ligação de H	Carbônica	ASC:H1	<i>H-Donor</i>	TYR435:OH	H-Acceptor
	LEU340:O - ASC:F	3,46	Halógeno	Halógeno (F)	LEU340:O	<i>Halogen Acceptor</i>	ASC:F	Halogen
	LEU340:O - ASC:F	2,52	Halógeno	Halógeno (F)	LEU340:O	<i>Halogen Acceptor</i>	ASC:F	Halogen
	ARG332:NH1 - ASC	4,12	Eletrostática	Pi-Cation	ARG332:NH1	<i>Positive</i>	ASC	Pi-Orbitals
	TYR435 - ASC	4,83	Hidrofóbica	Pi-Pi T-shaped	TYR435	<i>Pi-Orbitals</i>	ASC	Pi-Orbitals
	ASC - LEU340	4,49	Hidrofóbica	Pi-Alkyl	ASC	<i>Pi-Orbitals</i>	LEU340	Alkyl
	ASC - ALA433	4,67	Hidrofóbica	Pi-Alkyl	ASC	<i>Pi-Orbitals</i>	ALA433	Alkyl
	ASC - CYS464	4,85	Hidrofóbica	Pi-Alkyl	ASC	<i>Pi-Orbitals</i>	CYS464	Alkyl
	ASC - PRO465	4,25	Hidrofóbica	Pi-Alkyl	ASC	<i>Pi-Orbitals</i>	PRO465	Alkyl
	ASC - VAL468	4,85	Hidrofóbica	Pi-Alkyl	ASC	<i>Pi-Orbitals</i>	VAL468	Alkyl
5M04	ASC:H16 - ALA452:O	2,12	Ligação de H	Convencional	ASC:H16	<i>H-Donor</i>	ALA452:O	H-Acceptor
	ASC:H18 - GLU481:O	1,80	Ligação de H	Convencional	ASC:H18	<i>H-Donor</i>	GLU481:O	H-Acceptor
	LEU360:HA - ASC:F29	2,51	Ligação de H; Halógeno	Carbônica; Halógeno (F)	LEU360:HA	<i>H-Donor;Halogen Acceptor</i>	ASC:F29	H-Acceptor;Halogen
	LEU360:HA - ASC:F30	2,33	Ligação de H; Halógeno	Carbônica; Halógeno (F)	LEU360:HA	<i>H-Donor;Halogen Acceptor</i>	ASC:F30	H-Acceptor;Halogen
	LEU359:C - ASC:F30	3,01	Halógeno	Halógeno (F)	LEU359:C	<i>Halogen Acceptor</i>	ASC:F30	Halogen
	MET456:SD - ASC	5,00	Outra	<i>Pi-Sulfur</i>	MET456:SD	<i>Sulfur</i>	ASC	Pi-Orbitals
	CYS483:SG - ASC	4,89	Outra	<i>Pi-Sulfur</i>	CYS483:SG	<i>Sulfur</i>	ASC	Pi-Orbitals
	TYR454 - ASC	4,86	Hidrofóbica	<i>Pi-Pi T-shaped</i>	TYR454	<i>Pi-Orbitals</i>	ASC	Pi-Orbitals
	ASC - LEU359	5,36	Hidrofóbica	<i>Pi-Alkyl</i>	ASC	<i>Pi-Orbitals</i>	LEU359	Alkyl

	ASC - ALA452	3,97	Hidrofóbica	<i>Pi-Alkyl</i>	ASC	<i>Pi-Orbitals</i>	ALA452	Alkyl
	ASC - PRO484	5,30	Hidrofóbica	<i>Pi-Alkyl</i>	ASC	<i>Pi-Orbitals</i>	PRO484	Alkyl
	ASC - VAL487	4,87	Hidrofóbica	<i>Pi-Alkyl</i>	ASC	<i>Pi-Orbitals</i>	VAL487	Alkyl
2GQG	ASC:H18 - GLU462:O	1,99	Ligação de H	Convencional	ASC:H	<i>H-Donor</i>	GLU462:O	H-Acceptor
	ALA337:HA - ASC:O15	2,48	Ligação de H	Carbônica	ALA337:HA	<i>H-Donor</i>	ASC:O	H-Acceptor
	LEU341:HA - ASC:F	2,09	Ligação de H; Halógeno	Carbônica; Halógeno (F)	LEU341:HA	<i>H-Donor;Halogen Acceptor</i>	ASC:F	H-Acceptor;Halogen
	ASC:H7 - GLU462:OE1	2,78	Ligação de H	Carbônica	ASC:H17	<i>H-Donor</i>	GLU462:OE1	H-Acceptor
	ASC:H8 - GLU462:OE1	2,60	Ligação de H	Carbônica	ASC:H18	<i>H-Donor</i>	GLU462:OE1	H-Acceptor
	LEU340:O - ASC:F	3,67	Halógeno	Halógeno (F)	LEU340:O	<i>Halogen Acceptor</i>	ASC:F	Halogen
	LEU340:O - ASC:F	2,72	Halógeno	Halógeno (F)	LEU340:O	<i>Halogen Acceptor</i>	ASC:F	Halogen
	GLU462:OE1 - ASC	4,94	Eletrostática	<i>Pi-Anion</i>	GLU462:OE1	<i>Negative</i>	ASC	Pi-Orbitals
	THR434:HA - ASC	2,52	Hidrofóbica	<i>Pi-Sigma</i>	THR434:HA	<i>C-H</i>	ASC	Pi-Orbitals
	MET437:SD - ASC	5,79	Outra	<i>Pi-Sulfur</i>	MET437:SD	<i>Sulfur</i>	ASC	Pi-Orbitals
	TYR435 - ASC	4,69	Hidrofóbica	<i>Pi-Pi T-shaped</i>	TYR435	<i>Pi-Orbitals</i>	ASC	Pi-Orbitals
	ASC - LEU340	4,87	Hidrofóbica	<i>Pi-Alkyl</i>	ASC	<i>Pi-Orbitals</i>	LEU340	Alkyl
	ASC - ALA433	4,42	Hidrofóbica	<i>Pi-Alkyl</i>	ASC	<i>Pi-Orbitals</i>	ALA433	Alkyl
	ASC - CYS464	4,53	Hidrofóbica	<i>Pi-Alkyl</i>	ASC	<i>Pi-Orbitals</i>	CYS464	Alkyl
	ASC - PRO465	4,41	Hidrofóbica	<i>Pi-Alkyl</i>	ASC	<i>Pi-Orbitals</i>	PRO465	Alkyl
	ASC - VAL468	4,78	Hidrofóbica	<i>Pi-Alkyl</i>	ASC	<i>Pi-Orbitals</i>	VAL468	Alkyl

ANEXO II – SUMÁRIO DE INTERAÇÕES DO BNZ E A PROTEÍNA ABL1

PDB	Interação Receptor-Ligante	Distância (Å)	Categoria	Tipo de Interação	De		Para	
2HYY	BNZ:H2N2 - ALA433:O	1,95	Ligação de H	Convencional	BNZ:H2N2	<i>H-Donor</i>	ALA433:O	<i>H-Acceptor</i>
	BNZ:H1C6 - GLU462:O	2,28	Ligação de H	Carbônica	BNZ:H1C6	<i>H-Donor</i>	GLU462:O	<i>H-Acceptor</i>
	BNZ - TYR435	5,75	Hidrofóbica	<i>Pi-Pi T-shaped</i>	BNZ	<i>Pi-Orbitals</i>	TYR435	<i>Pi-Orbitals</i>
	BNZ - LEU340	4,85	Hidrofóbica	<i>Pi-Alkyl</i>	BNZ	<i>Pi-Orbitals</i>	LEU340	<i>Alkyl</i>
	BNZ - ALA433	4,70	Hidrofóbica	<i>Pi-Alkyl</i>	BNZ	<i>Pi-Orbitals</i>	ALA433	<i>Alkyl</i>
	BNZ - ALA337	4,57	Hidrofóbica	<i>Pi-Alkyl</i>	BNZ	<i>Pi-Orbitals</i>	ALA337	<i>Alkyl</i>
	BNZ - LEU340	4,30	Hidrofóbica	<i>Pi-Alkyl</i>	BNZ	<i>Pi-Orbitals</i>	LEU340	<i>Alkyl</i>
	BNZ - ALA433	5,00	Hidrofóbica	<i>Pi-Alkyl</i>	BNZ	<i>Pi-Orbitals</i>	ALA433	<i>Alkyl</i>
	BNZ - CYS464	5,30	Hidrofóbica	<i>Pi-Alkyl</i>	BNZ	<i>Pi-Orbitals</i>	CYS464	<i>Alkyl</i>
	BNZ - PRO465	4,84	Hidrofóbica	<i>Pi-Alkyl</i>	BNZ	<i>Pi-Orbitals</i>	PRO465	<i>Alkyl</i>
	BNZ - LEU340	5,31	Hidrofóbica	<i>Pi-Alkyl</i>	BNZ	<i>Pi-Orbitals</i>	LEU340	<i>Alkyl</i>
	BNZ - ALA344	4,56	Hidrofóbica	<i>Pi-Alkyl</i>	BNZ	<i>Pi-Orbitals</i>	ALA344	<i>Alkyl</i>
	BNZ - LEU429	5,20	Hidrofóbica	<i>Pi-Alkyl</i>	BNZ	<i>Pi-Orbitals</i>	LEU429	<i>Alkyl</i>
	BNZ - ILE432	4,72	Hidrofóbica	<i>Pi-Alkyl</i>	BNZ	<i>Pi-Orbitals</i>	ILE432	<i>Alkyl</i>
	BNZ - ALA433	4,59	Hidrofóbica	<i>Pi-Alkyl</i>	BNZ	<i>Pi-Orbitals</i>	ALA433	<i>Alkyl</i>
BNZ - VAL468	4,12	Hidrofóbica	<i>Pi-Alkyl</i>	BNZ	<i>Pi-Orbitals</i>	VAL468	<i>Alkyl</i>	
5MO4	BNZ:H - ALA452:O	2,99	Ligação de H	Convencional	BNZ:H	<i>H-Donor</i>	ALA452:O	<i>H-Acceptor</i>
	BNZ:H - GLU481:O	2,07	Ligação de H	Convencional	BNZ:H	<i>H-Donor</i>	GLU481:O	<i>H-Acceptor</i>
	ALA356:HA - :BNZ:O	2,82	Ligação de H	Carbônica	ALA356:HA	<i>H-Donor</i>	BNZ:O	<i>H-Acceptor</i>
	BNZ:H12 - GLU481:O	2,50	Ligação de H	Carbônica	BNZ:H12	<i>H-Donor</i>	GLU481:O	<i>H-Acceptor</i>
	VAL487:CG1 - BNZ	4,00	Hidrofóbica	<i>Pi-Sigma</i>	VAL487:CG1	C-H	BNZ	<i>Pi-Orbitals</i>
	CYS483:SG - BNZ	5,43	Outra	<i>Pi-Sulfur</i>	CYS483:SG	<i>Sulfur</i>	BNZ	<i>Pi-Orbitals</i>
	LEU359:C,O;LEU360:N - BNZ	4,63	Hidrofóbica	<i>Amide-Pi Stacked</i>	LEU359:C,O;LEU360:N	<i>Amide</i>	BNZ	<i>Pi-Orbitals</i>
	BNZ - ALA452	5,47	Hidrofóbica	<i>Pi-Alkyl</i>	BNZ	<i>Pi-Orbitals</i>	ALA452	<i>Alkyl</i>
	BNZ - VAL525	4,70	Hidrofóbica	<i>Pi-Alkyl</i>	BNZ	<i>Pi-Orbitals</i>	VAL525	<i>Alkyl</i>

	BNZ - ALA356	5,46	Hidrofóbica	Pi-Alkyl	BNZ	<i>Pi-Orbitals</i>	ALA356	<i>Alkyl</i>
	BNZ - LEU359	5,38	Hidrofóbica	Pi-Alkyl	BNZ	<i>Pi-Orbitals</i>	LEU359	<i>Alkyl</i>
	BNZ - ALA452	4,32	Hidrofóbica	Pi-Alkyl	BNZ	<i>Pi-Orbitals</i>	ALA452	<i>Alkyl</i>
	BNZ - VAL525	4,80	Hidrofóbica	Pi-Alkyl	BNZ	<i>Pi-Orbitals</i>	VAL525	<i>Alkyl</i>
	BNZ - ALA363	4,59	Hidrofóbica	Pi-Alkyl	BNZ	<i>Pi-Orbitals</i>	ALA363	<i>Alkyl</i>
	BNZ - ILE451	5,26	Hidrofóbica	Pi-Alkyl	BNZ	<i>Pi-Orbitals</i>	ILE451	<i>Alkyl</i>
	BNZ - ALA452	4,92	Hidrofóbica	Pi-Alkyl	BNZ	<i>Pi-Orbitals</i>	ALA452	<i>Alkyl</i>
	BNZ:H - ALA433:O	1,85	Ligação de H	Conventional Ligação de H	BNZ:H	<i>H-Donor</i>	ALA433:O	<i>H-Acceptor</i>
	GLY463:HA2 - BNZ:O	2,28	Ligação de H	Carbon Ligação de H	GLY463:HA2	<i>H-Donor</i>	BNZ:O	<i>H-Acceptor</i>
	BNZ:H13 - GLU462:O	2,66	Ligação de H	Carbon Ligação de H	BNZ:H13	<i>H-Donor</i>	GLU462:O	<i>H-Acceptor</i>
	BNZ:H13 - GLU462:OE1	3,01	Ligação de H	Carbon Ligação de H	BNZ:H13	<i>H-Donor</i>	GLU462:OE1	<i>H-Acceptor</i>
	CYS464:SG - BNZ	5,36	Outra	<i>Pi-Sulfur</i>	CYS464:SG	<i>Sulfur</i>	BNZ	<i>Pi-Orbitals</i>
2GQG	BNZ - ALA337	5,41	Hidrofóbica	<i>Pi-Alkyl</i>	BNZ	<i>Pi-Orbitals</i>	ALA337	<i>Alkyl</i>
	BNZ - LEU340	4,88	Hidrofóbica	<i>Pi-Alkyl</i>	BNZ	<i>Pi-Orbitals</i>	LEU340	<i>Alkyl</i>
	BNZ - ALA433	4,89	Hidrofóbica	<i>Pi-Alkyl</i>	BNZ	<i>Pi-Orbitals</i>	ALA433	<i>Alkyl</i>
	BNZ - ALA337	4,42	Hidrofóbica	<i>Pi-Alkyl</i>	BNZ	<i>Pi-Orbitals</i>	ALA337	<i>Alkyl</i>
	BNZ - LEU340	4,57	Hidrofóbica	<i>Pi-Alkyl</i>	BNZ	<i>Pi-Orbitals</i>	LEU340	<i>Alkyl</i>
	BNZ - ALA433	5,13	Hidrofóbica	<i>Pi-Alkyl</i>	BNZ	<i>Pi-Orbitals</i>	ALA433	<i>Alkyl</i>
	BNZ - CYS464	5,14	Hidrofóbica	<i>Pi-Alkyl</i>	BNZ	<i>Pi-Orbitals</i>	CYS464	<i>Alkyl</i>
	BNZ - PRO465	4,69	Hidrofóbica	<i>Pi-Alkyl</i>	BNZ	<i>Pi-Orbitals</i>	PRO465	<i>Alkyl</i>
	BNZ - ALA344	4,66	Hidrofóbica	<i>Pi-Alkyl</i>	BNZ	<i>Pi-Orbitals</i>	ALA344	<i>Alkyl</i>
	BNZ - LEU429	4,84	Hidrofóbica	<i>Pi-Alkyl</i>	BNZ	<i>Pi-Orbitals</i>	LEU429	<i>Alkyl</i>
	BNZ - ILE432	5,06	Hidrofóbica	<i>Pi-Alkyl</i>	BNZ	<i>Pi-Orbitals</i>	ILE432	<i>Alkyl</i>
	BNZ - ALA433	4,36	Hidrofóbica	<i>Pi-Alkyl</i>	BNZ	<i>Pi-Orbitals</i>	ALA433	<i>Alkyl</i>
	BNZ - VAL468	4,28	Hidrofóbica	<i>Pi-Alkyl</i>	BNZ	<i>Pi-Orbitals</i>	VAL468	<i>Alkyl</i>