

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA

“IDENTIFICACIÓN *in silico* DE POTENCIALES
INHIBIDORES DE MRP4/ABCC4 PARA EL TRATAMIENTO
DE LA LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA”

TESIS COLECTIVA

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTAN

BEATRIZ FRANCO CHÁVEZ Y LUIS ANGEL URDEZ ROJAS

CODIRIGIDA POR

Dr. RUBÉN ANTONIO ROMO MANCILLAS

Dr. GIOVANNY AGUILERA DURÁN

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2026

La presente obra está bajo la licencia:
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:



Atribución — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).



SinDerivadas — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“IDENTIFICACIÓN *in silico* DE POTENCIALES
INHIBIDORES DE MRP4/ABCC4 PARA EL TRATAMIENTO
DE LA LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA”**

TESIS COLECTIVA

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
PRESENTAN**

BEATRIZ FRANCO CHÁVEZ Y LUIS ANGEL URDEZ ROJAS

CODIRIGIDA POR:

Dr. RUBÉN ANTONIO ROMO MANCILLAS

Dr. GIOVANNY AGUILERA DURÁN

SINODALES

Dr. RUBÉN ANTONIO ROMO MANCILLAS
Director

Dr. GIOVANNY AGUILERA DURÁN
Secretario

M. en C. ALMA DELIA BERTADILLO JILOTE
Sinodal

Dra. JESICA ESTHER ESCOBAR CABRERA
Sinodal

M. en C. JOSE MANUEL ÁLVAREZ BALTAZAR
Sinodal

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE TABLAS	xi
ACRÓNIMOS	xii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
II.1 Cáncer.....	3
II.1.1 Fisiopatología.....	4
II.2.1 Etiología.....	4
II.3.1 Epidemiología	6
II.4.1 Tratamiento y supervivencia	8
II.2 Quimiorresistencia.....	9
II.3 Papel de la superfamilia de transportadores dependientes de ATP	10
II.1.1 Papel central de MRP4 como modulador farmacocinético	12
II.2.1 Ciclo biológico de MRP4.....	13
II.3.1 Efectos de la modulación de MRP4.....	14
II.4.1 Inhibidores de MRP4	16
II.4 Diseño de fármacos asistido por computadora (DIFAC)	18
II.1.1 Modelado de proteínas	19
II.2.1 Acoplamiento molecular (<i>Docking</i>)	22
II.3.1 Métodos quimioinformáticos en el descubrimiento de fármacos	24
II.3.1.1 Validación del <i>Docking</i>	27

II.3.2.1	Ensemble Docking.....	30
II.4.1	Simulaciones de dinámica molecular.....	31
II.5.1	Metadinámica.....	33
II.5	Reposicionamiento de fármacos	34
III.	JUSTIFICACIÓN	36
IV.	OBJETIVOS	37
IV.1	Objetivo general	37
IV.2	Objetivos específicos.....	37
V.	METODOLOGÍA	38
V.1	Modelado por homología de MRP4.....	38
V.2	Enfoque clásico	38
V.1.1	Filtrado de la biblioteca <i>Natural Product Atlas</i>	38
V.2.1	Filtrado de la biblioteca de <i>DrugBank</i>	39
V.3.1	Construcción de los complejos proteína-ligando.....	39
V.4.1	Dinámica molecular de los complejos MRP4-Ligandos	40
V.5.1	Cálculo de la energía teórica de unión.....	41
V.3	Enfoque optimizado.....	41
V.1.1	Depuración Quimioinformática y Optimización Multiparamétrica	41
V.2.1	Validación del método de acoplamiento	42
V.3.1	Ensemble <i>Docking</i>	43
V.4.1	Filtrado post-acoplamiento y análisis de interacciones	44
V.5.1	Simulación de Dinámica molecular.....	46
V.4	Simulaciones de metadinámica.....	46
V.5	Perfil toxicológico y propiedades farmacocinéticas	46

VI.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
VI.1	Modelado por homología de MRP4	47
VI.2	Enfoque clásico	51
VI.1.1	Acoplamiento molecular a gran escala	51
VI.2.1	Simulaciones de Dinámica molecular	53
VI.2.1.1	Complejo MRP4-Ceefourin-1	53
VI.3.1	Simulaciones de los ligandos de <i>NPA</i>	56
VI.3.1.1	Sterhirsutina H	56
VI.3.2.1	Sterhirsutina I	59
VI.3.3.1	MC-031	61
VI.4.1	Simulaciones de los ligandos de <i>DB</i>	63
VI.4.1.1	Albendazol	63
VI.4.2.1	Lifitegrast	65
VI.4.3.1	Avatrombopag	67
VI.5.1	Afinidad teórica de los ligandos con MRP4	69
VI.5.1.1	Ceefourin-1	71
VI.6.1	Afinidad teórica de ligandos de <i>NPA</i>	72
VI.6.1.1	Sterhirsutina H	72
VI.6.2.1	Sterhirsutina I	73
VI.6.3.1	MC-031	74
VI.7.1	Afinidad teórica de los ligandos de <i>DB</i>	75
VI.7.1.1	Albendazol	75
VI.7.2.1	Lifitegrast	76
VI.7.3.1	Avatrombopag	77

VI.3	Enfoque alternativo mediante quimioinformática.....	78
VI.1.1	Exploración del espacio químico.....	78
VI.2.1	Depuración empleando quimioinformática.....	81
VI.3.1	Validación del <i>Ensemble Docking</i>	82
VI.4.1	<i>Ensemble Docking</i> y análisis de las interacciones.....	86
VI.5.1	Simulación de los ligandos de NPA.....	91
VI.5.1.1	Aspergilazina A.....	91
VI.5.2.1	<i>Aspergicandidusina A</i>	93
VI.5.3.1	Enhypirazinona A.....	95
VI.6.1	Simulación de los ligandos de DB.....	97
VI.6.1.1	Vemurafenib.....	97
VI.6.2.1	Montelukast.....	99
VI.6.3.1	Imatinib.....	100
VI.7.1	Afinidad teórica de los ligandos de NPA.....	102
VI.7.1.1	Aspergilazina A.....	102
VI.7.2.1	<i>Aspergicandidusina A</i>	103
VI.7.3.1	Enhypirazinona A.....	105
VI.8.1	Afinidad teórica de los ligandos de DB.....	106
VI.8.1.1	Vemurafenib.....	106
VI.8.2.1	Montelukast.....	107
VI.8.3.1	Imatinib.....	108
VI.4	Comparación global de los cálculos de energía libre.....	109
VI.5	Propiedades ADME-Tox.....	111
VI.1.1	Propiedades fisicoquímicas.....	111

VI.2.1	Propiedades <i>DrugLikeness</i>	114
VI.3.1	Propiedades de toxicidad	116
VI.6	Antecedentes y potencial de los candidatos seleccionados	118
VII.	CONCLUSIONES	120
VIII.	PERSPECTIVAS	122
IX.	BIBLIOGRAFÍA	123
X.	ANEXOS	142
X.1	Diagramas de Ramachandran de los modelos obtenidos.	142
X.1.1	AlphaFold 3.....	142
X.2.1	I-Tasser.....	144
X.3.1	Robetta	147
X.2	Nombres de las moléculas e identificadores:	150
X.3	<i>Ensemble docking</i> :	152
X.1.1.1	Resultados del top 15% de la biblioteca NPA:.....	152
X.2.1	Resultados del top 15% finalistas de la biblioteca DB:.....	158
X.3.1	Tablas de interacción de los compuestos de NPA.....	164
X.3.1.1	Compuesto NPA029076 (aspergicandidusina A).....	164
X.3.2.1	Compuesto NPA026693 (enhypirazinona A)	165
X.3.3.1	Compuesto NPA013206 (aspergilazina A)	166
X.4.1	Tablas de interacción de los compuestos de DB	167
X.4.1.1	Compuesto 42611257 (vemurafenib).....	167
X.4.2.1	Compuesto 5291 (imatinib).....	168
X.4.3.1	Compuesto 5281040 (montelukast).....	169
X.4	Propiedades fisicoquímicas.....	170

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Mortalidad de LLA en México (2000 a 2020). Tomado de INSP (2021).	6
Figura 2. Datos estadísticos de LLA en Estados Unidos. Tomado de NIH (2026).	7
Figura 3. Ciclo de MRP4. Adaptado de Bloch y col. (2023) y Pourmal y col. (2024).	14
Figura 4. Modulación bioquímica de MRP4. Adaptado de Wen y col. (2015).	15
Figura 5. Estructura molecular de MK-571 y ceefourin-1	17
Figura 6. Proceso de modelado de proteínas por homología.	22
Figura 7. Proceso de acoplamiento molecular.	23
Figura 8. <i>Ensemble docking</i> en MRP4	31
Figura 9. Diagrama de Ramachandran del modelo seleccionado.	50
Figura 10. Estructuras químicas 2D de los ligandos seleccionados de <i>Natural Product Atlas</i> .	52
Figura 11. Estructuras químicas 2D de los ligandos seleccionados de <i>DrugBank</i> .	52
Figura 12. Gráfica RMSD del complejo MRP4-ceefourin-1.	53
Figura 13. Análisis del complejo MRP4-Ceefourin-1: (A) Fracción de interacciones, (B) Representación 3D y (C) Interacciones en 2D.	56
Figura 14. Gráfica RMSD del complejo MRP4-sterhirsutina H.	57
Figura 15. Análisis del complejo MRP4-sterhirsutina H: (A) Interacciones, (B) Representación 3D, (C) Interacciones en 2D.	58
Figura 16. Gráfica RMSD del complejo MRP4-sterhirsutina I.	59

Figura 17. Análisis del complejo MRP4-sterhirsutina I: (A) Interacciones, (B) Representación 3D, (C) Interacciones en 2D.	60
Figura 18. Gráfica RMSD del complejo MRP4-MC-031.	61
Figura 19. Análisis del complejo MRP4- MC-031: (A) Interacciones, (B) Representación 3D, (C) Interacciones en 2D.	62
Figura 20. Gráfica RMSD del complejo MRP4 – albendazol.	63
Figura 21. Análisis del complejo MRP4-albendazol: (A) Interacciones, (B) Representación 3D, (C) Interacciones en 2D.	64
Figura 22. Gráfica RMSD del complejo MRP4 –lifitegrast.	65
Figura 23. Análisis del complejo MRP4-lifitegrast: (A) Interacciones, (B) Representación 3D, (C) Interacciones en 2D.	66
Figura 24. Gráfica RMSD del complejo MRP4-avatrombopag.	67
Figura 25. Análisis del complejo MRP4-avatrombopag: (A) Interacciones, (B) Representación 3D, (C) Interacciones en 2D.	68
Figura 26. Relación entre afinidad relativa y el cambio de energía libre.	71
Figura 27. Perfil termodinámico de MRP4WT-ceefourin-1: (A) Ubicación general del complejo proteína-ligando. (B) Acercamiento a los residuos del estado de mínima energía. (C) Perfil FES de la simulación.	72
Figura 28. Perfil termodinámico de MRP4WT-sterhirsutina H: (A) Ubicación general del complejo proteína-ligando. (B) Acercamiento a los residuos del estado de mínima energía. (C) Perfil FES de la simulación.	73
Figura 29. Perfil termodinámico de MRP4WT-sterhirsutina I: (A) Ubicación general del complejo proteína-ligando. (B) Acercamiento a los residuos del estado de mínima energía. (C) Perfil FES de la simulación.	74
Figura 30. Perfil termodinámico de MRP4WT-MC-031: (A) Ubicación general del complejo proteína-ligando. (B) Acercamiento a los residuos del estado de mínima energía. (C) Perfil FES de la simulación.	75

Figura 31. Perfil termodinámico de MRP4WT-albendazol: (A) Ubicación general del complejo proteína-ligando. (B) Acercamiento a los residuos del estado de mínima energía. (C) Perfil FES de la simulación.	76
Figura 32. Perfil termodinámico de MRP4WT-lifitegrast: (A) Ubicación general del complejo proteína-ligando. (B) Acercamiento a los residuos del estado de mínima energía. (C) Perfil FES de la simulación.	77
Figura 33. Perfil termodinámico de MRP4WT-avatrombopag: (A) Ubicación general del complejo proteína-ligando. (B) Acercamiento a los residuos del estado de mínima energía. (C) Perfil FES de la simulación.	78
Figura 34. Análisis PCA del espacio químico de <i>Natural Product Atlas</i> . Proyección basada en descriptores ECFP4 agrupado por origen biológico.	79
Figura 35. Análisis PCA del espacio químico de <i>DrugBank</i> . Proyección basada en descriptores ECFP4 agrupado por clasificación clínica.	80
Figura 36. Proceso de selección jerárquica y depuración estructural de ligandos prospectivos dirigidos a MRP4.	81
Figura 37. Curvas ROC semilogarítmicas para la evaluación del rendimiento de clasificación de los modelos 9KRM, 8IZ7 y 8ZBU.	83
Figura 38. Curvas ROC semilogarítmicas para la evaluación del enriquecimiento temprano en los modelos de MRP4	85
Figura 39. Gráfico de violín para la evaluación de la capacidad discriminativa del modelo 8IZ9	86
Figura 40. Estructuras químicas 2D de los ligandos seleccionados de <i>Natural Product Atlas</i> .	88
Figura 41. Estructuras químicas 2D de los ligandos seleccionados de <i>DrugBank</i> .	89
Figura 42. Perfil de interacciones de sustratos e inhibidores de referencia en estructuras de MRP4 resueltas por Cryo-EM. La red de anclaje basal se	

resalta en negritas, mientras que los residuos críticos para la inhibición se resaltan en rojo.	90
Figura 43. Gráfica RMSD del complejo MRP4WT-aspergilazina A.	91
Figura 44. Análisis del complejo MRP4WT-aspergilazina A: (A) Interacciones, (B) Representación 3D, (C) Interacciones en 2D.	92
Figura 45. Gráfica RMSD del complejo MRP4WT-aspergicandidusina A.	93
Figura 46. Análisis del complejo MRP4WT-aspergicandidusina A: (A) Interacciones, (B) Representación 3D, (C) Interacciones en 2D.	94
Figura 47. Gráfica RMSD del complejo MRP4WT-enhyprazinona A.	95
Figura 48. Análisis del complejo MRP4-enhyprazinona A: (A) Interacciones, (B) Representación 3D, (C) Interacciones en 2D.	96
Figura 49. Gráfica RMSD del complejo MRP4WT-vemurafenib.	97
Figura 50. Análisis del complejo MRP4WT-vemurafenib: (A) Interacciones, (B) Representación 3D, (C) Interacciones en 2D.	98
Figura 51. Gráfica RMSD del complejo MRP4WT-montelukast.	99
Figura 52. Análisis del complejo MRP4WT-montelukast: (A) Interacciones, (B) Representación 3D, (C) Interacciones en 2D.	100
Figura 53. Gráfica RMSD del complejo MRP4WT-imatinib.	101
Figura 54. Análisis del complejo MRP4WT-imatinib: (A) Interacciones, (B) Representación 3D, (C) Interacciones en 2D.	102
Figura 55. Perfil termodinámico de MRP4WT-aspergilazina A: (A) Ubicación general del complejo proteína-ligando. (B) Acercamiento a los residuos del estado de mínima energía. (C) Perfil FES de la simulación	103
Figura 56. Perfil termodinámico de MRP4WT-aspergicandidusina A: (A) Ubicación general del complejo proteína-ligando. (B) Acercamiento a los residuos del estado de mínima energía. (C) Perfil FES de la simulación	104

Figura 57. Perfil termodinámico de MRP4WT-enhypirazinona A: (A) Ubicación general del complejo proteína-ligando. (B) Acercamiento a los residuos del estado de mínima energía. (C) Perfil FES de la simulación	105
Figura 58. Perfil termodinámico de MRP4WT-vemurafenib: (A) Ubicación general del complejo proteína-ligando. (B) Acercamiento a los residuos del estado de mínima energía. (C) Perfil FES de la simulación	106
Figura 59. Perfil termodinámico de MRP4WT-montelukast: (A) Ubicación general del complejo proteína-ligando. (B) Acercamiento a los residuos del estado de mínima energía. (C) Perfil FES de la simulación.	107
Figura 60. Perfil termodinámico de MRP4WT-imatinib: (A) Ubicación general del complejo proteína-ligando. (B) Acercamiento a los residuos del estado de mínima energía. (C) Perfil FES de la simulación.	108
Figura 61. Estructura química de las moléculas diseñadas por el grupo DACSIF.	110
Figura 62. Perfil fisicoquímico comparativo para la evaluación estructural de los ligandos candidatos: (A) Peso molecular, (B) LogP, (C) TPSA, (D) Donadores Hidrógeno, (E) Aceptores de Hidrógeno, (F) Enlaces rotables.	111
Figura 63. Diagrama <i>BOILED-Egg</i> (<i>SwissADME</i>). La región amarilla indica permeación de la BHE y la blanca, absorción intestinal.	113
Figura 64. Gráfico de barras acumulado que muestra el número de violaciones a las propiedades DrugLikeness y el número de alertas de toxicidad para los compuestos analizados en SwissADME (Daina y col., 2017).	114
Figura 65. Análisis de subestructuras indeseables y de inviabilidad metabólica.	116
Figura 66. Mapa de calor de la inhibición de citocromos P450 predicha con ProTox 3.0. Las celdas indican activo (rojo) o inactivo (verde) frente a cada isoforma.	118

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
Tabla 1. Calidad de una proteína según su resolución (Blow, 2002).	20
Tabla 2. Calidad de los modelos de MRP4 generados por diferentes servidores.	47
Tabla 3. Resultados del acoplamiento molecular.	51
Tabla 4. Interpretación de los valores del Área Bajo la Curva (Trifonova y col., 2014).	83
Tabla 5. Resultados de ensemble docking para los ligandos seleccionados de <i>Natural Product Atlas</i> y <i>DrugBank</i> frente a MRP4. Los valores de <i>Docking score</i> se presentan en kcal/mol.	87
Tabla 6. Resultados de la simulación de metadinámica, agrupados por enfoque de selección y origen.	109
Tabla 7. Propiedades de toxicidad oral obtenidas del servidor ProTox 3.	117

ACRÓNIMOS

6-MP	6-Mercaptopurina
AAMD	<i>All-Atom Molecular Dynamics</i> (Dinámica Molecular de Todos los Átomos)
ABC	<i>ATP-binding cassette</i> (casete de unión a ATP)
ADME-Tox	Absorción, Distribución, Metabolismo, Excreción y Toxicidad
AINEs	Antiinflamatorios No Esteroideos
AKT	Serina-treonina cinasa Akt
AMPC	Adenosín Monofosfato cíclico
AUC	<i>Area Under the Curve</i> (Área Bajo la Curva ROC)
Bcl-2	Proteína del linfoma de células B2
CDK2	Cinasa 2 dependiente de ciclina
CDK4	Cinasa 4 dependiente de ciclina
CNN	<i>Convolutional Neural Network</i> (Red Neuronal Convolutacional)
COX-2	Ciclooxigenasa 2
Cryo-EM	Criomicroscopía Electrónica
CV	<i>Collective Variable</i> (Variable Colectiva)
DB	<i>DrugBank</i>
DIFAC	Diseño de Fármacos Asistido por Computadora
DMF	<i>Dose Modification Factor</i> (Factor Modificador de Dosis)
DTP	<i>Drug-Tolerant Cells</i> (Células Tolerantes a Fármacos)
ECFP4	<i>Extended Connectivity Fingerprints</i> diámetro 4
EF	<i>Enrichment Factor</i> (Factor de Enriquecimiento)
ERK	Cinasa regulada por señales extracelulares
FASTA	Formato de secuencias biológicas
FES	<i>Free Energy Surface</i> (Superficie de Energía Libre)
FQ	<i>Fit Quality</i> (Calidad de Ajuste)
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
GPU	Graphics Processing Unit

GSK3 β	Glucógeno sintasa cinasa 3 β
HTS	<i>High-Throughput Screening</i> (Cribado de Alto Rendimiento)
IC50	Concentración Inhibitoria Media
KD	Constante de disociación
LE	<i>Ligand Efficiency</i> (Eficiencia del Ligando)
LLA	Leucemia Linfoblástica Aguda
LLA-B	Leucemia Linfoblástica Aguda de células B
LLA-T	Leucemia Linfoblástica Aguda de células T
LLM	Gen de Linaje Leucémico Mixto
LMA	Leucemia Mieloide Aguda
LogP	Coeficiente de partición octanol-agua (logarítmico)
LTA4	Leucotrieno A4
LTB4	Leucotrieno B4
MD	Dinámica molecular
MEK	Proteína cinasa activada por mitógenos (MAP2K)
MMFF94	<i>Merck Molecular Force Field 94</i>
MPO	<i>Multi-Parameter Optimization</i> (Optimización Multiparamétrica)
MRP4	<i>Multidrug Resistance Protein 4</i> (Proteína 4 de resistencia a múltiples fármacos) (ABCC4)
MTX	Metotrexato
NBD	<i>Nucleotide-Binding Domain</i> (dominio de unión a nucleótidos)
NPA	<i>Natural Products Atlas</i>
NPT	Ensamble isotérmico-isobárico
OPLS-2005	<i>Optimized Potentials for Liquid Simulations 2005</i>
p21	Inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina 1A (CDKN1A)
p27kip1	Inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina 1B (CDKN1B)
PAINS	<i>Pan-Assay Interference Compounds</i>
PCA	<i>Principal Component Analysis</i> (Análisis de Componentes Principales)
PDB	<i>Protein Data Bank</i>

PGE1	Prostaglandina E1
PGE2	Prostaglandina E2
PGH2	Prostaglandina H2
Pi	Fosfato inorgánico
PI3K	Fosfatidilinositol-3-cinasa
PKA	<i>cAMP-dependent protein kinase</i> (Proteína cinasa A)
PLIP	<i>Protein-Ligand Interaction Profiler</i>
POPC	1-palmitoil-2-oleoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfolina
PPAR δ	Receptor delta activado por proliferador de peroxisomas
ProLIF	<i>Protein-Ligand Interaction Fingerprints</i>
QED	<i>Quantitative Estimate of Drug-likeness</i>
QSAR	<i>Quantitative Structure-Activity Relationship</i>
Raf	Serina-treonina cinasa de fibrosarcoma rápidamente acelerado
RMSD	<i>Root Mean Square Deviation</i> (Desviación cuadrática media)
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
SAScore	<i>Synthetic Accessibility Score</i> (Índice de Accesibilidad Sintética)
SILE	<i>Size-Independent Ligand Efficiency Index</i>
SMI	<i>Small Molecule Inhibitor</i> (Inhibidor de Molécula Pequeña)
SMILES	<i>Simplified Molecular Input Line Entry System</i>
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> (variante de nucleótido simple)
TM	Hélice transmembrana
TMD	<i>Transmembrane Domain</i> (dominio transmembranal)
TPSA	<i>Topological Polar Surface Area</i> (Área Superficial Polar Topológica)
β -cat	β -Catenina

“A mis seres queridos.

Si la ciencia me enseñó a cuestionar el mundo, ustedes me dieron la resiliencia para no rendirme ante él. Las respuestas las encontré tras horas interminables de estudio, pero la fuerza para levantarme en los momentos más difíciles me la dio su amor incondicional. Este triunfo también es de ustedes.”

— Luis Ángel Urdez Rojas

“A todas las personas que amo.

En la ciencia encontré la pasión de comprender y admirar el mundo con nuevos ojos, pero en los días de mayor incertidumbre, la verdadera fuerza para seguir nunca estuvo en el laboratorio, sino en su compañía. Ustedes han sido el impulso para no detenerme. Mi mente le pertenece a la investigación, pero el coraje para llegar a esta meta les pertenece.”

— Beatriz Franco Chávez

"Química. compuestos, átomos, moléculas, enlaces, estructuras, modelos, reacciones. Estos son los conceptos básicos de la disciplina, al igual que los pinceles, los pigmentos y el lienzo del artista."

— Roald Hoffmann

AGRADECIMIENTOS

Primero, y por encima de todo, quiero agradecer a Dios por guiar siempre mi camino.

A mis padres, José Luis Urdez Briseño y María Guadalupe Rojas Jiménez. Gracias por su amor, su cariño y su infinita paciencia. Ustedes han sido el cimiento sobre el cual construí este sueño, sosteniéndome de manera incondicional, tanto en lo económico como en lo emocional a lo largo de todo este proceso. Y a mis mascotas Terry y Luna por siempre brindarme su cariño y acompañarme.

A toda mi familia. Gracias por abrirme siempre las puertas de su corazón. A pesar de mis constantes ausencias por las limitaciones de tiempo y distancia, siempre me recibieron con los brazos abiertos, regalándome la calidez de hacerme sentir que el tiempo entre nosotros no pasaba.

Al Dr. Antonio Romo-Mancillas, mi director de tesis, por su invaluable tiempo, apoyo incondicional y por abrirme las puertas del grupo DACSIF, usted le dio un verdadero sentido a mi pasión por la química y la ciencia. Al Dr. Giovanni Aguilera Durán, por su tiempo y por introducirme al fascinante mundo de la química computacional.

A Alex, Manu y Farid, por la convivencia diaria y ser mi apoyo dentro del grupo. A Diego, Cristian y Jared, por su lealtad y por nunca dejarme solo. Y a todos los amigos que comprendieron mis ausencias y decidieron quedarse a mi lado.

A mi novia, compañera y amiga, Beatriz Franco Chávez. Gracias por vivir este proceso en carne propia junto a mí y por hacer tuyas las horas eternas de escritura e investigación. Más allá del cansancio, gracias por iluminar el camino con tus sonrisas, por tu apoyo incondicional y por ser siempre mi refugio. Este trayecto no fue fácil, pero transitarlo a tu lado le dio sentido a todo. Te lo agradezco infinitamente.

Finalmente, gracias a mi alma máter, la Universidad Autónoma de Querétaro, y a la Facultad de Química por darle forma, razón y propósito a mi vida. Y a todos los maestros que me apoyaron y formaron a lo largo de este camino. Ustedes saben quiénes son, son excepcionales y un ejemplo de vida. Gracias totales.

— Luis Ángel Urdez Rojas

A Dios, por permitirme estar aquí, guiar mis pasos, darme la fortaleza para avanzar y poner en mi camino a personas invaluable.

A mis padres, Beatriz Chávez Rodríguez y Fernando Franco Ledezma, mi pilar fundamental. Gracias por su amor, comprensión, paciencia y por impulsarme a perseguir mis sueños. Este logro es también suyo, pues sin su apoyo y sacrificio nada de esto sería posible.

A mi familia, por su cariño y apoyo y a lo largo de cada etapa de mi vida y también a aquellos que hoy me acompañan desde el cielo; su amor, sus enseñanzas, cada paso que doy lleva su huella.

A mi director, el Dr. Ruben Antonio Romo-Mancillas, por ser un ejemplo de excelencia académica y calidad humana. Gracias por su guía, apoyo y dedicación durante el desarrollo de este proyecto. Gracias por enseñarnos que los desafíos son oportunidades para aprender y por alentarnos a seguir adelante cuando el camino parecía incierto. De igual forma a mi codirector, el Dr. Giovanni Aguilera-Duran, por compartir sus conocimientos, su orientación constante y su disposición para enseñarnos. Gracias por motivarme a enfrentar nuevos desafíos, por cada consejo brindado y, especialmente, por su paciencia durante todo este proceso.

A mis amigos, quienes hicieron de este camino una experiencia más llevadera. Gracias por escucharme, comprenderme y acompañarme en cada momento de estrés, incertidumbre y alegría. En especial, a Ale, Cristian, Alex, Manuel y Farid por su amistad, sus consejos y por todas las risas dentro y fuera del laboratorio.

A mi compañero de equipo y de vida, Ángel, por caminar a mi lado durante esta aventura. Gracias por creer en mí incluso cuando yo dudaba, por escucharme, motivarme y sostenerme en los momentos de frustración. Gracias por compartir las largas jornadas de trabajo, las desveladas, las preocupaciones, pero también las alegrías y los pequeños triunfos que hicieron de este proceso una experiencia única.

A todos ustedes, gracias por ser parte de esta historia. Este logro también les pertenece.

— Beatriz Franco Chávez

RESUMEN

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es la leucemia más frecuente en niños y adolescentes; aunque la supervivencia infantil supera el 90 %, en adultos es menor al 40 % debido principalmente a la quimiorresistencia. En este contexto, la sobreexpresión del transportador MRP4 representa un factor clave de resistencia a fármacos quimioterapéuticos, debido a su participación en la expulsión de fármacos citotóxicos, posicionándolo como una diana terapéutica prometedora. En este proyecto, se identificaron potenciales inhibidores de MRP4 mediante estrategias *in silico* basadas en acoplamiento molecular a gran escala, comparando un flujo de trabajo clásico con un protocolo que integró herramientas de quimioinformática. Se exploraron 36,454 compuestos naturales del *Natural Products Atlas* para la búsqueda de nuevos inhibidores, así como 9,125 fármacos de *DrugBank* bajo una estrategia de reposicionamiento. El enfoque alternativo implementó filtros de exclusión estructural y toxicológica (Brenk, NIH, PAINS), normalización de afinidad (SILE) y una Optimización Multiparamétrica (MPO) para priorizar a los mejores candidatos, además de la ejecución de *Ensemble Docking*, que permitió considerar la flexibilidad conformacional de MRP4. Los mejores candidatos se evaluaron mediante simulaciones de dinámica molecular y metadinámica utilizando ceefourin-1 como inhibidor de referencia. Los resultados mostraron que los mejores candidatos de la biblioteca NPA actúan teóricamente como sustratos y no superan la afinidad del control, siendo descartados. Por el contrario, la estrategia de reposicionamiento identificó a imatinib ($\Delta G = -64.55$ kcal/mol) y avatrombopag ($\Delta G = -60.81$ kcal/mol) como los candidatos más prometedores, con afinidades teóricas superiores a ceefourin-1 ($\Delta G = -56.65$ kcal/mol). El análisis de interacciones sugirió que residuos como Trp995, Phe368, His152 y Met992 son determinantes para la inhibición funcional de MRP4.

I. INTRODUCCIÓN

El cáncer, caracterizado por la pérdida de control sobre el ciclo celular y la proliferación descontrolada de células malignas, figura entre las cinco principales causas de muerte en el país. Dentro de las neoplasias hematológicas, la leucemia linfoblástica aguda (LLA) destaca por su alta incidencia en la infancia. Mientras que en pacientes pediátricos la tasa de éxito supera el 90 % gracias a los avances terapéuticos, en adultos el pronóstico ha sido históricamente desfavorable, con tasas de supervivencia inferiores al 40 %.

La quimioterapia, principal tratamiento para la LLA, enfrenta como principal obstáculo la resistencia a múltiples fármacos que consiste en un fenómeno mediado en gran medida por transportadores dependientes de ATP. Entre estas destaca el transportador MRP4, cuya sobreexpresión se ha identificado en múltiples cánceres, incluida la LLA. MRP4 favorece la expulsión de agentes anticancerígenos y participa en el transporte de AMPc, esencial para la maduración y supervivencia de células leucémicas convirtiendo a MRP4 en un blanco terapéutico relevante.

El diseño de fármacos asistido por computadora (DIFAC) constituye actualmente una de las herramientas más útiles en el descubrimiento de nuevos fármacos, ya que reduce costos y tiempos mediante cribado virtual, predicción de interacciones y evaluación temprana de propiedades farmacocinéticas y de toxicidad. La integración de la inteligencia artificial ha potenciado aún más este proceso, haciéndolo más rápido y personalizado. Sin embargo, el cribado virtual convencional presenta algunas limitaciones por el sesgo asociado al peso molecular y la aparición de falsos positivos derivados de alertas estructurales. Frente a ello, la quimioinformática aporta filtros jerárquicos de depuración, métricas como la Estimación Cuantitativa de Similitud a Fármaco (QED) y la normalización del *docking score* mediante el Índice de Eficiencia de Ligando Independiente del Tamaño (SILE), permitiendo una exploración más precisa del espacio químico.

Ante la falta de inhibidores selectivos de MRP4, el presente trabajo implementa y compara dos enfoques metodológicos para la selección de ligandos: un flujo de cribado virtual convencional basado principalmente en el *docking score*, y un

enfoque optimizado que integra herramientas avanzadas de quimioinformática y filtros estructurales más robustos. Un componente crítico de esta vía optimizada fue la integración de *Ensemble Docking* que, a diferencia del método clásico, considera la flexibilidad conformacional de MRP4 al capturar múltiples estados de su sitio de unión, asegurando una exploración más realista de las interacciones proteína-ligando.

Se exploraron 36,454 compuestos del *Natural Product Atlas* (derivados de bacterias, hongos y cianobacterias) y se evaluó el reposicionamiento de 9,125 fármacos de *DrugBank* mediante acoplamiento molecular a gran escala. Tras identificar a aquellos ligandos con los *docking score* más favorables como los mejores candidatos, se sometieron a dinámica molecular y metadinámica para evaluar la estabilidad del complejo y la afinidad teórica, comparándolos con el inhibidor control como ceefourin-1, junto con una evaluación ADME-Tox para determinar su viabilidad terapéutica. Esta estrategia ofrece nuevas alternativas para el desarrollo de inhibidores de MRP4, contribuyendo al tratamiento de la resistencia a fármacos en LLA-T y a la mejora en la calidad de vida de los pacientes.

II. ANTECEDENTES

II.1 Cáncer

El cáncer es una enfermedad genética caracterizada por la proliferación descontrolada y proliferación de células anormales, originada por alteraciones en protooncogenes, genes supresores de tumores y genes de reparación del ADN (Hanahan, 2026). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), su incidencia aumenta proporcionalmente con la edad, debido a la acumulación de distintos factores de riesgo. Se estima que alrededor de diez millones de muertes fueron causadas por el cáncer en 2021. Existen más de cien tipos de cáncer, clasificados principalmente en tumores sólidos y neoplasias hematológicas, como las leucemias (NIH, 2021).

Las leucemias crónicas se distinguen por la proliferación descontrolada de células maduras y diferenciadas, clasificándose de acuerdo con el tipo de célula afectada. En contraste, las leucemias agudas se caracterizan por la formación de linfoblastos, los cuales son células sanguíneas irregulares, inmaduras e indiferenciadas que desplazan a las células normales en la médula ósea y la sangre periférica. En consecuencia, se produce una reducción en el número de eritrocitos y plaquetas en la sangre periférica. Las leucemias agudas son clasificadas según el origen de dichas células: linfoides, mieloides, mixtas e indiferenciadas (Tebbi, 2021).

A pesar de que el cáncer es menos frecuente en niños y adolescentes, se ha observado un aumento gradual en la incidencia de LLA en este sector poblacional desde 1975, en donde alrededor se presentan 40 casos por cada millón de habitantes en los Estados Unidos, lo que resalta la importancia de esta enfermedad (NIH, 2024). En el año 2021 se registraron un total de 90,123 decesos derivados de tumores malignos en México, a su vez se informó que la tasa de defunciones aumentó entre 2010 y 2021 (INEGI, 2023). El cáncer se ha catalogado como una de las cinco principales causas de muerte en el país, estando presente en diferentes grupos de edades (INEGI, 2023).

II.1.1 Fisiopatología

La LLA se clasifica como una neoplasia maligna de los linfocitos B o T que se presenta comúnmente durante la niñez, este tipo de cáncer afecta tejidos que contienen células madre como el timo o la médula ósea. La manifestación de un desequilibrio en la formación de todos los tipos de células sanguíneas es provocada por un crecimiento tumoral en la médula ósea (encargada del proceso de hematopoyesis) (Juárez-Avendaño y col., 2021).

La proliferación no controlada de las células linfoides es provocada cuando el ADN de una célula hematopoyética es dañado. Las células linfoides son infiltradas por todo el cuerpo, causando que las células normales de la sangre sean reemplazadas por células malignas (Y. Zhu y col., 2026).

Diferentes tipos de leucemias linfáticas son identificadas mediante análisis morfológico, cariotipo, inmunofenotipo, aberraciones cromosómicas, entre otros. Según su inmunofenotipo pueden ser clasificadas como LLA de células B (LLA-B) o LLA de células T (LLA-T) (Teachey y Pui, 2019). Estudios recientes han permitido que otro tipo de afecciones como la leucemia de linaje ambiguo, la leucemia temprana de precursores de células T y la leucemia similar al cromosoma Filadelfia (+) sean detectados (Juárez-Avendaño y col., 2021).

La sintomatología de la LLA no es específica, ya que, un amplio espectro de síntomas y signos son manifestados por el paciente. La fiebre, palidez y hematomas son presentados por los pacientes como signos tempranos de supresión de la médula o anomalías hematológicas. Sin embargo, la organomegalia, infecciones recurrentes, fatiga, linfadenopatía y erupciones cutáneas también son observadas (Chang y col., 2021).

II.2.1 Etiología

La LLA es una enfermedad multigénica y compleja originada por alteraciones genéticas adquiridas en células madre hematopoyéticas (Iacobucci y Mullighan, 2017). Diversos factores hereditarios, incluidos síndromes genéticos, variantes de nucleótido simple en genes como *ARID5B* e *IKZF1*, así como mutaciones

germinales en *TP53*, *PAX5* y *ETV6*, incrementan la susceptibilidad a desarrollar la enfermedad. Asimismo, alteraciones asociadas con síndromes como ataxia-telangiectasia y síndrome de Down respaldan la existencia de una predisposición genética a la LLA.(Inaba y Mullighan, 2020).

Entre las anomalías cromosómicas más relevantes destaca el gen de Linaje Leucémico Mixto (LLM/MLL), también llamado *ALL-1* o *HRX*. Este gen es considerado un punto de quiebre frecuente en leucemias debido a sus múltiples translocaciones, las cuales se han relacionado con LLA, leucemia mieloide aguda y linfoma de Burkitt. Estas alteraciones incluyen deleciones, duplicaciones, mutaciones puntuales y rearrreglos cromosómicos capaces de promover la oncogénesis mediante sobreexpresión génica o formación de proteínas quiméricas (Comoto-Santacruz y col., 2023).

Las translocaciones cromosómicas funcionales contribuyen a la oncogénesis mediante la sobreexpresión de oncogenes o la formación de proteínas quiméricas con funciones alteradas. Entre las más relevantes en leucemia linfoblástica aguda (LLA) se encuentran *ETV6-RUNX1* [t(12;21)] y *BCR-ABL1* [t(9;22)], esta última responsable de la formación del cromosoma Filadelfia. En LLA-B, la translocación t(12;21)(p13;q22) codifica para la proteína quimérica *ETV6-RUNX1*, la cual desregula procesos hematopoyéticos y favorece la autorrenovación de progenitores de células B. No obstante, este reordenamiento constituye un evento temprano de leucemogénesis que requiere alteraciones genéticas secundarias, como deleciones en *BTLA* y *TOX* (moléculas de señalización linfoide), *TBL1XR1* (coactivador transcripcional), *NCR3C1* (gen receptor de glucocorticoides) y *BTG1* (gen regulador de la apoptosis) para inducir el desarrollo de leucemia. Por otro lado, la translocación *BCR-ABL1* genera una tirosina cinasa constitutivamente activa que promueve proliferación celular y desregulación de múltiples vías de señalización (Mullighan, 2012).

En LLA-T, la activación continua de la vía de señalización *NOTCH1* y las deleciones en *CDKN2A*, que elimina a los genes supresores *p16/INK4A* y *p14/ARF* en más del 70 % de los casos, favorecen la proliferación, supervivencia y bloqueo de la

diferenciación de los timocitos, constituyendo los principales eventos oncogénicos de este subtipo (Van Vlierberghe y Ferrando, 2012).

II.3.1 Epidemiología

Es importante destacar que en México las leucemias ocupan el séptimo lugar en relación con su tasa de mortalidad, específicamente la LLA es considerada la principal causa de muerte no accidental en la población infantil (Melendez y col., 2023). Entre 2007 y 2010 se registró una incidencia en jóvenes entre 0 y 18 años diagnosticados con leucemia de 75.3 por cada millón de habitantes al año, de los cuales el 83 % de los casos pertenecían a LLA. La cantidad de casos fue muy alta, especialmente en niños de 0 a 4 años. Además, un análisis de los datos recolectados permitió identificar que en el estado de Sonora, Yucatán y Quintana Roo se presenta una mayor tasa de mortalidad de 10 casos y más por cada 100,000 habitantes, estos datos son representados gráficamente en la Figura 1 (Palacio-Mejía y col., 2022).

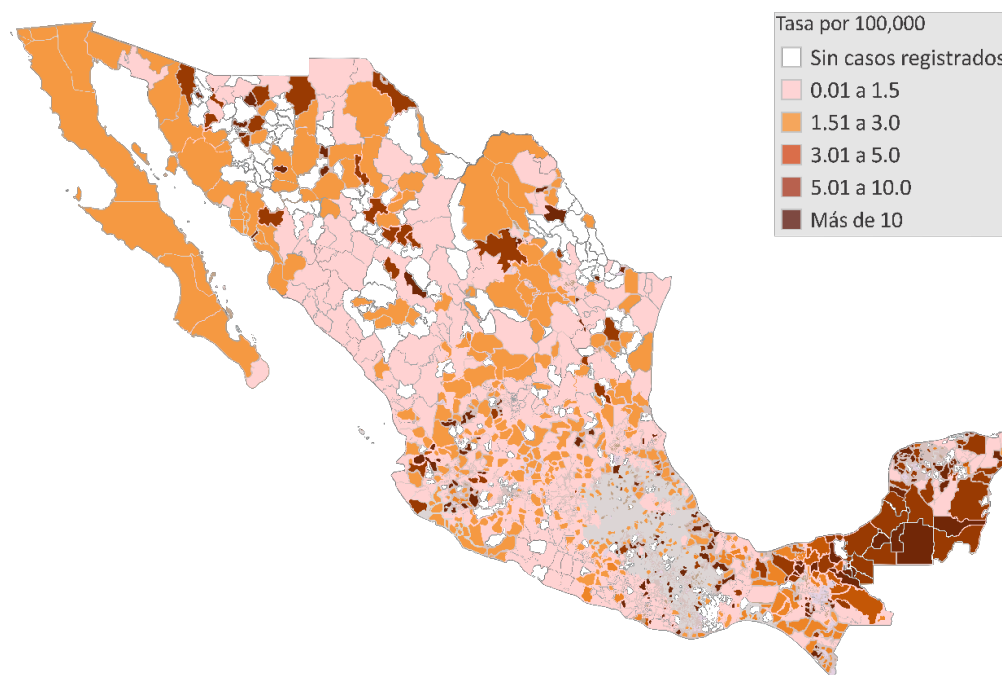


Figura 1. Mortalidad de LLA en México (2000 a 2020). Tomado de INSP (2021).

En 2023 se reportó que, del total de casos de cáncer reportados en la niñez, el 50% fueron confirmatorios para LLA (Secretaría de Salud, 2023). Asimismo, de acuerdo con la información proveniente de la base de datos del Hospital Pediátrico de Sinaloa, en el periodo de 2017 a 2021, 61 de 74 casos fueron diagnosticados como LLA, en donde el 34.43 % del total eran pacientes de entre 0 y 4 años, siendo la línea celular LLA-B la más frecuente con un 95 % del total de los casos (Melendez y col., 2023).

Se ha pronosticado que para el 2025 habría aproximadamente 66,890 nuevos casos de leucemia en Estados Unidos, de los cuales 23,540 fallecerán por dicha causa. Por otro lado, en 2025 se informó que la supervivencia relativa a 5 años para pacientes con LLA en Estados Unidos fue del 72.6 % entre el 2015 y 2021. Se estima que en el 2025 el porcentaje de nuevos casos de LLA sería del 0.3 %, con una tasa de muerte del 0.2 % (NIH, 2026).

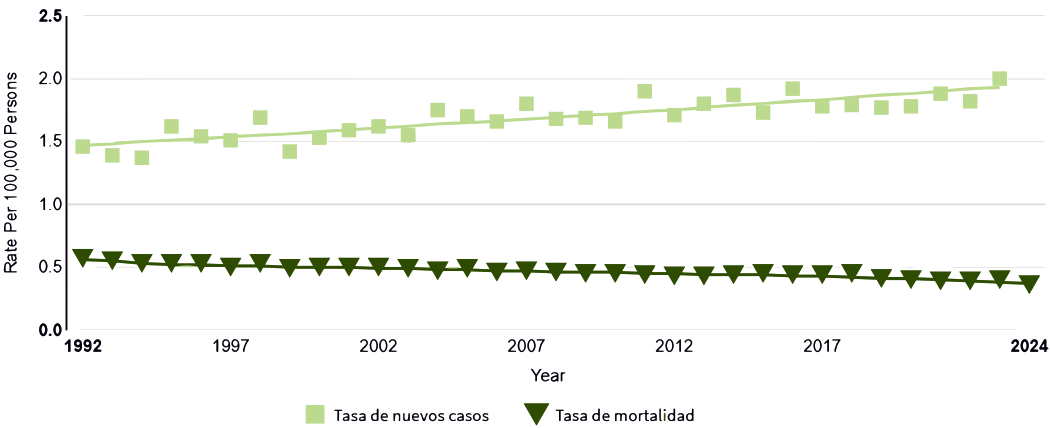
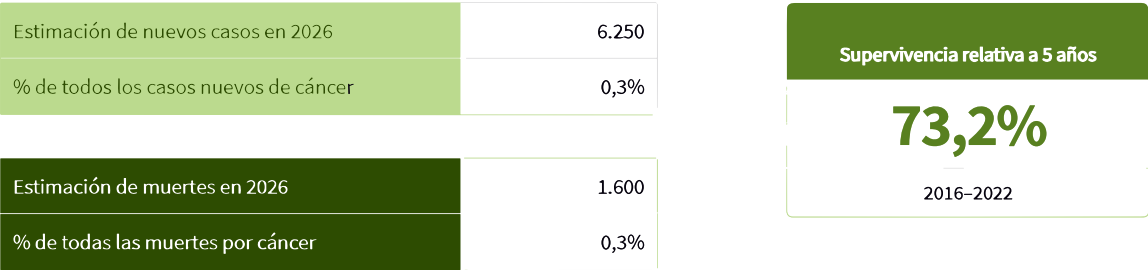


Figura 2. Datos estadísticos de LLA en Estados Unidos. Tomado de NIH (2026).

II.4.1 Tratamiento y supervivencia

El tratamiento de la LLA infantil ha tenido a lo largo de los años un porcentaje de éxito mayor al 90 %, sin embargo, el pronóstico de la LLA en adultos ha sido desalentador, con menos opciones de tratamiento disponibles y una tasa de recuperación inferior al 40 % (Samra y col., 2020). La supervivencia de los pacientes con LLA ha aumentado en los últimos años gracias al descubrimiento de nuevos fármacos, en conjunto con la implementación de regímenes de tratamientos intensivos multimodales que incluyen; quimioterapia, quimioterapia en dosis altas y rescate de células madre, así como la radioterapia (Chang y col., 2021).

Las opciones de tratamiento de la LLA de células B se ha ampliado en los últimos años con la llegada de inhibidores dirigidos a la tirosina cinasa BCR-ABL1, así como novedosas construcciones de anticuerpos y terapias de células T con receptor de antígeno quimérico. Estas nuevas perspectivas han ayudado a que el trasplante de células madre hematopoyéticas en la primera remisión completa, no sea la única opción de tratamiento (Samra y col., 2020).

El descubrimiento en 1951 de la 6-mercaptopurina (6-MP) para interferir con el metabolismo del ADN, fue una gran contribución en el tratamiento de la LLA, posteriormente en 1961 se logró una mayor eficacia al combinar la 6-MP y metotrexato (MTX). La combinación de varios fármacos antileucémicos como vincristina (VCR), asparaginasa (ASP), ciclofosfamida (CPM), daunorrubicina (DNR) y citarabina (Ara-C) proporcionó un aumento en la tasa de inducción de la remisión en pacientes con LLA. Tiempo después llegó la implementación de la “terapia total” la cual abarca una serie de 4 fases, en donde cada una es crucial y requiere un período de tiempo considerable para llevarse a cabo correctamente. El primer paso de la terapia total es la inducción de la remisión, aquí se busca eliminar las células cancerígenas, con el objetivo de restaurar la función normal de la médula ósea mediante la administración de quimioterapia. Posteriormente en la terapia de intensificación se utilizan dosis más elevadas del medicamento, o alternativamente el trasplante de células madre para eliminar cualquier célula cancerosa residual y fortalecer la respuesta inmunitaria del paciente. La terapia dirigida al sistema

nervioso central (SNC) es muy importante para evitar la propagación de células cancerosas al SNC, en esta fase se administran medicamentos en el líquido cefalorraquídeo directamente. Finalmente, en la terapia de mantenimiento continuo se administran dosis más bajas de los medicamentos de quimioterapia de forma continua para prevenir una recaída de la enfermedad (Hayashi y col., 2024).

En los últimos años, se ha reportado un régimen de tratamiento sin quimioterapia con el uso de blinatumomab y ponatinib que arrojó resultados positivos con una tasa de remisión molecular completa del 85% y una tasa de supervivencia estimada a 3 años del 90%, esto nos indica que es posible reducir la función y la necesidad de trasplantar células madre en remisión para lograr un tratamiento exitoso. Para pacientes con LLA con cromosoma Filadelfia pre-B negativo se ha reportado la integración en la terapia de primera línea de blinatumomab e inotuzumab con una mejora considerable en la tasa de supervivencia a 3 años al 85% en todas las categorías de riesgo (Jabbour y col., 2023).

La evolución del tratamiento de la LLA permitió mejorar drásticamente la supervivencia de los pacientes y observar esta enfermedad desde un punto diferente de vista como una enfermedad curable. Sin embargo, el éxito de remisión está influenciado con factores externos, en países de ingresos bajos y medianos las tasas de éxito son más bajas a diferencia de los países con ingresos altos. La dificultad de acceder al tratamiento, retrasos o interrupción de este, así como la imposibilidad de llevar a cabo la terapia de mantenimiento contribuyen a que en países en vías de desarrollo se presente una disminución de la supervivencia general en pacientes con LLA (Hayashi y col., 2024).

II.2 Quimiorresistencia

Uno de los factores principales de fracaso al momento de suministrar una quimioterapia es la resistencia a los medicamentos que desarrollan las células cancerígenas posterior a la exposición con el tratamiento, en los cuales los agentes antineoplásicos dejan de ejercer su efecto citotóxico en las células cancerígenas.

Con gran frecuencia las terapias tradicionales son capaces de lidiar con una gran parte de la carga de células cancerígenas, a excepción de algunas células que persisten y se vuelven tolerantes a los medicamentos suministrados (DTP, *Drug-Tolerant Cells*), estadísticamente el 90 % de las muertes de cáncer se deben a este factor (Dhanyamraju y col., 2022). La complejidad de la quimiorresistencia está ligada a tres diferentes cuestiones que involucran: la terapia, la población de células cancerígenas y finalmente el entorno en el que se desarrolla la enfermedad ya sea un órgano o tejido (Vasan y col., 2019). Este proceso de resistencia a los fármacos se ha reportado mediante diferentes mecanismos por los cuales las células son capaces de evadir la acción de los medicamentos anticancerígenos, algunos ejemplos de ello son: la evasión de la muerte celular, alteración del metabolismo, transformación epitelial, inactivación de fármacos y aumento de la expulsión de fármacos de las células (Dhanyamraju y col., 2022).

El alto flujo de expulsión de agentes anticancerígenos es considerado como el principal motivo de resistencia a los medicamentos, en donde la superfamilia de proteínas dependientes de ATP (ABC, del inglés *ATP-binding cassette*) es la principal responsable de este fenómeno molecular, se ha detectado sobreexpresada en múltiples tumores en los que se presenta la resistencia a los fármacos, traduciéndose en una reducción en la eficacia del tratamiento y presentando un problema a resolver en los tratamientos contra el cáncer (Pérez De Marcos y col., 2021)

II.3 Papel de la superfamilia de transportadores dependientes de ATP

La expulsión de fármacos está mediada por proteínas como la glicoproteína-P, fue el primer miembro identificado de las proteínas ABC, una clase de bombas de eflujo en humanos. Su nombre hace referencia a los dominios catalíticos altamente conservados de unión a ATP, es decir, tiene acción de ATPasa. Estos transportadores utilizan la energía para proporcionar un transporte activo en contra del gradiente de concentración. Clásicamente, las proteínas ABC están constituidas por dos dominios transmembranales (TMD), cada uno con seis hélices

transmembrana (TM), y dos dominios de unión a nucleótidos (NBD), comprendiendo la familia más grande de proteínas transmembranales (Dean y col., 2022).

Así mismo las proteínas ABC se encargan de cumplir funciones de distribución, absorción y expulsión de múltiples sustratos endógenos y exógenos. Esta última función puede actuar en beneficio de la supervivencia de las células cancerígenas, ya que les permite evitar una acumulación del fármaco en el interior de la célula, evitando la muerte celular (Bukowski y col., 2020). Este mismo mecanismo funciona de igual forma en las células madre cancerosas, facilitando evadir fármacos como el cisplatino, paclitaxel, docetaxel y cetuximab. De hecho, se cree que es una de las herramientas más poderosas que utilizan dichas células para su supervivencia, puesto que comúnmente los genes de las proteínas ABC se encuentran sobreexpresados en procesos cancerígenos (Rezayatmand y col., 2022).

El análisis filogenético de los dominios de unión a nucleótidos ha permitido la clasificación de las diferentes familias de genes ABC, que en humanos alcanza los 48 genes, mismos que se dividen en siete subfamilias clasificadas alfabéticamente desde la A hasta la G (Dean y col., 2022). Es importante mencionar que en células eucariotas las familias ABCE y ABCF solo cuentan con dominios de unión a nucleótidos, por lo tanto, no cuentan con la función de transporte a diferencia de las demás proteínas ABC (Pérez De Marcos y col., 2021).

Entre los transportadores más estudiados se encuentra ABCC1, también referenciado como MRP1, este transportador pertenece a la subfamilia C de transportadores ABC, de la cual se han descubierto hasta el momento trece miembros, desde ABCC1 hasta ABCC13, de estos, nueve se clasifican como MRP's (*Multidrug Resistance-associated Protein*, por sus siglas en inglés), estos transportadores son especiales, debido a que son responsables de la expulsión de endobióticos y xenobióticos, resaltando su papel en la resistencia a múltiples fármacos (Wang y col., 2021).

II.1.1 Papel central de MRP4 como modulador farmacocinético

Las MRP se han encontrado en diferentes tejidos del organismo y se involucran en funciones fisiológicas como: desintoxicación celular, estrés oxidativo, inflamación, transporte de moléculas y resistencia a múltiples medicamentos en cáncer. Dirigirse a las proteínas MRP para bloquear su función de eflujo representa una estrategia innovadora para mejorar la eficacia de la quimioterapia, permitiendo incrementar la acumulación intracelular de fármacos anticancerígenos. Esta aproximación ha facilitado el desarrollo de una amplia variedad de inhibidores que interfieren con la función de eflujo de las MRP (Wang y col., 2021).

Dentro de esta subfamilia MRP4 se encarga de transportar xenobióticos como agentes cardiovasculares, antivirales y anticancerígenos al modificar su farmacocinética, pero a su vez se encarga del transporte de moléculas endógenas (endobióticos) como AMPc, ADP, GMPc, prostaglandinas, leucotrienos y ácido fólico (Jung y col., 2020). Por ello una sobreexpresión de MRP4 normalmente conlleva a un fracaso en la eficacia del medicamento. El papel de MRP4 es fundamental, ya que se ha encontrado expresado en un gran número de órganos como: riñones, hígado, páncreas, glándulas suprarrenales, cerebro, plaquetas, linfocitos y eritrocitos en humanos (Becerra y col., 2021). Y a su vez se ha relacionado con la proliferación, migración y diferenciación celular en varios tipos de neoplasias como cáncer de pulmón de células no pequeñas, neuroblastoma, linfoma y leucemia (Jung y col., 2020).

Especialmente se ha descrito una regulación positiva de MRP4 mediante AMPc intracelular en células de músculo liso vascular, células megaloblásticas M70e, líneas de adenocarcinoma de páncreas y células HeLa (Rodríguez-González y col., 2021). Entre algunos de los sustratos que podemos encontrar para MRP4 tenemos análogos de nucleósidos como 6-mercaptopurina, citarabina, arsenito, irinotecán y metotrexato (Döring y col., 2020).

En un estudio reciente, se demostró la correlación entre la alta expresión de MRP4 y la resistencia al metotrexato *ex vivo* en LLA infantil mediante un ensayo de inhibición de timidilato sintetasa *in situ* (Jaramillo y col., 2019). De igual manera, fue

observado que el tratamiento con histamina incrementó los niveles de MRP4, lo que favoreció la expulsión de AMPc; posteriormente, al emplearse un inhibidor de MRP4, la capacidad antiproliferativa de la histamina fue potenciada en células de leucemia mieloide aguda (Rodríguez-González y col., 2021). Asimismo, se ha determinado que la exposición a ceefourin-1, un inhibidor selectivo de MRP4, mejoró de manera sinérgica la actividad de la 6-mercaptopurina en células leucémicas Jurkat, observándose el mismo fenómeno en células CRL-1991 aunque en menor magnitud (Becerra y col., 2022).

II.2.1 Ciclo biológico de MRP4

El mecanismo de estos transportadores ocurre mediante consumo de ATP, lo que proporciona energía suficiente para generar un transporte activo en contra del gradiente. La funcionalidad ATPasa de esta familia proviene de sus dominios catalíticos conservados. Mientras que los TMD son cruciales para la unión del fármaco, los NBD se unen e hidrolizan ATP para impulsar el transporte de moléculas tanto exógenas como endógenas (Bloch y col., 2023).

La subfamilia ABCC ha sido poco estudiada estructuralmente, debido a que no se han resuelto la totalidad de las estructuras del ciclo de MRP4 humano, dicho problema impide la comprensión total del funcionamiento de esta proteína. A pesar de ello en 2023 se describió parte del ciclo de transporte de MRP4 humano, al obtener varias estructuras utilizando la técnica de criomicroscopía electrónica (Cryo-EM) (Bloch y col., 2023). El mecanismo de acción de MRP4 consta de un ciclo de cuatro fases principales (Figura 3): la primera fase consiste en un estado basal abierto hacia el citoplasma (Figura 3-A) con los NBD extensamente distanciados, lo que deja al sitio de unión en contacto con el solvente y accesible al sustrato natural PGE1 (prostaglandina E1), mismo que compite con inhibidores como sulindac, que detiene el ciclo (Figura 3-B2); el segundo estado consta de la unión del sustrato (Figura 3-B1), manteniendo una conformación abierta hacia el citoplasma y propiciando la siguiente fase; la tercera fase consta de la unión de dos moléculas de ATP (Figura 3-C) (Huang y col., 2023; Pourmal y col., 2024), causando la dimerización de los NBD mediante un cambio conformacional alostérico que

comprime los TMD y elimina el sitio de unión de PGE1, promoviendo su expulsión en la tercera fase MRP4 posee las dos moléculas de ATP previamente unidas a los NBD y una conformación abierta al espacio extracelular; en el cuarto estado MRP4 se cierra y mantiene una orientación hacia el espacio extracelular (Figura 3-D), manteniendo su unión con dos moléculas de ATP. El ciclo se reinicia consumiendo un ATP y liberando ATP, ADP y fosfato inorgánico (Pi) (Bloch y col., 2023). Es posible que MRP4 experimente la unión de ATP en su segunda fase en ausencia del sustrato y transicione a su cuarto estado, a una velocidad notablemente más lenta (Pourmal y col., 2024).

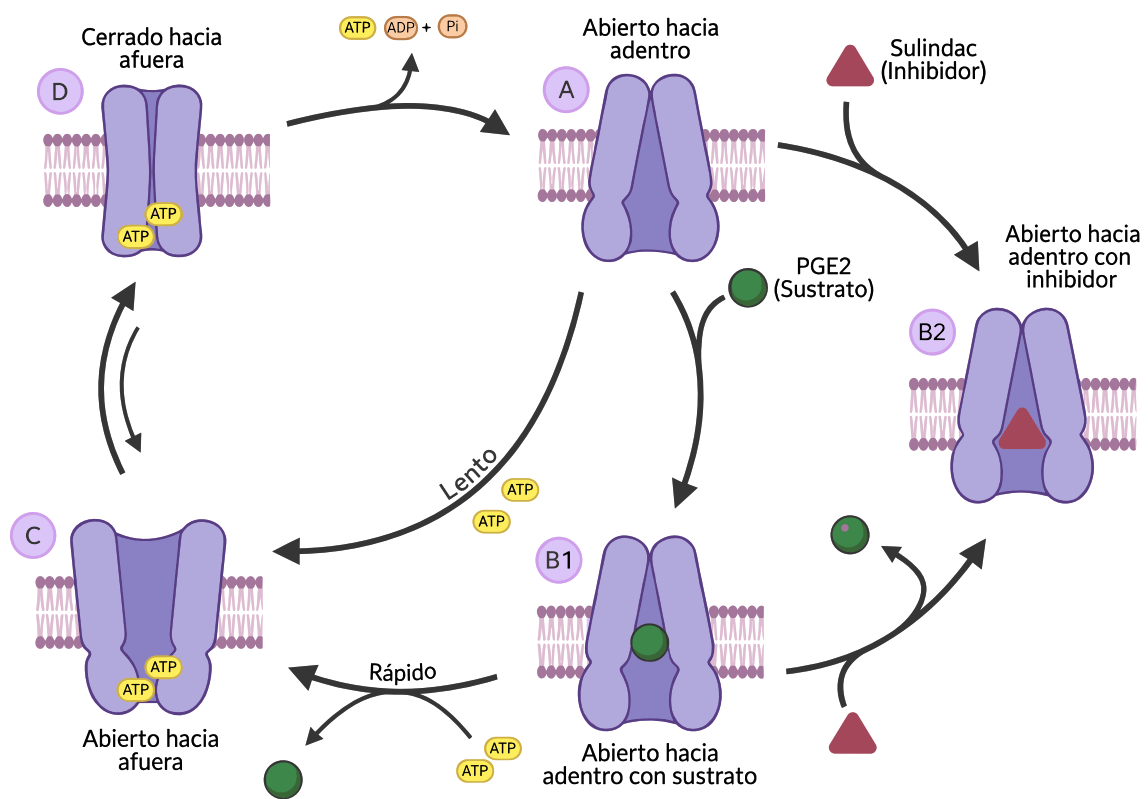


Figura 3. Ciclo de MRP4. Adaptado de Bloch y col. (2023) y Pourmal y col. (2024).

II.3.1 Efectos de la modulación de MRP4.

Existen tres principales vías de señalización que se encuentran relacionadas con la modulación de MRP4 y a su vez con la resistencia a los medicamentos, como se muestra en la Figura 4. En primer lugar, es importante reconocer la relevancia de la vía PKA-AMPC, la cual es crucial debido a que su activación culmina en la detención

del ciclo celular en el punto de control G₁/S. Además, induce la activación del inhibidor del ciclo celular p27^{kip1}, deteniendo el ciclo celular en la fase G₁, sin embargo, una sobreexpresión de MRP4 provoca un mayor transporte de AMPc al espacio extracelular reduciendo considerablemente la actividad en la vía PKA-AMPc (J. Wen y col., 2015). En segundo lugar, la PGE2 considerada la prostaglandina más abundante, desempeña un papel relevante en la progresión del cáncer al promover la proliferación y supervivencia de células tumorales, así como procesos de angiogénesis y metástasis (Finetti y col., 2020). En este contexto, la sobreexpresión de MRP4 favorece la excreción de PGE2 al medio extracelular, lo que contribuye a la activación de los receptores EP2/4, estimulando la proliferación y supervivencia celular, así como la inhibición de p21 y p27^{kip1}, evitando la detención del ciclo celular (J. Wen y col., 2015). En tercer lugar, MRP4 participa en la excreción de diversos xenobióticos, incluyendo fármacos citotóxicos, contribuyendo al desarrollo de resistencia a los medicamentos (Cheung y col., 2014).

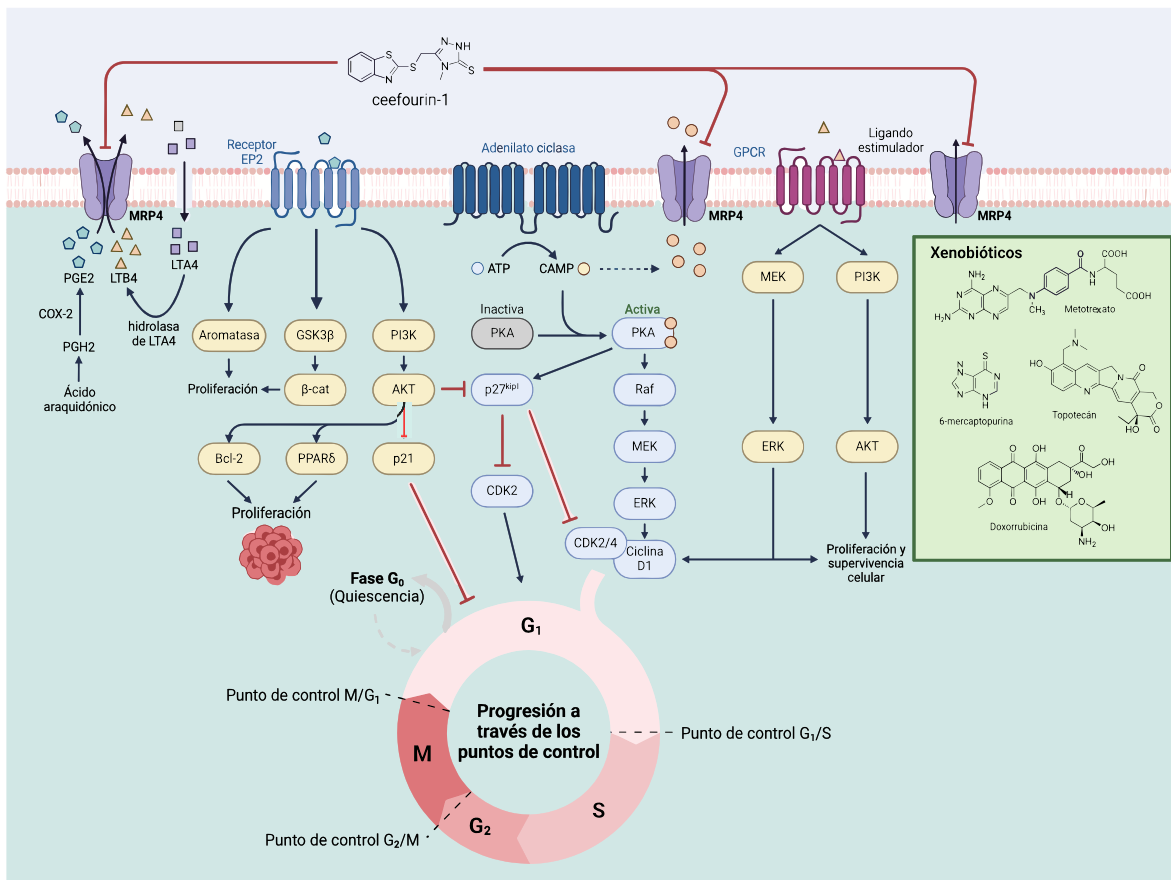


Figura 4. Modulación bioquímica de MRP4. Adaptado de Wen y col. (2015).

II.4.1 Inhibidores de MRP4

En los últimos años, el descubrimiento y desarrollo de inhibidores específicos dirigidos al transportador MRP4 ha demostrado ser prometedor en la investigación contra el cáncer. Sin embargo, en la actualidad la inhibición de MRP4 como diana terapéutica, ha sido limitada debido a la ausencia de moléculas pequeñas inhibitorias de MRP4 (Becerra y col., 2022). Los inhibidores conocidos hasta el momento de MRP4 abarcan una variedad de compuestos, entre ellos, destacan algunos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs). La indometacina, el sulindac y el celecoxib han sido identificados por su acción inhibidora sobre MRP4; sin embargo, estos AINEs también se dirigen a otros miembros de la familia de transportadores ABC relacionados y afectan otras vías como la inhibición de la ciclooxigenasa, lo que limita la selectividad sobre MRP4 (El-Sheikh y col., 2007). Algunos inhibidores de la fosfodiesterasa como el dipiridamol y el sildenafil han reportado actividad inhibitoria en los transportadores de la familia MRP, incluido MRP4, sin embargo, su baja selectividad es un impedimento para su uso como inhibidores de MRP4 (M. Xie y col., 2011).

Uno de los primeros y más utilizados inhibidores de MRP4 es MK-571, originalmente desarrollado como antagonista del receptor de leucotrienos cisteinílicos. Es capaz de inhibir el eflujo de diversos sustratos de MRP4 como el AMPc, el glucorónido de estradiol y ciertos agentes quimioterapéuticos como la 6-mercaptopurina (6-MP) y el SN-38. La inhibición provoca una acumulación de estas sustancias dentro de la célula potenciando los efectos citotóxicos de los quimioterapéuticos, especialmente en el tratamiento del cáncer. Sin embargo, MK-571 no es selectivo para MRP4 y se ha demostrado que inhibe otros transportadores de la familia MRP, como MRP1, MRP2 y MRP3 complicando su uso en entornos de investigación que buscan establecer el papel de MRP4 en el eflujo de agentes terapéuticos (Chen y col., 2018).

Mediante ensayos de cribado de alto rendimiento se identificaron dos inhibidores altamente selectivos para MRP4: ceefourin-1 y ceefourin-2. Ambos bloquean el transporte de una amplia gama de sustratos clave de MRP4, incluidos el AMPc y

agentes quimioterapéuticos como la 6-MP. Además, presentan una baja toxicidad celular, alta estabilidad y selectividad, sin mostrar una interacción con otros transportadores de la familia MRP, incluidos MRP1 y MRP2. En particular, ceefourin-1 (Figura 5) requiere concentraciones significativamente menores que los inhibidores de referencia clásicos (como el MK-571) para alcanzar el mismo nivel de inhibición y modulación del transporte (Cheung y col., 2014).

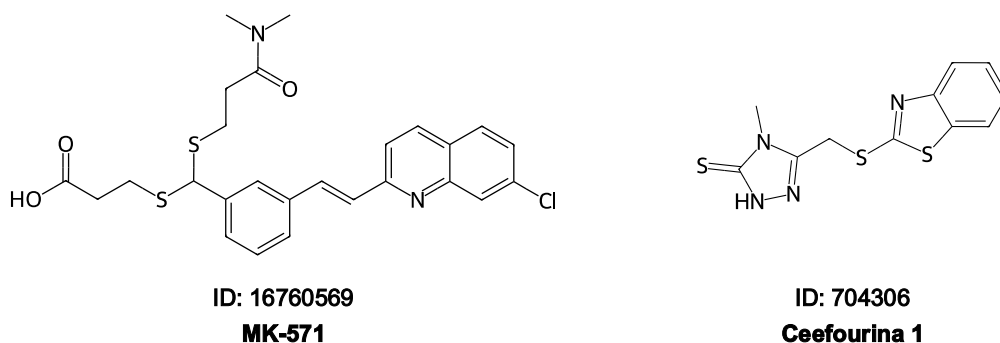


Figura 5. Estructura molecular de MK-571 y ceefourin-1

Lapatinib, un inhibidor de tirosina quinasa indicado para el tratamiento del cáncer de mama avanzado o metastásico HER2 positivo, ha demostrado recientemente nuevas propiedades farmacológicas. Se ha identificado como un potente inhibidor de MRP4, esta superioridad se atribuye a su alta afinidad por MRP4, presentando una constante de disociación (K_D) de 7.1 μM , así como en su capacidad para reducir drásticamente la actividad ATPasa, con una concentración inhibitoria media (IC_{50}) de 8 μM .

En comparación con otros inhibidores conocidos, lapatinib presenta una afinidad considerablemente mayor que dipiridamol, el cual exhibe un K_D de 23 μM . Asimismo, su capacidad para revertir la resistencia a quimioterápicos, evaluada mediante el factor modificador de dosis (DMF), se sitúa en un rango de 4 a 5; este efecto modulador es considerablemente superior al observado en inhibidores modernos como ceefourin-1, cuyo DMF oscila entre 2 y 3.5 (Z. Xie y col., 2025).

Sin embargo, a pesar de que lapatinib ostenta la mayor potencia y afinidad general para revertir la resistencia generada por MRP4, ceefourin-1 es, con gran diferencia,

la molécula más selectiva hacia este transportador. Esta selectividad tan refinada la convierte en el marco de referencia idóneo para dilucidar las interacciones específicas con MRP4 (Cheung y col., 2014).

Anteriormente, en el Laboratorio de Diseño Asistido por Computadora y Síntesis de Fármacos (DACSF), perteneciente a la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro, se llevó a cabo el diseño y optimización de moléculas con potencial inhibidor sobre MRP4 mediante estrategias de modelado por homología y acoplamiento molecular, ante la ausencia inicial de una estructura experimental del transportador.

A partir de ese enfoque se diseñaron las moléculas EBD9 y EBD14, derivadas estructuralmente de inhibidores como quercetina y ceefourin-1. No obstante, debido a sus limitaciones asociadas con síntesis y estabilidad química, se realizó una posterior optimización estructural que condujo al diseño de las moléculas SHC-2-1 y SHC-2-2, incrementando el carácter apolar de los compuestos. Los estudios *in silico* revelaron que SHC-2-2 presentó una mayor afinidad por el sitio de unión a inhibidores de MRP4 en comparación con las otras moléculas diseñadas.

II.4 Diseño de fármacos asistido por computadora (DIFAC)

El diseño de fármacos asistido por computadora (DIFAC) es un área multidisciplinaria enfocada al diseño racional de fármacos, en donde se aplican técnicas computacionales para el análisis, optimización e identificación de compuestos con la finalidad de seleccionar candidatos prometedores para la síntesis y evaluación experimental (Velázquez-Sanchez y col., 2019).

Comúnmente la selección de moléculas comienza realizando un cribado virtual, es decir, una búsqueda sistemática aplicada a grandes bases de datos, empleando diferentes criterios fisicoquímicos, algoritmos o métodos que permitan excluir moléculas con propiedades indeseables o seleccionar compuestos en base a la similitud compuesto líder (Bellera y Di Ianni, 2022).

Actualmente el avance de la tecnología permite el acceso a un mayor poder computacional al desarrollar procesadores más eficientes y con mayor capacidad

de cálculo, permitiendo acelerar los procesos involucrados en el DIFAC (Velázquez-Sanchez y col., 2019).

A su vez los algoritmos de inteligencia artificial y aprendizaje automático como *machine learning* y *deep learning* han demostrado ser eficientes al proporcionar herramientas que facilitan múltiples tareas en el diseño de fármacos como la predicción del plegamiento proteico de blancos moleculares terapéuticos, diseño *de novo* de compuestos, evaluación sistemática de blancos moleculares, predicción de propiedades ADME-Tox e inclusive síntesis química (Saldivar-González y col., 2023).

El uso de DIFAC optimiza el descubrimiento de medicamentos al reducir costos y tiempos mediante cribado virtual, selección de moléculas y predicción de interacciones. Además, minimiza fallos en fases iniciales del descubrimiento de fármacos, mejorando la evaluación de propiedades farmacocinéticas y de toxicidad. Su integración con algoritmos basados en inteligencia artificial acelera la identificación de nuevos candidatos a fármacos.

II.1.1 Modelado de proteínas

En la actualidad la información de la diana molecular de estudio es comúnmente obtenida a través de repositorios como el *Protein Data Bank* (PDB), que alberga un número extenso de estructuras obtenidas mediante métodos experimentales: cristalografía de rayos X, resonancia magnética nuclear o criomicroscopía electrónica.

Cada estructura experimental cuenta con una resolución, que indica la calidad del modelo obtenido en Angstroms, como se puede observar en la Tabla 1 (Bellera y Di Ianni, 2022).

Tabla 1. Calidad de una proteína según su resolución (Blow, 2002).

Resolución (Å)	Interpretación cualitativa
> 4.0 Å	Se pueden identificar elementos generales de la estructura secundaria, como hélices alfa y láminas beta, permitiendo una caracterización general del pliegue de la proteína. Aunque las coordenadas individuales son insignificantes.
3.1 - 4.0 Å	Se puede determinar el pliegue global de la proteína, aunque es común que muchas cadenas laterales adopten conformaciones incorrectas (rotámeros erróneos), lo que limita la precisión del modelo estructural.
2.6 - 3.0 Å	A este nivel, el pliegue proteico es probablemente correcto, aunque pueden existir errores en la conformación de los bucles superficiales. Las cadenas laterales de algunos aminoácidos, en particular aquellas con estructuras largas y flexibles (lisina, ácido glutámico, glutamina) y algunas cadenas laterales pequeñas (serina, valina, treonina), pueden adoptar rotámeros incorrectos.
2.1 - 2.5 Å	Aunque pueden persistir errores en algunos residuos, con muchos pequeños errores detectables. Los errores en los bucles superficiales son menos frecuentes y, a esta resolución, es posible identificar aún moléculas de agua y ligandos pequeños en el modelo estructural.
1.6 - 2.0 Å	La gran mayoría de las cadenas laterales se encuentran correctamente posicionadas, con pocos residuos en rotámeros erróneos. La estructura general es altamente confiable, y los errores son principalmente pequeños ajustes en la orientación de algunos residuos.
0.5 - 1.5 Å	A este nivel de resolución, la estructura proteica se encuentra casi libre de errores. Se pueden resolver átomos individuales con gran precisión, permitiendo un modelado detallado de la red de enlaces de hidrógeno, interacciones iónicas y otras interacciones intermoleculares.

Aún resulta tardado y costoso elucidar la estructura tridimensional de una proteína, debido a estas limitaciones se han desarrollado herramientas que posibilitan la

construcción de modelos teóricos mediante técnicas como el modelado computacional de proteínas.

Existen diferentes enfoques que han dividido en dos diferentes vertientes el modelado de proteínas: el modelado comparativo (por homología) (Figura 6) y el modelado *de novo* (*ab initio*). En el modelado comparativo se utiliza la similitud secuencial entre la proteína objetivo con estructuras ya elucidadas del PDB para construir la proteína tridimensionalmente, cuando la identidad de la secuencia de aminoácidos de la proteína de interés es considerablemente alta, este enfoque es aprovechado por herramientas como: SWISS-MODEL, MODELLER, Robetta, entre otros (Peng y col., 2025; Waterhouse y col., 2018; Webb y Sali, 2016).

Por otro lado, el modelado *ab initio* se basa principalmente en principios físicos y métodos de optimización que permiten predecir la estructura tridimensional partiendo solo de la secuencia primaria aplicando técnicas de aprendizaje profundo y empleando redes neuronales con arquitecturas de transformers. Estas arquitecturas predicen mapas de contacto, distancias y orientaciones entre los residuos hasta generar la estructura proteica completa (Bellera y Di Ianni, 2022).

En el panorama actual existen servidores que destacan en este apartado: AlphaFold, I-TASSER y Robetta. AlphaFold fue desarrollada por DeepMind, y resolvió un desafío científico crucial en la biología estructural (Studer y col., 2021). Este avance fue merecedor del Premio Nobel de Química en 2024, que fue otorgado a David Baker, Demis Hassabis y John Jumper debido a su gran impacto en el desarrollo de nuevos medicamentos (Nobel Prize, 2024; Saldivar-González y col., 2023).

Por otro lado, Robetta desarrollado por el grupo de David Baker integra RoseTTAFold que implementa algoritmos basados en inteligencia artificial proporcionando la predicción de estructuras *ab initio* y modelando regiones en donde existe poca información de la plantilla (Baek y col., 2021).

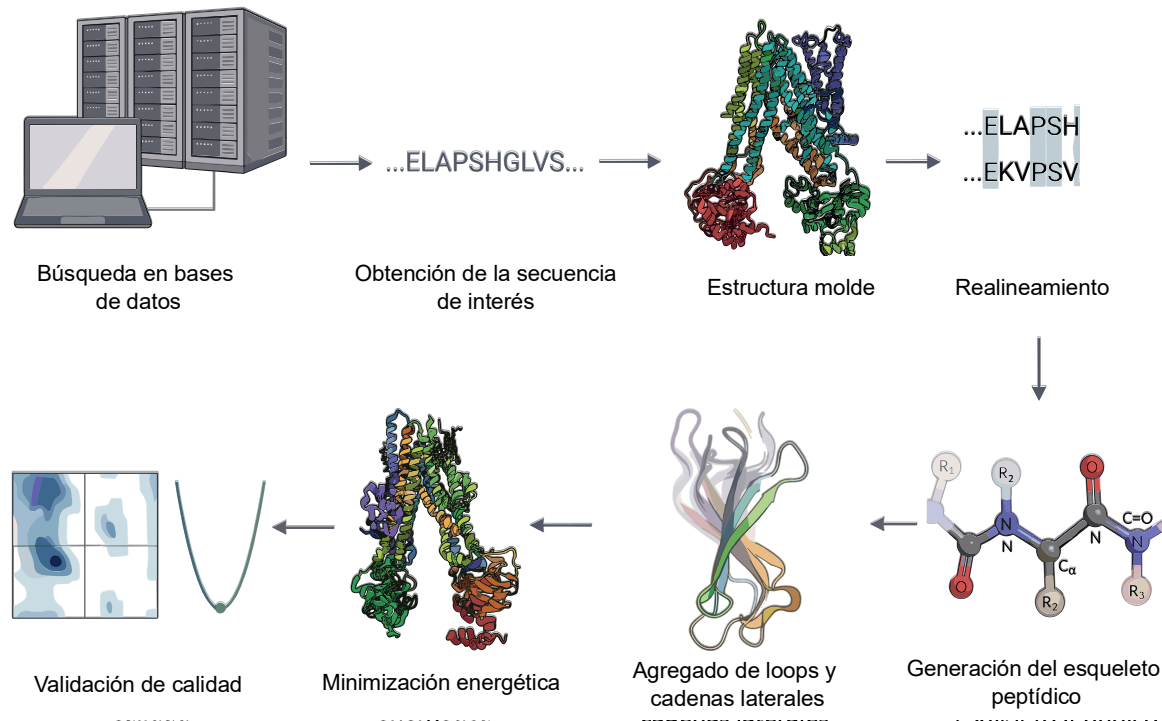


Figura 6. Proceso de modelado de proteínas por homología.

II.2.1 Acoplamiento molecular (*Docking*)

El acoplamiento molecular es una técnica computacional que predice la interacción entre un ligando y una proteína para formar un complejo estructuralmente estable. Esta herramienta permite la comprensión de la interacción de los ligandos con su diana molecular, así como para el descubrimiento y desarrollo de fármacos (Agu y col., 2023; Pinzi y Rastelli, 2019).

El proceso de acoplamiento molecular se puede dividir en tres fases: 1) preparación del ligando y de la proteína, 2) definición del tipo de acoplamiento: semi-flexible o flexible y 3) estrategia de búsqueda de conformaciones de ligando: sistemática o estocástica, mismas que son representadas en la Figura 7.

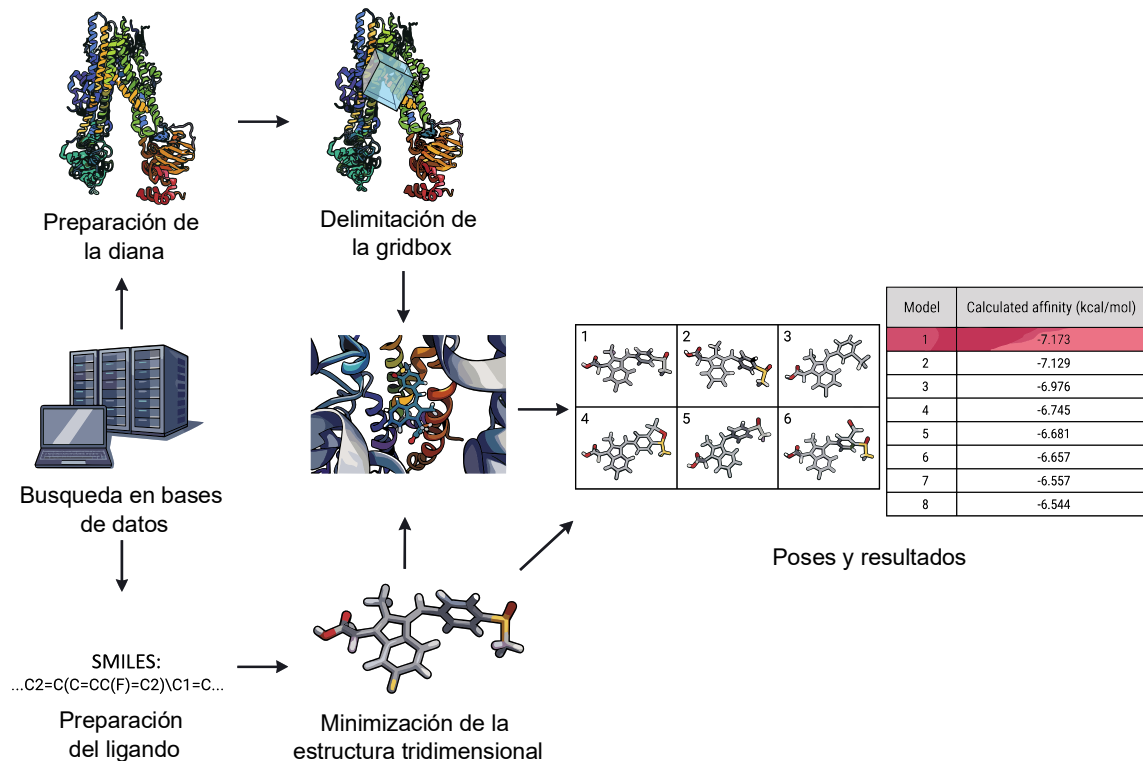


Figura 7. Proceso de acoplamiento molecular.

En la fase de preparación, la proteína obtenida es procesada realizando la protonación de los residuos ionizables y asignación de cargas para proporcionar interacciones electrostáticas adecuadas durante el acoplamiento, además, se eliminan las moléculas de agua y otros ligandos dentro de la estructura de la proteína (Agu y col., 2023).

Posteriormente, se debe seleccionar y delimitar el sitio de unión, ya sea ortostérico o alostérico, especificando las coordenadas en la proteína. Cuando no se conoce el sitio de unión se pueden utilizar algunos programas que permiten encontrar cavidades o sitios de unión probables (Prieto-Martínez y col., 2018).

En el paso 2 se establece el tipo de acoplamiento. En un acoplamiento rígido tanto el receptor como el ligando son estructuras estáticas durante el acoplamiento, en el acoplamiento semiflexible se mantiene el receptor en una conformación fija mientras que el ligando puede adoptar diferentes conformaciones. Finalmente, un acoplamiento flexible permite considerar la flexibilidad de ambos proporcionando

una representación más realista de la interacción molecular (Prieto-Martínez y col., 2018).

El proceso de acoplamiento molecular consta de dos pasos principales: el muestreo del ligando y la utilización de una función de puntuación. Los algoritmos de muestreo de ligando identifican las conformaciones energéticamente más favorables dentro del sitio activo de la proteína, teniendo en cuenta su modo de unión. Este proceso implica la exploración de un espacio conformacional multidimensional, donde se consideran variables como la conformación del ligando, su posición y orientación. Aunque los algoritmos no exploran todas las combinaciones posibles, son lo suficientemente precisos para identificar las conformaciones favorables, estos se dividen en sistemáticos y estocásticos. Los métodos sistemáticos generan conformaciones mediante modificaciones incrementales de los ángulos de torsión del ligando. Por otro lado, los métodos estocásticos introducen cambios aleatorios en la estructura del ligando, evaluando cada nueva conformación según una función de energía que determina la probabilidad de aceptación de dicha conformación. Estos enfoques permiten una exploración amplia del espacio conformacional, aumentando la probabilidad de identificar la conformación óptima para la interacción ligando-receptor (Bellera y Di Ianni, 2022).

Los ligandos se evalúan según su docking score mediante una función de puntuación, analizando que conformación del ligando podría presentar mejor unión (Agu y col., 2023). Se asigna un valor numérico a cada posible conformación del complejo (poses), calculando de una puntuación de acoplamiento para las formas de unión entre las moléculas y la proteína (kcal/mol), teniendo en cuenta diversos parámetros como la complementariedad geométrica, la flexibilidad de las estructuras y las interacciones intermoleculares (Bellera y Di Ianni, 2022).

II.3.1 Métodos quimiinformáticos en el descubrimiento de fármacos

La exploración del espacio químico y las propiedades moleculares de grandes bases de datos se ha convertido en un paso indispensable para el descubrimiento de nuevos compuestos con potencial actividad biológica. Sin embargo, es crucial entender la dificultad metodológica del tamaño, complejidad estructural y diversidad

de las moléculas en las quimiotecas. Sumado a lo anterior, se deben considerar aspectos como las propiedades fisicoquímicas, la viabilidad sintética y aspectos farmacológicos como la toxicidad para aumentar la probabilidad de éxito en el descubrimiento de nuevos fármacos (Saldívar-González y col., 2020).

El cálculo masivo de estas propiedades se facilita mediante la extracción de la notación SMILES de cada molécula y su posterior procesamiento con herramientas como DataWarrior, KNIME o RDKit. Este sistema de representación lineal captura la topología molecular mediante caracteres alfanuméricos, lo que permite un almacenamiento altamente eficiente en grandes bases de datos. La gestión y el análisis de esta información se optimizan al utilizar lenguajes de programación como Python, el cual se integra de manera nativa con bibliotecas especializadas como Pandas para el manejo de datos. En este contexto, RDKit proporciona una robusta interfaz de programación de aplicaciones (API) para Python, consolidándose como una biblioteca quimioinformática fundamental. Su implementación permite generar flujos de trabajo automatizados para manipular, visualizar y analizar estructuras químicas, así como calcular un amplio espectro de descriptores moleculares. En este sentido, RDKit resulta especialmente útil para el curado y selección de compuestos en grandes bases de datos (Chen y Kirchmair, 2020).

En el paradigma actual del descubrimiento de fármacos, la exploración del espacio químico y manejo de grandes bases de datos es recomendable la implementación de filtros jerárquicos. El primer desafío consiste en la depuración del ruido estructural mediante la aplicación de filtros de exclusión rigurosos, entre los estándares más utilizados destacan los filtros de Brenk (Brenk y col., 2008), NIH (Pearce y col., 2006) y PAINS (Baell y Holloway, 2010) además de algunos otros mencionados en la documentación de la API para Python de RDKit (Landrum y col., 2025). Este paso permite depurar las bibliotecas de compuestos que contienen subestructuras tóxicas, promiscuas o indeseables. Sin embargo, a pesar de reducir la cantidad de moléculas indeseables es una buena práctica analizar las propiedades fisicoquímicas del conjunto de datos restante.

Para este propósito, la selección tradicional que emplea las reglas de Lipinski suele aplicarse de manera errónea y rígida mediante clasificación binaria “pasa o no pasa”. Este método ha sido desplazado por métricas continuas de similitud a fármaco (*drug-likeness*), destacando la Estimación Cuantitativa de Similitud a Fármaco (QED, *Quantitative Estimate of Drug-likeness*). Este modelo matemático integra múltiples descriptores a través de la media geométrica ponderada de sus funciones de deseabilidad individuales, expresada en la Ecuación 1 (Bickerton y col., 2012).

$$QED_w = \exp\left(\frac{\sum w_i \ln d_i}{\sum w_i}\right) \quad (1)$$

Más allá del perfil fisicoquímico ideal, el diseño racional moderno dicta que un candidato computacionalmente eficiente carece de valor prospectivo si su obtención física resulta irrealizable. Para modelar esta barrera, existen evaluaciones como el Índice de accesibilidad sintética. Este descriptor estima la factibilidad de síntesis química contrastando un puntaje de 0 al 10, en donde los compuestos cercanos al 0 tienen una alta facilidad de síntesis respecto a la frecuencia de subestructuras de fácil obtención (base de datos), contra una penalización por complejidad topológica o estereoquímica, como se observa en la Ecuación 2 (Ertl y Schuffenhauer, 2009)

$$SA_{score} = Score_{fragmento} - Penalización_{complejidad} \quad (2)$$

Garantizada la viabilidad de síntesis, la priorización de los ligandos se enfoca en su rendimiento frente a la diana terapéutica. En la evaluación de la afinidad ligando-receptor existe un sesgo analítico documentado, los valores de energía absoluta tienden a favorecer artificialmente a las moléculas de mayor tamaño, para mitigar este problema se han introducido conceptos como la eficiencia del ligando (LE), sin embargo, el gran defecto de esta métrica es que depende fuertemente del tamaño de la molécula. Para corregir esta desviación matemática, se introduce el Índice de Eficiencia de Ligando Independiente del Tamaño (SILE), el cual normaliza descriptores relacionados directa o indirectamente con la afinidad, como energía libre de unión, respecto al número de átomos pesados elevado a un exponencial de

0.3 como se muestra en la Ecuación 3. Esta fórmula también es aplicable a puntuaciones calculadas por programas de acoplamiento molecular, debido a la dependencia real que existe respecto al tamaño del compuesto evaluado (Nissink, 2009).

$$SILE = \exp\left(\frac{Afinidad}{N_{HA}^{0.3}}\right) \quad (3)$$

Finalmente, dado que la selección del candidato ideal requiere un balance estricto de diferentes propiedades el análisis químico se ha complementado con métodos que integran Optimización Multiparamétrica (MPO). A diferencia de los filtros empíricos restrictivos (pasa o no pasa), este enfoque emplea una suma ponderada. En este sistema, cada propiedad fisicoquímica o de puntuación evaluada se normaliza mediante una función de deseabilidad d_i , asignándole un valor continuo en una escala de 0 a 1. Posteriormente, cada valor normalizado se multiplica por un coeficiente de ponderación w_i que refleja la importancia relativa de cada parámetro considerado para la identificación de nuevas moléculas. Estableciendo como restricción matemática que la sumatoria de todos los pesos es igual a la unidad $\sum_{i=1}^n w_i = 1$, el puntaje global se calcula mediante la Ecuación 4.

$$MPO = \sum_{i=1}^n w_i d_i \quad (4)$$

Este tipo de ecuaciones garantizan que la métrica final se mantenga estrictamente confinada en el intervalo [0, 1]. Un puntaje de MPO cercano a 1 representa a un candidato con un equilibrio ideal de todos los parámetros incluidos. En conjunto, el uso de esta ecuación final proporciona el soporte cuantitativo para priorizar compuestos con el mejor balance posible de propiedades (Wager y col., 2010).

II.3.1.1 Validación del *Docking*

El acoplamiento molecular es una herramienta fundamental en el diseño racional de fármacos; sin embargo, para evaluar millones de compuestos en tiempos computacionalmente razonables, los algoritmos se ven obligados a utilizar

aproximaciones matemáticas. Estas simplificaciones provocan un submuestreo del espacio conformacional y el uso de funciones de puntuación empíricas con energías inexactas, lo que inherentemente genera una alta tasa de falsos positivos (Bender y col., 2021). Por esta razón, antes de realizar un cribado virtual contra una diana terapéutica, resulta estrictamente necesario someter el protocolo a una validación retrospectiva. Esta fase sirve como un control de calidad para demostrar estadísticamente que el modelo es capaz de discriminar entre los ligandos que se presumen activos, es decir, aquellos con capacidad física de unirse al receptor de los compuestos que se presumen inactivos (Bender y col., 2021).

Dado que la cantidad de compuestos inactivos confirmados suele ser escasa para la mayoría de las dianas, esta validación exige el uso de bases de datos de señuelos o "*decoys*". Para automatizar este proceso, plataformas web como DUDE-Z (Stein y col., 2021) o herramientas como *DecoyFinder* (M. Zhu y col., 2024), construyen quimiotecas de señuelos bajo reglas fisicoquímicas muy estrictas. Estos señuelos deben poseer propiedades casi idénticas a las de los ligandos activos de referencia (mismo peso molecular, Log P, y número de donadores/aceptores de puentes de hidrógeno), pero garantizando una topología química distinta, evaluada mediante coeficientes de Tanimoto (Cereto-Massagué y col., 2012). El cumplimiento de estas reglas asegura que, si el *docking* logra priorizar a los fármacos verdaderos, el enriquecimiento se deba a interacciones moleculares específicas y no a un artefacto derivado de diferencias físicas o geométricas. El éxito de esta discriminación se cuantifica rutinariamente mediante curvas de Características Operativas del Receptor (ROC) y el Área Bajo la Curva (AUC), métricas que evalúan el equilibrio entre la sensibilidad y la especificidad del modelo predictivo (Ke y col., 2014). Sin embargo, construir estas curvas basándose únicamente en la energía de afinidad bruta introduce un sesgo importante, ya que los algoritmos tienden a otorgar puntajes artificialmente favorables a moléculas más grandes por su mayor superficie de contacto inespecífico. Para corregir esta sobreestimación, es necesario normalizar la energía. Aunque métricas clásicas como la Eficiencia del Ligando (LE) dividen la afinidad entre el número de átomos pesados, conservan una dependencia matemática respecto al tamaño. Por ello, el uso de índices avanzados como la

Calidad de Ajuste (FQ, *Fit Quality*) o el Índice de Eficiencia de Ligando Independiente del Tamaño (SILE) resulta fundamental.

Al evaluar el rendimiento de los programas de *docking* clásicos mediante estas métricas, se ha evidenciado una falla sistemática generalizada: aunque logran buena sensibilidad para acomodar ligandos, carecen severamente de especificidad, otorgando energías de unión artificialmente altas a múltiples falsos positivos (Domínguez-Ramírez y col., 2025), para superar esta limitación metodológica, herramientas de vanguardia como GNINA han integrado Redes Neuronales Convolucionales (CNN). A diferencia de las ecuaciones empíricas tradicionales, la red neuronal de GNINA asimila el complejo proteína-ligando como una cuadrícula tridimensional (*3D grid*) de densidades atómicas y lo analiza mediante algoritmos de reconocimiento de patrones. Esto le permite calcular el *CNN score*, una métrica probabilística (de 0 a 1) que evalúa si la pose generada es físicamente realista frente a un cristal de referencia (McNutt y col., 2025).

La superioridad de aplicar estas arquitecturas neuronales fue comprobada recientemente al demostrarse que utilizar un punto de corte estricto (por ejemplo, un *CNN score* ≥ 0.90) antes de clasificar las energías, descarta eficazmente las poses erróneas e incrementa drásticamente la especificidad en las curvas ROC (Domínguez-Ramírez y col., 2025). No obstante, la implementación de modelos de aprendizaje profundo en el diseño de fármacos exige una postura crítica y cautelosa. Al ser algoritmos entrenados con bases de datos preexistentes (como CrossDocked2020), las redes neuronales sufren de un sesgo inherente hacia las estructuras y cavidades que ya han "visto" durante su fase de entrenamiento. En consecuencia, el modelo será excepcionalmente preciso en quimiotipos sobrerrepresentados, pero su rendimiento puede decaer o volverse exploratorio frente a dianas atípicas o modos de unión novedosos. Por lo tanto, el *CNN score* debe interpretarse solo como un filtro heurístico que mejora el proceso de cribado virtual de manera orientativa prioriza la calidad geométrica evaluada por inteligencia artificial sobre la cantidad bruta de candidatos con puntuaciones energéticas imprecisas.

II.3.2.1 Ensemble Docking

La Cryo-EM ha transformado la biología estructural al permitir la observación de macromoléculas en un estado muy cercano a su entorno biológico nativo, eliminando la necesidad de someterlas a procesos de cristalización (Renaud y col., 2018). Esta ventaja es fundamental para el estudio de proteínas transmembranales, como los transportadores, que son dianas terapéuticas clave pero históricamente difíciles de caracterizar. Mediante el uso de sistemas de estabilización como nanodiscos o anfipoles, la Cryo-EM captura a estos transportadores inmersos en un ambiente lipídico, reflejando fielmente su comportamiento fisiológico (Cabral y col., 2022; Renaud y col., 2018).

A diferencia de la cristalografía de rayos X, que suele atrapar a la proteína en una única conformación estática, la Cryo-EM posee la capacidad de clasificar computacionalmente la heterogeneidad de una muestra, lo que permite identificar y aislar múltiples estados conformacionales a partir de un solo experimento. Con los recientes avances que permiten alcanzar resolución a nivel atómico, es posible visualizar directamente los cambios estructurales inducidos por la unión de ligandos, consolidando a esta técnica como una herramienta invaluable para el diseño racional de fármacos (Cabral y col., 2022).

En el ámbito del diseño computacional, evaluar ligandos utilizando una sola estructura rígida resulta limitante, ya que omite la flexibilidad inherente de receptores con una alta plasticidad (Amaro y col., 2018). Para superar este obstáculo se emplea el *ensemble docking* (Figura 8), una metodología que evalúa los compuestos candidatos frente a un conjunto diverso de conformaciones de la misma diana. Al incorporar la flexibilidad del receptor, este método minimiza la restricción geométrica de tener que acoplarse a una forma única, lo que mejora significativamente las tasas de enriquecimiento predictivo y permite descubrir el modo de interacción óptimo para diversas familias químicas de manera simultánea (Craig y col., 2010).

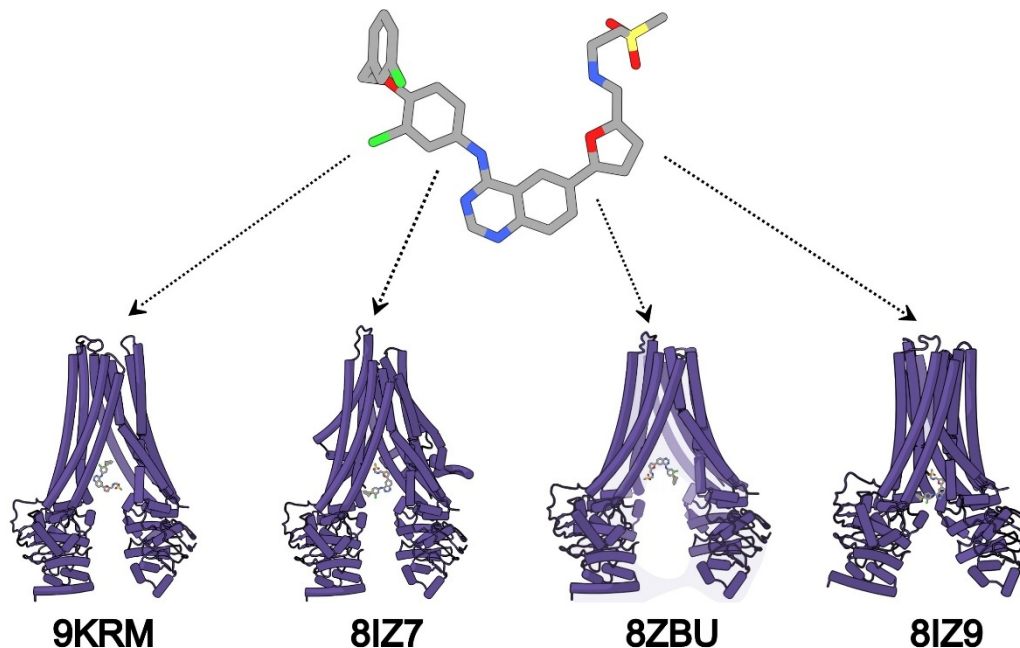


Figura 8. *Ensemble docking* en MRP4

La integración de estos dos enfoques proporciona una estrategia robusta para el descubrimiento de fármacos. Dado que la Cryo-EM captura naturalmente los movimientos funcionales de una proteína en solución, provee directamente las conformaciones biológicamente auténticas que el *ensemble docking* requiere (Cabral y col., 2022; Renaud y col., 2018). Históricamente, modelar esta flexibilidad dependía de simulaciones de dinámica molecular, las cuales enfrentan el gran reto computacional de cubrir la brecha temporal de los movimientos proteicos a gran escala (Amaro y col., 2018; Kapoor y col., 2022). Por ello, utilizar las conformaciones experimentales obtenidas por Cryo-EM permite que el cribado virtual evalúe los ligandos considerando la verdadera flexibilidad del receptor, lo que resulta en un diseño de fármacos realista y preciso.

II.4.1 Simulaciones de dinámica molecular

Una de las etapas más importantes en el área de diseño de fármacos es la dinámica molecular, en donde se realizan simulaciones de interacciones entre los átomos y moléculas a lo largo del tiempo. La diferencia entre el acoplamiento y la dinámica molecular radica en que esta última permite evaluar las propiedades dinámicas,

estructurales y termodinámicas del sistema de estudio en el transcurso de la simulación (Bellera y Di Ianni, 2022). Comúnmente, el sistema molecular se compone por una enzima o receptor inmersa en medio acuoso y en caso de ser membranal está incrustada en una capa lipídica que es proporcionalmente similar a la membrana biológica de la biomolécula estudiada. En los análisis de dinámica molecular de todos los átomos (AAMD, por sus siglas en inglés: *all-atom molecular dynamics*), todos los componentes del sistema a modelar se sitúan dentro de una caja periódica lo suficientemente grande para albergarlos. En esta caja los movimientos de los átomos se rigen con las leyes de Newton mediante algoritmos que permiten determinar las posiciones de los átomos a lo largo del tiempo, como el algoritmo de Verlet con velocidad o el de *leapfrog*, en donde cada estado tiene valores de posiciones y velocidades de todos los átomos. Para permitir el avance de la simulación en el tiempo se debe calcular la energía potencial empírica utilizando un campo de fuerza, que calcula la energía potencial en función de las posiciones de los átomos en el espacio. Este cálculo incluye todos los tipos de interacciones, como interacciones no enlazantes: fuerzas electrostáticas y el potencial de Lennard-Jones. A su vez, se incluyen interacciones enlazantes: potenciales armónicos, ángulos de enlace y ángulos diedros. Las simulaciones de dinámica molecular se desarrollan en condiciones de temperatura y presión constantes, además se utilizan condiciones de frontera periódicas con la finalidad de simular un entorno muy grande, muy similar a la forma geométrica de un toroide. Simultáneamente, se utiliza la suma de Ewald para considerar las interacciones electrostáticas a largo alcance (Salo-Ahen y col., 2020).

En una simulación clásica de dinámica molecular se necesitan pasos de tiempo del orden de femtosegundos (10^{-15} segundos), para poder integrar correctamente las ecuaciones antes mencionadas (Barducci y col., 2011). Durante el curso de la simulación la información de los estados a lo largo del tiempo se almacena en una trayectoria para su análisis posterior. Existen muchos paquetes de software para realizar simulaciones y análisis de dinámica molecular, como: GROMACS, DESMOND, AMBER, NAMD y CHARMM (Salo-Ahen y col., 2020).

Sin embargo, los resultados de análisis de las simulaciones de dinámica molecular sólo son significativos cuando el sistema es ergódico, es decir, que el tiempo de ejecución es lo suficientemente extenso como para simular todos los posibles escenarios que son energéticamente relevantes, aunque esto no siempre es el caso, puesto que pueden existir barreras de alta energía libre, esto quiere decir que aunque pudiesen existir múltiples estados metaestables, la transición puede requerir de mucha energía para superarlas. Dichos estados metaestables ocurren con poca frecuencia y pueden requerir de mucho tiempo de simulación al llegar muy lento a esta configuración, por lo que la obtención de datos significativos tendría un alto costo computacional (Barducci y col., 2011). Por lo tanto, los análisis de dinámica molecular se ven afectados por la variable temporal, debido a estos inconvenientes se han desarrollado diferentes métodos que permitan superar la escala del tiempo, como el *Umbrella sampling*, *replica-exchange*, *molecular dynamics*, *free-energy dynamics*, *milestoning*, *weighted ensemble* y metadinámica (Blumer y col., 2024).

II.5.1 Metadinámica

La metadinámica es un método que facilita el muestreo mediante la introducción de un potencial de sesgo al hamiltoniano del sistema (función de las ecuaciones de movimiento), dicho sesgo cambia a medida que la simulación avanza. Se trata de una fuerza artificial que se aplica sólo a ciertos grados de libertad, comúnmente denominados como variables colectivas (CV). Esto le permite al sistema explorar ciertos estados que de otro modo no son accesibles y “escapar” de mínimos de energía. El éxito en una simulación metadinámica depende en gran medida de una buena elección de las CV (Barducci y col., 2011; Baron, 2012).

El potencial de sesgo es construido mediante una suma de funciones gaussianas, que son depositadas a lo largo de la trayectoria del sistema en las CV, esto permite que cada vez que se visita un estado se deposita una gaussiana en dicho punto para evitar que el sistema “se quede atrapado” (Barducci y col., 2011).

La metadinámica es una técnica computacional aplicada en diversos campos científicos. Una de sus aplicaciones más relevantes está en el diseño de fármacos,

donde se utiliza para estudiar las interacciones entre ligandos y proteínas, permitiendo mejorar la afinidad de los compuestos y acelerando el descubrimiento de nuevos medicamentos (Bellera y Di Ianni, 2022).

II.5 Reposicionamiento de fármacos

El reposicionamiento de fármacos (*drug repurposing*, en inglés) se define como la estrategia de identificar nuevas indicaciones terapéuticas para medicamentos ya existentes, ya sean fármacos aprobados, abandonados, retirados o en etapas avanzadas de desarrollo. Este enfoque se fundamenta en la capacidad de aprovechar la información preexistente sobre la seguridad, la farmacocinética y el perfil estructural de las moléculas, lo que permite reevaluar y redirigir compuestos para tratar enfermedades distintas de las inicialmente previstas (Botella, 2022). Producir un nuevo fármaco aprobado para uso clínico lleva de 10 a 15 años y cuesta entre 1000 y 2000 millones de dólares, por lo cual el principal objetivo del reposicionamiento de fármacos es optimizar los recursos y acelerar el desarrollo terapéutico. Se han reportado candidatos farmacológicos exitosos, como el clorambucilo y la busulfán, desarrollados originalmente como agentes alquilantes derivados del gas mostaza, un agente químico tóxico empleado como arma de guerra, que posteriormente se demostraron su eficacia en el tratamiento de leucemias linfocíticas y mieloides crónicas (Schein, 2021). De manera similar, la talidomida, a pesar de sus antecedentes provocando malformaciones congénitas, se ha reutilizado en conjunto con sus parientes estructurales más potentes, la lenalidomida y la pomalidomida, para tratar el mieloma múltiple (Xia y col., 2024). Estos casos ilustran claramente el potencial del reposicionamiento de fármacos como estrategia para acortar los tiempos de desarrollo, reducir costos y aprovechar el conocimiento previo sobre seguridad y farmacocinética, lo que resulta especialmente relevante en la búsqueda de nuevas terapias para enfermedades complejas como el cáncer.

La integración de la química computacional constituye un pilar fundamental en el reposicionamiento. Mediante métodos *in silico*, tales como cribado virtual, acoplamiento molecular, modelos de relaciones cuantitativas estructura-

actividad (QSAR) y técnicas de inteligencia artificial, se pueden predecir con alta precisión las interacciones entre ligandos y dianas terapéuticas. El uso de estas herramientas posibilita el análisis de grandes bases de datos de compuestos, comparación de firmas moleculares y el establecimiento de correlaciones entre la estructura de un fármaco y su actividad biológica, lo cual facilita la identificación de nuevos usos para medicamentos existentes (Botella, 2022). Este enfoque computacional ha adquirido creciente relevancia en los últimos años gracias a la disponibilidad de grandes volúmenes de datos estructurales de proteínas y perfiles de actividad farmacológica, lo que permite sistematizar y acelerar el proceso de reposicionamiento. Dicha estrategia resulta particularmente valiosa ante las limitaciones del desarrollo farmacológico tradicional, caracterizado por elevados costos, prolongados plazos y bajas tasas de éxito, especialmente en oncología. En el contexto de la LLA, reposicionar un fármaco no solo reduciría significativamente el tiempo y los recursos necesarios para disponer de nuevas terapias, sino que también aumentaría las probabilidades de éxito clínico al partir de compuestos con perfiles de seguridad y farmacocinética previamente conocidos (Olivas-Aguirre y col., 2021; Pushpakom y col., 2019).

III. JUSTIFICACIÓN

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) constituye un reto crítico de salud pública, representando el 50% de los casos de cáncer reportados a nivel nacional en 2023. A pesar de los avances terapéuticos, la supervivencia se ve fuertemente limitada por la quimiorresistencia, impulsada en gran medida por la sobreexpresión de la bomba de eflujo MRP4, la cual reduce la acumulación intracelular de los quimioterapéuticos. Por ello, inhibir esta proteína es una estrategia indispensable para restaurar la eficacia de los tratamientos convencionales y evitar recaídas.

Dado que el desarrollo tradicional de nuevos medicamentos enfrenta costos elevados y tiempos prolongados (10 a 15 años), este trabajo plantea una solución eficiente mediante el uso de herramientas computacionales como el acoplamiento molecular, la dinámica molecular y simulaciones de metadinámica. Estas técnicas permiten realizar un cribado virtual masivo de productos naturales, así como explorar el reposicionamiento de fármacos ya aprobados. Al aprovechar moléculas con perfiles de seguridad y farmacocinética previamente caracterizados, se reduce drásticamente el tiempo y costo de investigación. Esta aproximación *in silico* ofrece una vía innovadora y viable para identificar inhibidores de MRP4, con el potencial de revertir la resistencia farmacológica y mejorar significativamente la supervivencia de los pacientes con LLA.

IV. OBJETIVOS

IV.1 Objetivo general

Identificar potenciales inhibidores de MRP4 mediante la comparación de un enfoque de acoplamiento molecular clásico y un protocolo optimizado empleando quimioinformática, aplicados sobre las bibliotecas *Natural Product Atlas* y *DrugBank*, dirigidos a la quimiorresistencia en leucemia linfoblástica aguda.

IV.2 Objetivos específicos.

- Identificar candidatos inhibidores de MRP4 a partir de la biblioteca *Natural Product Atlas* y la biblioteca *DrugBank* mediante acoplamiento molecular a gran escala, empleando un enfoque clásico basado en la priorización por calificación de unión (*docking score*).
- Identificar fármacos con potencial inhibitorio sobre MRP4 a partir de las bibliotecas antes mencionadas mediante reposicionamiento de fármacos, empleando un análisis de quimioinformática y *Ensemble docking*.
- Realizar un análisis comparativo entre ambos enfoques utilizados para seleccionar compuestos candidatos.
- Evaluar la estabilidad de los complejos MRP4-ligando de los candidatos prioritarios mediante simulaciones de dinámica molecular y determinar su perfil termodinámico de unión a través de metadinámica.
- Evaluar el perfil de interacciones, así como el perfil fisicoquímico y toxicológico *in silico* de los candidatos finales, con el fin de determinar su viabilidad como futuros candidatos a reposicionar.

V. METODOLOGÍA

V.1 Modelado por homología de MRP4

El modelado por homología de MRP4 se llevó a cabo utilizando el servidor público de Robetta, en el módulo de modelado comparativo. La secuencia de aminoácidos de MRP4 fue extraída de la base de datos UniProtKB (ID: O15439). Se utilizó la estructura Cryo-EM con PDB 8IZ7 para modelar la estructura utilizando los servidores Robetta e I-Tasser (Modelado basado en plantillas). A su vez se generaron modelos de *novo* empleando el servidor de AlphaFold 3 (Abramson y col., 2024; Kim y col., 2004; Yang y Zhang, 2015).

Se evaluó la calidad estructural de los modelos generados utilizando el servidor público MolProbity (Williams y col., 2018). Los parámetros seleccionados para el análisis de calidad fueron el z-score y los residuos favorecidos en el diagrama de Ramachandran (Chen y col., 2009).

V.2 Enfoque clásico

V.1.1 Filtrado de la biblioteca *Natural Product Atlas*

La biblioteca para la búsqueda de nuevos compuestos se descargó en formato CSV desde la base de datos NPA (Poynton y col., 2025). Para su procesamiento, se emplearon las herramientas OpenBabel versión 2.4.0 y RDKit versión 2024.09.4, integradas en un entorno de trabajo gestionado mediante el software Anaconda versión 24.9.2 (Anaconda Software Distribution, 2016; Landrum y col., 2024; O'Boyle y col., 2011).

La biblioteca se depuró seleccionando moléculas en un rango de peso molecular ($250 \text{ Da} < \text{MW} < 2000 \text{ Da}$). A continuación, se extrajo el código SMILES de cada molécula, al cual se le añadieron hidrógenos. Posteriormente, se generó una conformación tridimensional inicial utilizando un máximo de 10,000 intentos con el generador ETKDGv3 (Riniker y Landrum, 2015). La conformación más estable resultante fue optimizada mediante la aplicación del campo de fuerza MMFF94 (*Merck Molecular Force Field*), con un máximo de 5,000 iteraciones (Hendrickson,

1961). Este proceso generó un modelo de minimización energética reproducible mediante un número aleatorio (semilla) para asegurar aleatoriedad controlada.

Las estructuras optimizadas se guardaron en formato MOL2 con un identificador único y se organizaron para su uso futuro. Este proceso se realizó de forma iterativa para cada molécula utilizando un script en Python integrado con pandas y ejecutado a través de Anaconda Prompt (The pandas development team, 2024; Van Rossum y Drake, 2025).

De igual manera las moléculas EBD9, EBD14, SHC-2-1 y SHC2-2, fueron procesadas mediante el flujo de trabajo del script de Python descrito con anterioridad para el posterior uso de las estructuras tridimensionales.

V.2.1 Filtrado de la biblioteca de *DrugBank*

La biblioteca para el reposicionamiento de fármacos fue descargada de la base de datos de *DrugBank* (DB) (Knox y col., 2024), en formato SDF, las estructuras tridimensionales se abrieron empleando el software Schrödinger-Maestro 2021.4 (Schrödinger, 2025). La biblioteca se depuró seleccionando moléculas con un peso molecular adecuado ($250 \text{ Da} < MW < 2000 \text{ Da}$), descartando aquellas moléculas que contengan metales para la formación de los complejos proteína-ligando.

V.3.1 Construcción de los complejos proteína-ligando

Se construyó una zona de búsqueda (*gridbox*) utilizando AutoGrid4 con la delimitación del espacio tridimensional donde el ligando interactuaría con el receptor. Se consideró un tamaño de $100 \times 100 \times 100$ puntos centrada en los residuos His152, Phe156, Phe324, Leu363, Leu367, Phe368, Arg946, Gly991, Met992, Gln994, Trp995 y Arg998, los cuales han sido previamente reportados como parte del sitio de unión a inhibidores (El-Sheikh y col., 2007; Hernández Castro, 2024; Huang y col., 2023), ubicados en las coordenadas $x= 137.4$, $y= 132.33$ y $z= 129.68$. Los acoplamientos moleculares se llevaron a cabo con AutoDock-GPU 1.5.3, realizando 100 corridas con 100 millones de evaluaciones, empleando un algoritmo genético lamarckiano y el algoritmo de búsqueda local Solis-Wets (Morris y col., 2009; Santos-Martins y col., 2021). Se procesaron ambas bibliotecas (NPA y DB)

para obtener los tres complejos con mejor *docking score* para cada biblioteca. Se tomaron en cuenta algunas consideraciones para la selección de moléculas con características favorables para las simulaciones posteriores: para la biblioteca NPA se descartaron moléculas peptídicas y para la biblioteca DB se excluyeron aquellos fármacos en fases experimentales, con actividad en el sistema nervioso central y antibióticos.

Así mismo se obtuvieron los valores de *docking score* de los complejos proteína-ligando para las moléculas EBD9, EBD14, SHC-2-1 y SHC2-2, mismos que fueron utilizados para realizar simulaciones de dinámica molecular.

V.4.1 Dinámica molecular de los complejos MRP4-Ligandos

Los complejos de los ligandos seleccionados fueron cargados en Schrödinger-Maestro 2021.4 para evaluar la unión proteína-ligando. Posteriormente, se realizaron simulaciones de dinámica molecular de 100 ns por diana, utilizando una topología *all-atom* y las condiciones de simulación descritas a continuación.

Para este propósito se utilizó el módulo Desmond (Armstrong, 2006). Inicialmente, se construyó el sistema utilizando el módulo *System Builder* en Desmond, configurando una caja ortorrómbica de dimensiones 20x20x25 Å calculadas mediante el método de buffer. El sistema incluyó una membrana heterogénea de POPC, solvatación explícita con agua (TIP3P) y una concentración de NaCl de 0.15 M para neutralizar el sistema. Posteriormente, se realizaron simulaciones de dinámica molecular utilizando el módulo *Molecular Dynamics* en Desmond. Estas simulaciones se llevaron a cabo bajo un ensamble isotérmico-isobárico (NPT) a 310.15 K y 1.01325 bar, empleando el campo de fuerza OPLS-2005, esto permitió replicar un entorno cercano a condiciones fisiológicas.

Al finalizar las simulaciones, se realizó un análisis de agrupamiento (*clustering*) en el módulo *Trajectory Clustering* en Desmond. Este análisis permitió identificar la estructura más representativa del clúster más numeroso (C1) del complejo. Este fue obtenido para los ligandos de ambas bibliotecas, así como para los ligandos EBD9,

EBD14, SHC-2-1 y SHC2-2, cuyos clústeres fueron posteriormente utilizados en estudios de metadinámica.

V.5.1 Cálculo de la energía teórica de unión.

A partir del C1 obtenido de las simulaciones de todos los ligandos, se construyó el sistema para calcular la afinidad teórica mediante simulaciones de metadinámica, en una caja ortorrómbica de 30x30x30 Å calculado mediante el método de buffer. Posteriormente se realizó una simulación de 25 ns en el módulo *Metadynamics* en Desmond, donde la variable colectiva fue el centro de masa del ligando y el centro de masa de los residuos a una distancia de 5 Å del ligando. Los parámetros del protocolo Gaussiano incluyeron un *height* de 0.3 kcal/mol, *width* de 0.1 Å y un *wall* de 25 Å. La simulación se realizó en un ensamble NPT a 310.15 K y 1.01325 bar. El análisis de la metadinámica se realizó en el módulo *Metadynamics* análisis en Desmond.

V.3 Enfoque optimizado

V.1.1 Depuración Quimioinformática y Optimización Multiparamétrica

Ante la identificación de perfiles fisicoquímicos y toxicológicos (ADME-Tox) desfavorables en la primera selección de ligandos analizados, el protocolo de screening requirió la implementación de una estrategia de selección mucho más estricta. Este nuevo nivel de filtrado se fundamentó en el cálculo de descriptores moleculares a partir de la notación SMILES, con el propósito explícito de purgar las estructuras con propiedades indeseables y asegurar que los candidatos finales tuvieran un perfil óptimo de similitud a fármaco (*drug-likeness*).

Asimismo, para evaluar el *docking score* obtenido en el acoplamiento molecular (sección 4.2.3) sin el sesgo relacionado con el peso molecular, los puntajes se normalizaron mediante el índice de Eficiencia de Ligando Independiente del Tamaño (SILE), garantizando una comparación equitativa.

La automatización de este análisis se implementó mediante un *script* en Python 3.13 a través de Google Colab. Utilizando la biblioteca Pandas, se estructuraron los datos de la quimioteca inicial (que incluían la notación SMILES y el *docking score*). A partir

de los SMILES, se calculó un panel de descriptores moleculares para cada compuesto, el cual incluyó: el Índice de Eficiencia de Ligando Independiente del Tamaño (*SILE*), el peso molecular, la Estimación Cuantitativa de Similitud a Fármaco (*QED*), la Accesibilidad Sintética (SA_{score}), así como el número de enlaces rotables y de anillos aromáticos (Bickerton y col., 2012; Ertl y Schuffenhauer, 2009; Landrum y col., 2025; Nissink, 2009).

El protocolo de depuración estructural se ejecutó mediante la biblioteca RDKit, aplicando de manera secuencial los filtros de exclusión Brenk, NIH y PAINS (Baell y Holloway, 2010; Pearce y col., 2006). Tras este tamizaje, se retuvo exclusivamente el subconjunto de compuestos libres de alertas toxicológicas o de promiscuidad. Para jerarquizar a estos candidatos viables, se implementó un modelo de Optimización Multiparamétrica (MPO) que integró los valores normalizados de las siguientes variables: *Docking Score*, SA_{score} , *SILE*, *QED*, número de enlaces rotables y número de anillos aromáticos. Los coeficientes de ponderación del modelo se ajustaron empíricamente en función de la naturaleza química de cada base de datos, dando lugar a las Ecuaciones 5 y 6:

$$MPO_{NPA} = (0.425 \cdot DS_{norm}) + (0.2 \cdot QED) + (0.15 \cdot SA_{norm}) \dots$$

$$\dots + (0.10 \cdot SILE_{norm}) + (0.10 \cdot S_{anillos}) + (0.025 \cdot ER_{norm}) \quad (5)$$

$$MPO_{DB} = (0.6 \cdot DS_{norm}) + (0.10 \cdot QED) + (0.10 \cdot SA_{norm}) \dots$$

$$\dots + (0.05 \cdot SILE_{norm}) + (0.15 \cdot S_{anillos}) + (0.05 \cdot ER_{norm}) \quad (6)$$

Finalmente se seleccionaron las 1000 moléculas que tenían el mayor puntaje de MPO para el análisis de *Ensemble Docking*.

V.2.1 Validación del método de acoplamiento

Para la validación retrospectiva del protocolo computacional fue requerida la generación de moléculas señuelo (*decoys*), las cuales fueron construidas bajo los estrictos criterios fisicoquímicos y topológicos descritos por Cereto-Massagué y col. (2012). Para prevenir un enriquecimiento artificial derivado de sesgos físicos, se garantizó que los señuelos compartieran cinco descriptores clave con su respectivo

ligando de referencia: peso molecular, coeficiente de partición octanol-agua ($\log P$), número de donadores y aceptores de puentes de hidrógeno, y enlaces rotables. Simultáneamente, para asegurar su viabilidad como verdaderos negativos, se forzó una disimilitud química estableciendo un umbral máximo en el coeficiente de Tanimoto de 0.75 respecto al inhibidor activo. Asimismo, se aplicó un umbral de Tanimoto de 0.90 entre los propios señuelos para evitar la redundancia estructural, empleando como *fingerprint MACCS-Keys*. Bajo este escrutinio, a partir de la notación SMILES de los ligandos cocrystalizados se extrajeron 50 *decoys* por cada uno de la biblioteca de ChemBL, conformando una quimioteca de validación cruzada de 153 moléculas que se acopló contra las tres dianas farmacológicas principales: 8IZ7, 9KRM y 8ZBU (Huang y col., 2023; X. Wen y col., 2025; Z. Xie y col., 2025).

Finalmente, para suprimir el sesgo asociado al tamaño molecular durante la evaluación de estas predicciones, se empleó el valor SILE en lugar del puntaje de *docking score*. Utilizando esta métrica normalizada, se calcularon los Factores de Enriquecimiento (EF) y se construyeron curvas de Características Operativas del Receptor (ROC) para las tres dianas principales, integrando escalas lineales y logarítmicas. Por el contrario, dado que la diana 8IZ9 representa únicamente el estado de transporte endógeno y no un blanco de inhibición competitiva farmacológica, fue excluida del análisis ROC cruzado (Pourmal y col., 2024). Su evaluación se limitó al acoplamiento de la PGE1 y sus 50 *decoys* exclusivos, analizando su capacidad de discriminación basal mediante un gráfico de distribución de frecuencias (tipo campana) basado en los valores de SILE (Nissink, 2009).

V.3.1 Ensemble *Docking*

Debido a la alta tasa de cambios conformacionales que caracteriza a las bombas de eflujo ABC, se implementó una estrategia de acoplamiento molecular por ensamble (*ensemble docking*). Esta aproximación permitió muestrear el espacio conformacional de MRP4 frente a diferentes clases de ligandos. Para ello, se seleccionaron tres estructuras resueltas por criomicroscopía electrónica (Cryo-EM) de relevancia farmacológica: dos conformaciones unidas a inhibidores (8IZ7 con sulindac y 8ZBU con lapatinib) y una unida a un sustrato exógeno (9KRM con

metotrexato). La inclusión de la estructura 9KRM es crítica para el diseño racional, ya que el objetivo central del tamizaje es identificar inhibidores competitivos capaces de desplazar al metotrexato (un antineoplásico fundamental en el tratamiento de la leucemia) uniéndose a la cavidad con mayor afinidad y previniendo su eflujo celular. Adicionalmente, se incluyó la estructura 8IZ9 (unida al sustrato endógeno PGE1) con el propósito exclusivo de explorar topológicamente la cavidad en su estado fisiológico basal (Huang y col., 2023; X. Wen y col., 2025; Z. Xie y col., 2025).

La definición del sitio de unión se realizó en el módulo *Receptor Grid Generation* del software Maestro (Schrödinger), obteniendo las coordenadas de una caja de simulación de 20 x 20 x 20 Å centrada en los residuos clave: Phe324, Leu367, Phe368, Arg946, Gln994, Trp995 y Arg998 (Bloch y col., 2023). Las simulaciones de acoplamiento se ejecutaron con el motor GNINA v1.2.3 (McNutt y col., 2025), estableciendo una exhaustividad de 16 y la generación de 3 poses por ligando. Los cálculos se procesaron mediante un *script* automatizado en Google Colab soportado por una unidad de procesamiento gráfico (GPU) NVIDIA L4, exportando las coordenadas tridimensionales en formato SDF y los parámetros termodinámicos en un archivo CSV.

V.4.1 Filtrado post-acoplamiento y análisis de interacciones

El procesamiento masivo de los resultados de acoplamiento se automatizó mediante un flujo de trabajo en Python implementado en Google Colab. A partir de los 1,000 ligandos que superaron la optimización multiparamétrica (MPO), se extrajo la pose con el mejor *docking score* calculado por GNINA en cada complejo, determinando simultáneamente su respectivo valor de SILE. Considerando que la conformación 8IZ7 demostró el mayor rendimiento predictivo durante la validación retrospectiva, sus resultados se establecieron como el marco de referencia primario. Sobre esta diana, se aplicaron dos criterios de exclusión rigurosos: el descarte de moléculas con un *docking score* superior a -8.5 kcal/mol y la eliminación de ligandos con un SILE inferior a 2.5, en concordancia con los puntos de corte de los verdaderos positivos del protocolo de validación de *ensemble docking*. Este tamizaje inicial redujo la quimioteca a los 150 ligandos más prometedores, un

tamaño de muestra matemáticamente justificado por el análisis logarítmico de la curva ROC, el cual garantizó una tasa de enriquecimiento (EF) significativamente superior al azar en este percentil.

Con el objetivo de asegurar que el acoplamiento de estos 150 ligandos no fuera un artefacto de una conformación aislada, sino un comportamiento de estabilidad de consenso, la evaluación se expandió a todo el espacio conformacional evaluado de MRP4. Para ello, se calculó la media y la desviación estándar tanto del SILE como del puntaje de red neuronal convolucional (*CNN score* de GNINA) a través de las cuatro estructuras estudiadas (8IZ7, 9KRM, 8ZBU y 8IZ9) (Huang y col., 2023; McNutt y col., 2025; X. Wen y col., 2025; Z. Xie y col., 2025). Los compuestos se jerarquizaron priorizando una media de SILE elevada con una desviación mínima, garantizando así un anclaje consistente independientemente del estado de la bomba de eflujo (Nissink, 2009).

Posteriormente, la validación de los contactos intermoleculares de las moléculas jerarquizadas se automatizó mediante la biblioteca ProLIF en el entorno de Google Colab (Bouysset y Fiorucci, 2021). A través de este análisis, se extrajo un perfil de interacciones bidimensional para las tres poses generadas en todas las dianas, construyendo una matriz binaria de contactos. Este filtro evaluó específicamente la presencia de interacciones con un panel de residuos críticos para la unión: Lys106, His152, Phe324, Leu363, Leu367, Phe368, Arg946, Met992, Gln994, Trp995 y Arg998 (Bloch y col., 2023; Huang y col., 2023; Pourmal y col., 2024; X. Wen y col., 2025; Z. Xie y col., 2025). Dentro de este perfil de reconocimiento, se estableció como criterio crucial e indispensable la formación de un anclaje hidrofóbico mediante acoplamiento pi-pi (*pi-stacking*) con el residuo Trp995, emulando el mecanismo de interacción esencial de los inhibidores de referencia.

Finalmente, los candidatos que cumplieron con esta estricta matriz de contactos farmacofóricos fueron sometidos a una evaluación tridimensional mediante el servidor PLIP (*Protein-Ligand Interaction Profiler*) (Salentin y col., 2015). La selección definitiva de las tres mejores estructuras de cada quimioteca (NPA y DB) se llevó a cabo mediante la inspección de las interacciones relevantes. Este

escrutinio de consenso integró la estabilidad del acoplamiento en las cuatro conformaciones, la consistencia del *CNN score* y la solidez geométrica de la red de interacciones no covalentes. Las moléculas que superaron este riguroso tamizaje estructural fueron designadas como los candidatos finales, procediendo a la fase de estudio mediante simulaciones de Dinámica Molecular para corroborar su estabilidad temporal en un entorno explícito.

V.5.1 Simulación de Dinámica molecular

Para llevar a cabo las simulaciones de Dinámica Molecular, fue necesario preparar los complejos proteína-ligando, utilizando una estructura completa del transportador MRP4. Por este motivo, se sustituyeron las estructuras Cryo-EM por el modelo tridimensional generado en Robetta (modelo 2), cuya construcción y validación se describen en la sección 4.1. El acoplamiento de los ligandos finales en este modelo se realizó aplicando exactamente los mismos parámetros y configuración descritos previamente en el protocolo de la sección 4.2.4.

V.4 Simulaciones de metadinámica

Para las simulaciones de metadinámica se empleó el protocolo descrito en la sección 4.2.5. Posteriormente se realizó el análisis del mapa FES (Free Energy Surface) para determinar la posición del ligando en conjunto con su trayectoria, finalmente se calculó la energía libre de unión de cada uno de los ligandos.

V.5 Perfil toxicológico y propiedades farmacocinéticas

Los ligandos estudiados fueron evaluados en cuanto a su perfil de seguridad *in silico*, con el fin de predecir efectos adversos o toxicidad. Para ello, se utilizó la herramienta RDKit, Matplotlib y Seaborn para el cálculo y elaboración de gráficos (Hunter, 2007; Landrum y col., 2025; Pajankar, 2022).

A su vez se realizó un análisis de las propiedades *DrugLikeness* y utilizando el servidor SwissADME (Daina y col., 2017) y se evaluó su toxicidad oral e inhibición de citocromos utilizando el servidor ProTox 3.0 (Banerjee y col., 2024).

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VI.1 Modelado por homología de MRP4

Se generaron cinco modelos tridimensionales de MRP4 utilizando tres servidores de modelado por homología: Alpha Fold, I-Tasser y Robetta, como se muestra en la Tabla 2. La calidad estructural de los modelos obtenidos fue evaluada mediante el análisis del diagrama de Ramachandran y el cálculo del parámetro estadístico Z-score (Rama-Z), parámetros utilizados para validar tanto la calidad estereoquímica como la viabilidad energética global del modelo (Binbay y col., 2023).

Tabla 2. Calidad de los modelos de MRP4 generados por diferentes servidores.

Método	Servidor	No.	Valores de Ramachandran		
			Atípicos	Favorecidos	Z-score
De novo	Alpha Fold Server (AlphaFold 3)	1	0.23 %	96.83 %	0.57 ± 0.21
		2	0.45 %	96.90 %	0.50 ± 0.21
		3	0.53 %	96.83 %	0.56 ± 0.21
		4	0.60 %	96.60 %	0.48 ± 0.21
		5	0.83 %	95.99 %	0.45 ± 0.21
Basado en plantillas	I-Tasser	1	4.84 %	87.38 %	-3.22 ± 0.19
		2	4.99 %	86.62 %	-2.88 ± 0.21
		3	5.14 %	87.76 %	-2.76 ± 0.20
		4	5.59 %	86.32 %	-2.98 ± 0.20
		5	5.52 %	85.94 %	-3.29 ± 0.20
	Robetta	1	0.15 %	98.41 %	1.74 ± 0.22
		2	0.00 %	98.79 %	1.48 ± 0.22
		3	0.30 %	98.26 %	1.22 ± 0.22
		4	0.00 %	98.49 %	1.26 ± 0.22
		5	0.15 %	97.66 %	1.49 ± 0.23

El análisis comparativo evidenció diferencias significativas entre las metodologías empleadas. Dentro del enfoque basado en plantillas, el servidor Robetta demostró una superioridad notable frente a I-Tasser. Los modelos generados por Robetta presentaron los porcentajes más altos de residuos en regiones favorecidas (97.66–98.79 %), así como una proporción mínima o nula de residuos atípicos (0.00–0.30 %). Estos valores superan los criterios comúnmente aceptados para modelos estructuralmente confiables (>90 % de residuos en regiones favorecidas), lo que nos indica que la conformación proteica es altamente probable y con mínimas tensiones estéricas (Binbay y col., 2023).

En contraste, los modelos obtenidos con I-Tasser mostraron una calidad inferior, con porcentajes de residuos en regiones favorecidas que oscilan entre el 85.94 % y 87.76 %, y una incidencia de valores atípicos cercana al 5 %, lo que indica posibles desviaciones geométricas relevantes.

El z-score, también llamado Rama-z, es una medida estadística que evalúa la calidad de la estructura tridimensional de una proteína, específicamente la distribución de sus ángulos diedros (ϕ , ψ) de la columna vertebral de la proteína en comparación con estructuras de referencia de alta resolución (Sobolev y col., 2020).

De manera particular los Z-scores de los modelos de Robetta indican una alta congruencia con estructuras proteicas nativas, esto sugiere un plegamiento globalmente más realista y energéticamente estable. Todo lo contrario, a los valores negativos de I-Tasser, que indican desviaciones estructurales significativas.

Por otra parte, dentro del enfoque de modelado *de novo*, los modelos generados mediante AlphaFold (AlphaFold 3) mostraron un desempeño sobresaliente en términos de calidad local, con porcentajes elevados de residuos en regiones favorecidas (95.99 - 96.90 %) y una baja proporción de residuos atípicos (<1 %). Estos resultados indican una geometría favorable y distribución angular consistente con conformaciones estables.

Adicionalmente, los valores de Z-score obtenidos respaldan una precisión estructural confiable. No obstante, en comparación con los mejores modelos

generados por Robetta, los resultados indican que este servidor logró optimizar de manera más eficiente los ángulos diedros de la cadena principal para la secuencia de MRP4, particularmente en términos de calidad estereoquímica global.

Entre los modelos generados por Robetta, el modelo 2 presentó el perfil más favorable, al combinar ausencia total de residuos atípicos, el mayor porcentaje de residuos favorecidos (98.79 %) y un Z-score elevado (1.48 ± 0.22). En conjunto, estos parámetros lo posicionan como el modelo estructural más confiable dentro del conjunto analizado, constituyendo la mejor aproximación tridimensional de MRP4, los diagramas de cada modelo se presentan en la sección de Anexos (9.1).

La validación del modelo 2 generado por el servidor Robetta se realizó mediante el análisis del diagrama de Ramachandran (Figura 9), herramienta ampliamente reconocida para la evaluación estereoquímica de modelos proteicos. El diagrama de Ramachandran es una representación bidimensional de los ángulos diedros ϕ (phi) y ψ (psi) del esqueleto peptídico, los cuales describen la rotación alrededor de los enlaces N-C α y C α -C', respectivamente. En este gráfico se muestran las combinaciones de dichos ángulos que están permitidas o prohibidas energéticamente, debido a restricciones estéricas impuestas por los radios de *van der Waals* y la repulsión entre átomos no enlazados de la cadena polipeptídica (Ramachandran y col., 1963).

Este análisis constituye un criterio estándar de validación estructural que evalúa la viabilidad conformacional del modelo mediante la distribución de los ángulos diedros de cada residuo, donde las regiones favorecidas corresponden a las conformaciones de mínima energía características de las estructuras secundarias predominantes, como hélices alfa y láminas beta. Además, el diagrama presenta zonas denominadas permitidas, las cuales muestran una menor frecuencia estadística, pero siguen siendo estereoquímicamente aceptables (Lovell y col., 2003).

En la Figura 9 se observa que el 98.79 % de los residuos del modelo se agrupan dentro de las regiones delimitadas por los contornos azul claro, correspondientes a las zonas energéticamente más favorables para los ángulos ϕ (phi) y ψ (psi). Esto

sugiere una adecuada calidad geométrica del modelo. De acuerdo con criterios comúnmente aceptados para modelos estructurales confiables, un porcentaje superior al 90–95 % de residuos en regiones favorecidas es indicativo de una correcta calidad estereoquímica. La ausencia de residuos en regiones no permitidas respalda la idoneidad estructural del modelo (Binbay y col., 2023).

No obstante, si bien la proporción de residuos en regiones favorecidas y la ausencia de valores atípicos suele considerarse el estándar de oro en la validación estructural, esta no debe limitarse exclusivamente a este parámetro. Es fundamental complementar el análisis con la evaluación de posibles desviaciones respecto a las distribuciones angulares esperadas (z-score), con el fin de garantizar la robustez del modelo tridimensional (Sobolev y col., 2020). En conjunto, los resultados obtenidos a partir del diagrama de Ramachandran del modelo 2 de Robetta presenta una distribución angular consistente con las conformaciones observadas en estructuras proteicas de alta resolución, lo que respalda su idoneidad para las simulaciones.

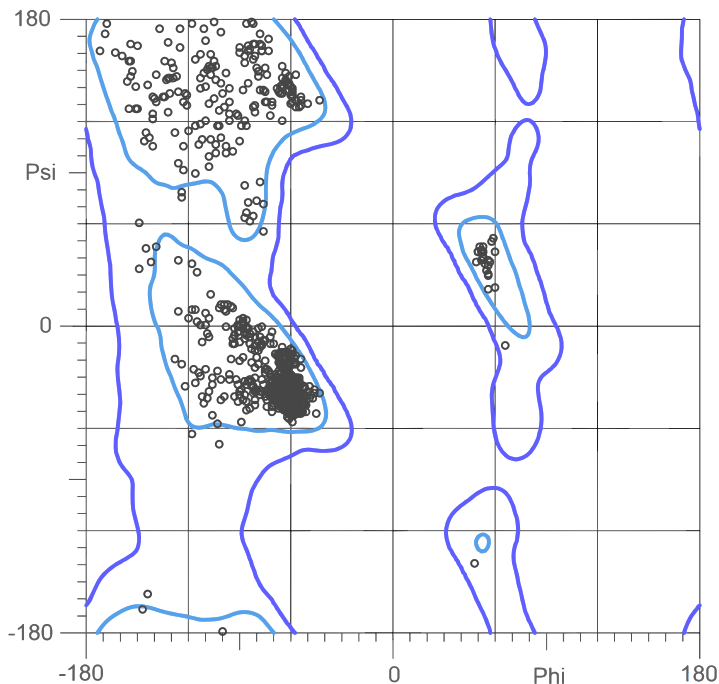


Figura 9. Diagrama de Ramachandran del modelo seleccionado.

VI.2 Enfoque clásico

VI.1.1 Acoplamiento molecular a gran escala

El acoplamiento a gran escala se ha consolidado como una herramienta esencial en el diseño de fármacos asistido por computadora, especialmente en la exploración de grandes bibliotecas de compuestos de manera eficiente y rentable. En particular, el acoplamiento molecular a gran escala realizado con las bibliotecas NPA y *DrugBank* permitió identificar compuestos que presentaron una mayor estabilidad en el complejo formado con el transportador MRP4. Asimismo, la selección de estas bibliotecas favoreció la exploración de dos enfoques distintos en el descubrimiento de nuevos fármacos: la innovación estructural basada en productos naturales y el reposicionamiento de fármacos. Para ello, se implementó un protocolo robusto de acoplamiento molecular basado en AutoDock-GPU, que incluyó múltiples corridas independientes y un elevado número de evaluaciones energéticas. Con el fin de incrementar la confiabilidad de los resultados obtenidos.

Los resultados del cribado inicial de ambas bibliotecas se resumen en la Tabla 3, donde se comparan los valores de *docking score* obtenidos.

Tabla 3. Resultados del acoplamiento molecular.

Origen	Nombre	Score (Kcal / mol)
Control	Ceefourin-1	-6.54
	Sterhirsutina H	-14.01
Natural Product Atlas	Sterhirsutina I	-15.00
	MC-031	-14.37
	Albendazol	-31.29
DrugBank	Lifitegrast	-11.89
	Avatrombopag	-11.83

En el caso de la biblioteca NPA, los compuestos seleccionados fueron: NPA011832, NPA020635 y NPA018626 (Figura 10), los cuales presentaron valores de score significativamente más negativos que el control.

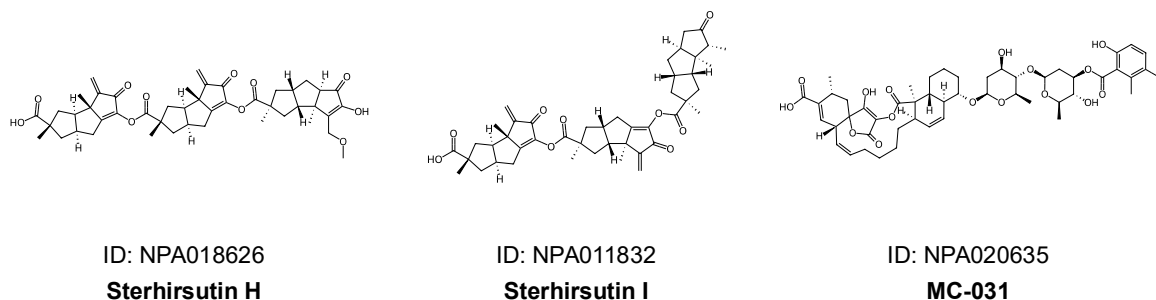


Figura 10. Estructuras químicas 2D de los ligandos seleccionados de *Natural Product Atlas*.

Por otro lado, para la selección de los mejores candidatos de la biblioteca *DrugBank* fue necesario aplicar criterios adicionales de filtrado, descartando aquellas moléculas que se encontraban en fase experimental, antibióticos o bien, presentaran efectos sobre el sistema nervioso central. Tras la eliminación de estas moléculas, se seleccionaron los fármacos con los valores de score más favorables, en donde destacan el albendazol, lifitegrast y Avatrombopag (Figura 11).

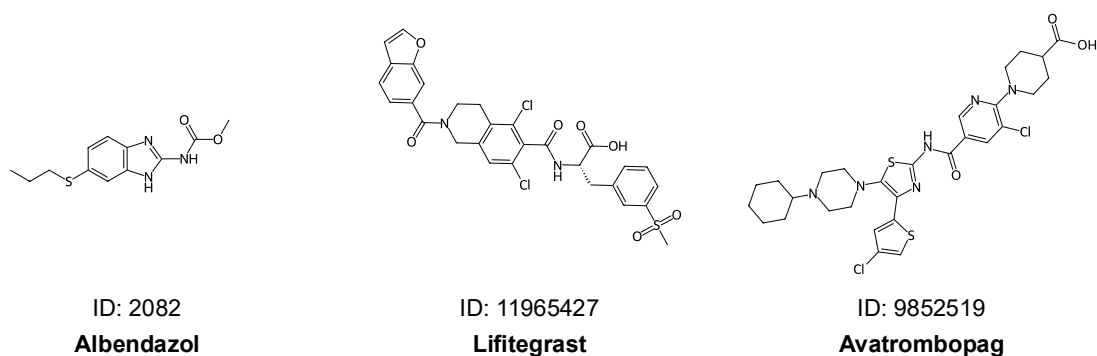


Figura 11. Estructuras químicas 2D de los ligandos seleccionados de *DrugBank*.

VI.2.1 Simulaciones de Dinámica molecular

VI.2.1.1 Complejo MRP4-Ceefourin-1

La estabilidad de los complejos proteína-ligando se evaluó mediante el análisis de los gráficos RMSD. (*Root Mean Square Deviation*). La Figura 12 corresponde al análisis RMSD del control ceefourin-1, en donde, se observa que la proteína presenta una fase inicial de equilibrio durante los primeros nanosegundos de la simulación; sin embargo, es a partir de los 20 ns cuando alcanza un estado de mayor estabilidad estructural, manteniéndose alrededor de 4.5 Å.

Por otra parte, el ligando exhibe fluctuaciones más pronunciadas en comparación con la proteína, particularmente alrededor de los 20 y 80 ns. Estas variaciones son indicativas de la flexibilidad del ligando dentro del sitio activo y sugieren que la molécula explora diferentes estados conformacionales con el fin de optimizar sus interacciones con los residuos que conforman el sitio de unión.

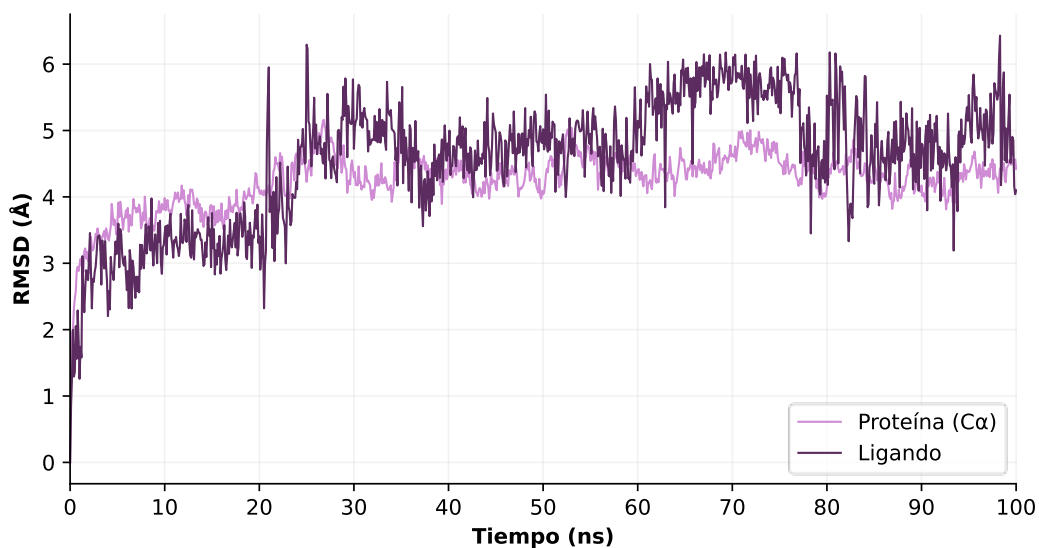


Figura 12. Gráfica RMSD del complejo MRP4-ceefourin-1.

Los análisis de las interacciones proteína-ligando reportadas previamente para MRP4, mediante análisis mutacionales, así como a través de estudios de cryo-EM,

han revelado que ciertos aminoácidos del sitio de unión participan en la estabilización de distintos inhibidores evaluados: lapatinib, sulindac y dipiridamol.

El residuo His152 estabiliza ligandos con sistemas aromáticos mediante interacciones π -*stacking*. En particular, el conjunto de residuos Phe324, Leu363, Leu367 y Phe368 establece principalmente interacciones hidrofóbicas. La recurrencia de estas interacciones sugiere que dichos residuos desempeñan un papel relevante en la estabilización de ligandos lipofílicos, así como en la orientación adecuada de los inhibidores dentro del sitio de unión.

Adicionalmente, se identificó la importancia de los residuos Met992 y Trp995, mientras que la Met992 participa principalmente en interacciones hidrofóbicas, el residuo Trp995 resulta clave para anclar tanto inhibidores como sustratos, dada su capacidad de generar interacciones hidrofóbicas y π -*stacking* (Huang y col., 2023; Z. Xie y col., 2025).

Estudios de mutagénesis dirigida han demostrado la importancia estructural del Trp995 en la coordinación y reconocimiento de ligandos dentro de la cavidad central del transportador. La sustitución por alanina (W995A) disminuyó drásticamente la actividad de transporte de sustratos; a su vez, aunque las mutaciones conservativas W995F y W995Y mantuvieron el carácter aromático, estas sustituciones provocaron una disminución significativa del transporte de todos los sustratos en comparación con la variante silvestre de MRP4 (Wittgen y col., 2012).

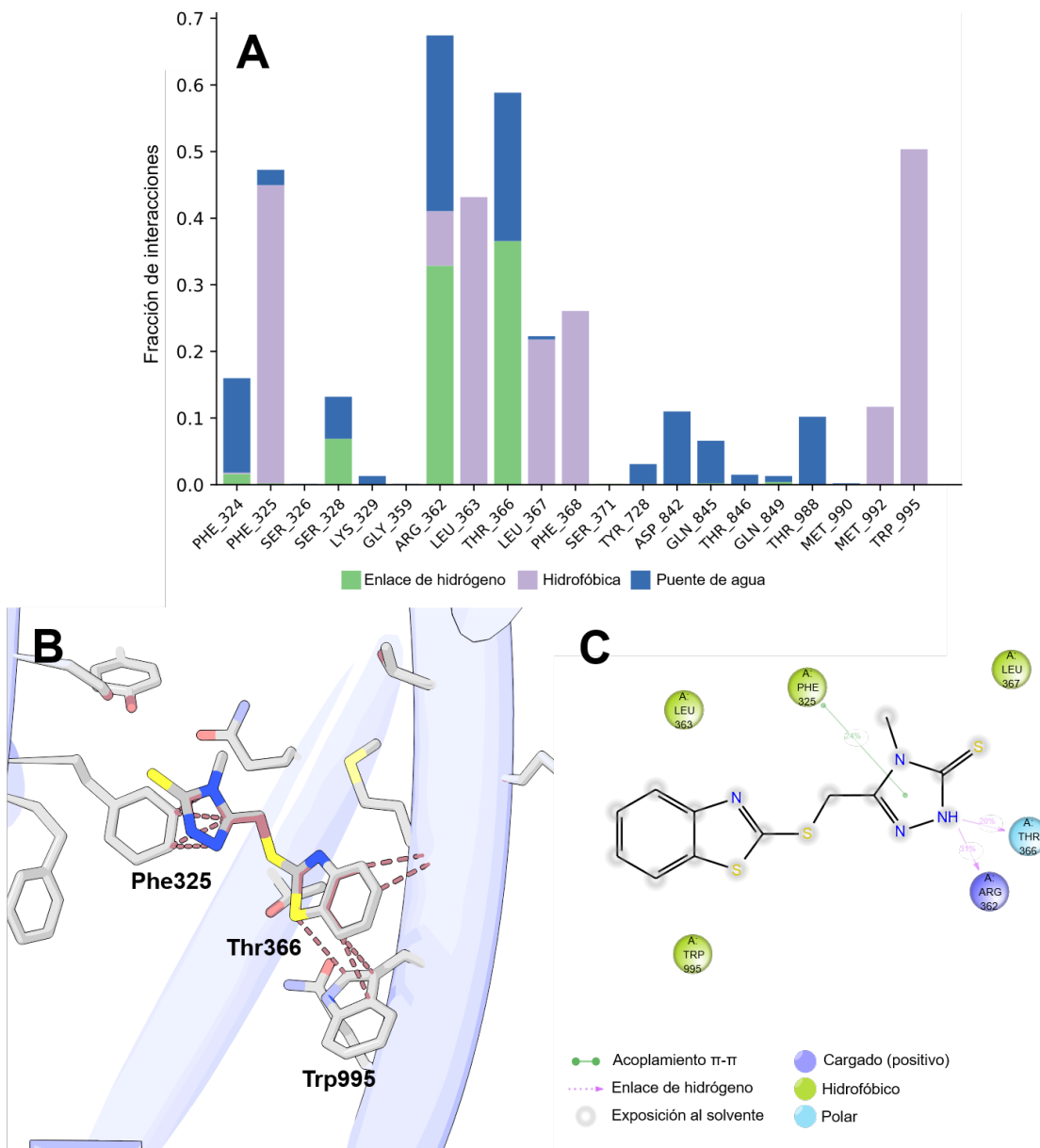
Los estudios de cryo-EM y de modelado molecular han revelado que el Trp995 se localiza en la interfaz de los dos dominios transmembrana (TMDs), proyectando su cadena lateral de indol hacia la cavidad hidrofóbica del sitio de unión. Esta ubicación es crítica debido a los movimientos de rotación y traslación que experimenta la hélice transmembrana TM12 durante la transición entre las conformaciones orientadas hacia el interior y hacia el exterior (Bloch y col., 2023). Esta disposición espacial sugiere que el Trp995 contribuye a estabilizar la interacción del sustrato dentro del sitio de unión, facilitando su correcta orientación antes del proceso de translocación.

La interacción cooperativa entre Phe368 y Trp995 resulta particularmente relevante, ya que ambos residuos se encuentran posicionados en hélices transmembrana opuestas dentro de la cavidad del transportador. Este arreglo estructural podría actuar como una "pinza" hidrofóbica que contribuye a la estabilización de los sustratos dentro del bolsillo de unión y a su posterior desplazamiento durante el ciclo conformacional (Z. Xie y col., 2025).

El análisis del perfil de interacciones reveló que ceefourin-1 establece interacciones con los residuos Arg362 y Thr366 mediante puentes de hidrógeno y puentes de hidrógeno mediados por moléculas de agua, los cuales se mantienen durante más del 20% del tiempo de la simulación. Este comportamiento sugiere que dichas interacciones desempeñan un papel relevante en el anclaje y estabilización del ligando dentro del sitio de unión.

Adicionalmente, el ligando presenta interacciones hidrofóbicas con Leu363, Leu367, Phe368 y Trp995, las cuales también se mantienen durante más del 20% de la simulación. Estas interacciones coinciden con las previamente reportadas como determinantes en la inhibición de MRP4, esto indica que las interacciones observadas para ceefourin-1 son consistentes con las interacciones estructurales descritas para los inhibidores de esta proteína.

En conjunto, estos resultados respaldan el uso de ceefourin-1 como inhibidor de referencia, ya que establece interacciones clave previamente descritas en el sitio de unión de MRP4.



VI.3.1 Simulaciones de los ligandos de *NPA*

VI.3.1.1 Sterhirsutina H

El análisis de la trayectoria del complejo MRP4-Sterhirsutina H (Figura 14) muestra que la proteína alcanza el equilibrio conformacional alrededor de los 20 ns, estabilizándose en un valor de RMSD cercano a los 5.5 Å.

Durante la fase inicial de la simulación, el ligando presenta valores de RMSD bajos, indicando que inicialmente permanece cerca de su pose de acoplamiento original. Sin embargo, entre los 15 y 20 ns se registra un incremento abrupto en su RMSD, sugiriendo un reajuste significativo dentro del sitio de unión para optimizar las interacciones. Superada esta fase a los 20 ns, el ligando se estabiliza y sus movimientos se acoplan a las fluctuaciones de la proteína. Posteriormente, a los 58 ns se observa un pico que refleja un cambio en la posición inicial, sin embargo, no supera los 2 Å, por ende no se considera un movimiento significativo.

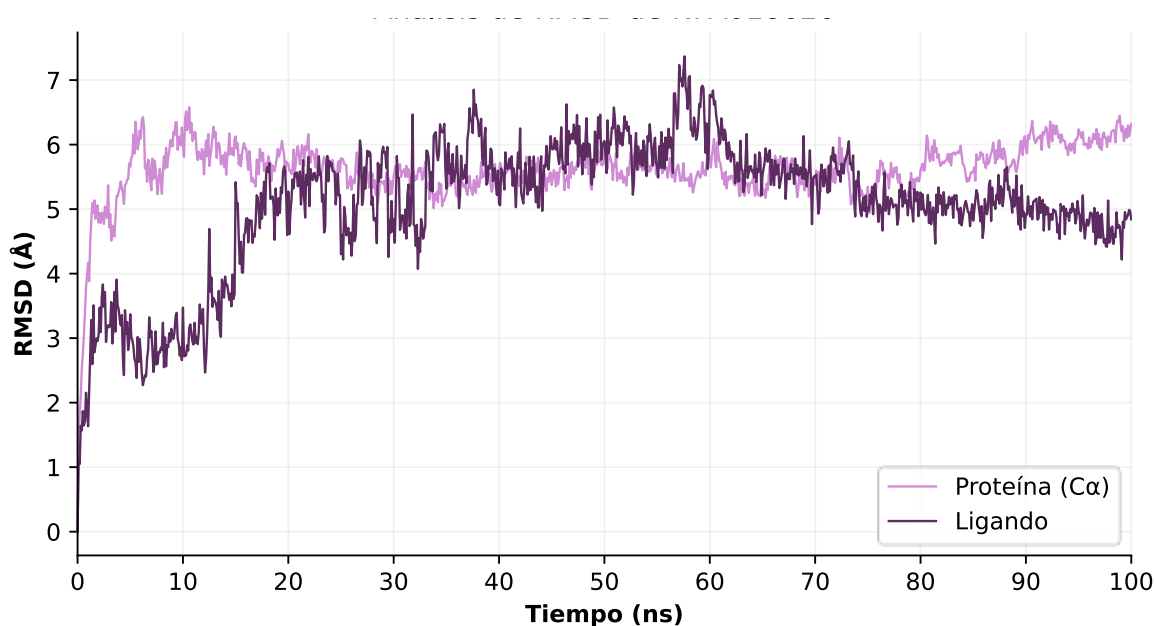


Figura 14. Gráfica RMSD del complejo MRP4-sterhirsutina H.

El hallazgo más sobresaliente en el diagrama de interacciones del complejo MRP4-sterhirsutina H es la formación de puentes de hidrógeno con Lys106, los cuales se mantienen presentes el 80% de la simulación, como se observa en la Figura 15. Aunque este residuo no ha sido descrito previamente como un determinante clave para la inhibición de MRP4, el ligando también logra anclarse a la región de reconocimiento clásica, en particular mediante interacciones hidrofóbicas con Leu363 y Trp995. Adicionalmente destaca la interacción con Arg362 (Figura 15), caracterizada por una alta frecuencia de puentes de hidrógeno mediados por moléculas de agua y una contribución minoritaria de enlaces directos.

En contraste con el perfil de la ceefourin-1, el complejo con sterhirsutina H exhibe una clara predominancia de las interacciones mediadas por el disolvente frente a los contactos directos con el transportador. Está marcada dependencia de la red de hidratación sugiere que sterhirsutina H, posiblemente por su mayor impedimento estérico o a la exposición de grupos polares que carecen de una contraparte directa en la proteína, recurre al solvente como mecanismo principal para optimizar su estabilización energética.

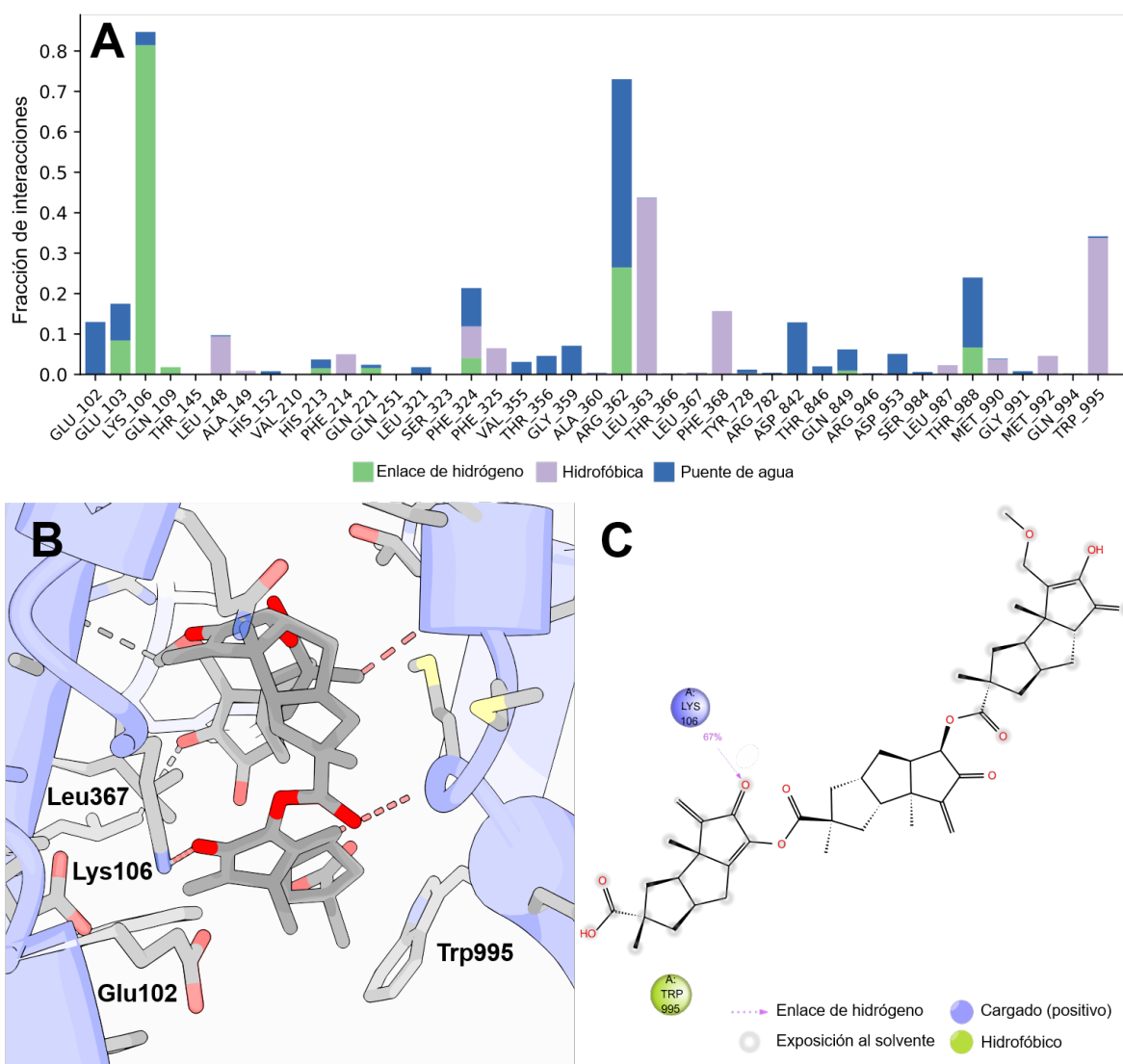


Figura 15. Análisis del complejo MRP4-sterhirsutina H: (A) Interacciones, (B) Representación 3D, (C) Interacciones en 2D.

VI.3.2.1 Sterhirsutina I

El diagrama RMSD del complejo MRP4-sterhirsutina I (Figura 16) revela una trayectoria con un notable equilibrio conformacional tras la fase de relajación inicial. La proteína alcanza un estado estacionario a los 10 ns, con fluctuaciones mínimas que oscilan entre 4.5 y 5.0 Å durante el resto de la simulación; esta meseta sostenida sugiere que la unión del ligando no induce distorsiones estructurales significativas en el transportador. Por su parte, el ligando exhibe un perfil estable entre los 15 y 75 ns. A los 78 ns se registra un desplazamiento discreto en su RMSD, estabilizándose nuevamente a los 5.5 Å hacia el final de la dinámica. Este cambio sugiere una reorientación hacia una conformación alternativa o un microestado de energía similar, manteniendo intacta la integridad global del complejo.

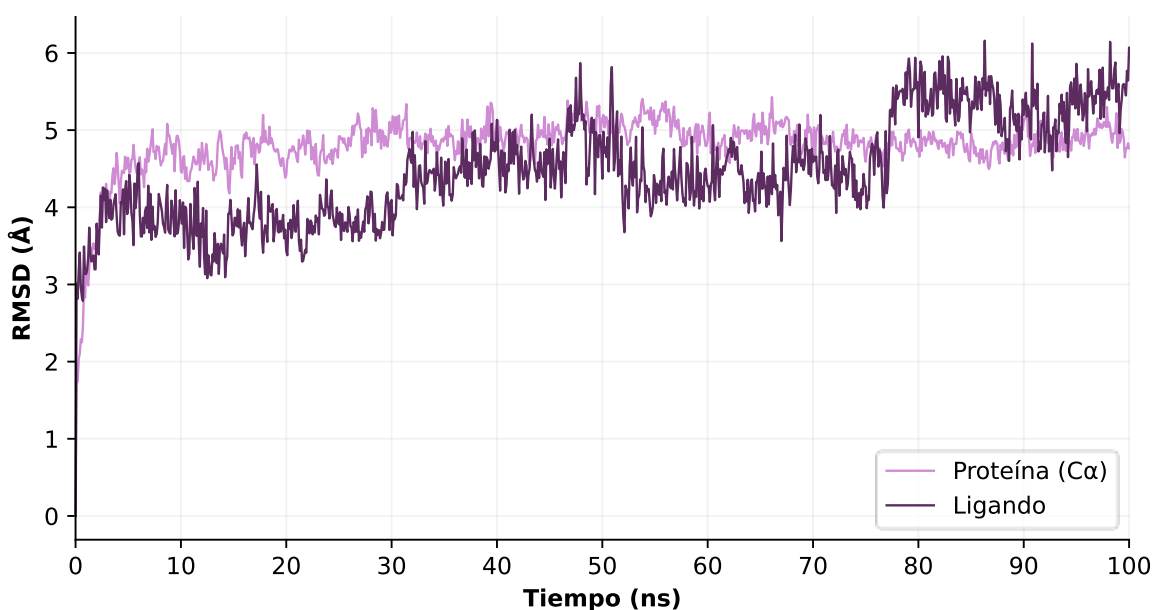


Figura 16. Gráfica RMSD del complejo MRP4-sterhirsutina I.

Sin embargo, al analizar el perfil de interacciones (Figura 17) se observa que el ligando posee una fuerte dependencia por interacciones mediadas por agua. Aunque establece contactos hidrofóbicos directos con Trp995 y, en menor medida, con Leu363, el compuesto interactúa predominantemente a través de interacciones mediadas por el disolvente.

Estas interacciones mediadas por agua proporcionan una mayor libertad conformacional del ligando dentro del sitio de unión, esto explica las fluctuaciones constantes que presenta el ligando en el diagrama RMSD. El ligando no se encuentra anclado de forma estática y rígida, sino que se reorienta continuamente para mantener la red de solvatación con los residuos Ser984 y Met990, que presentan elevadas fracciones de interacción.

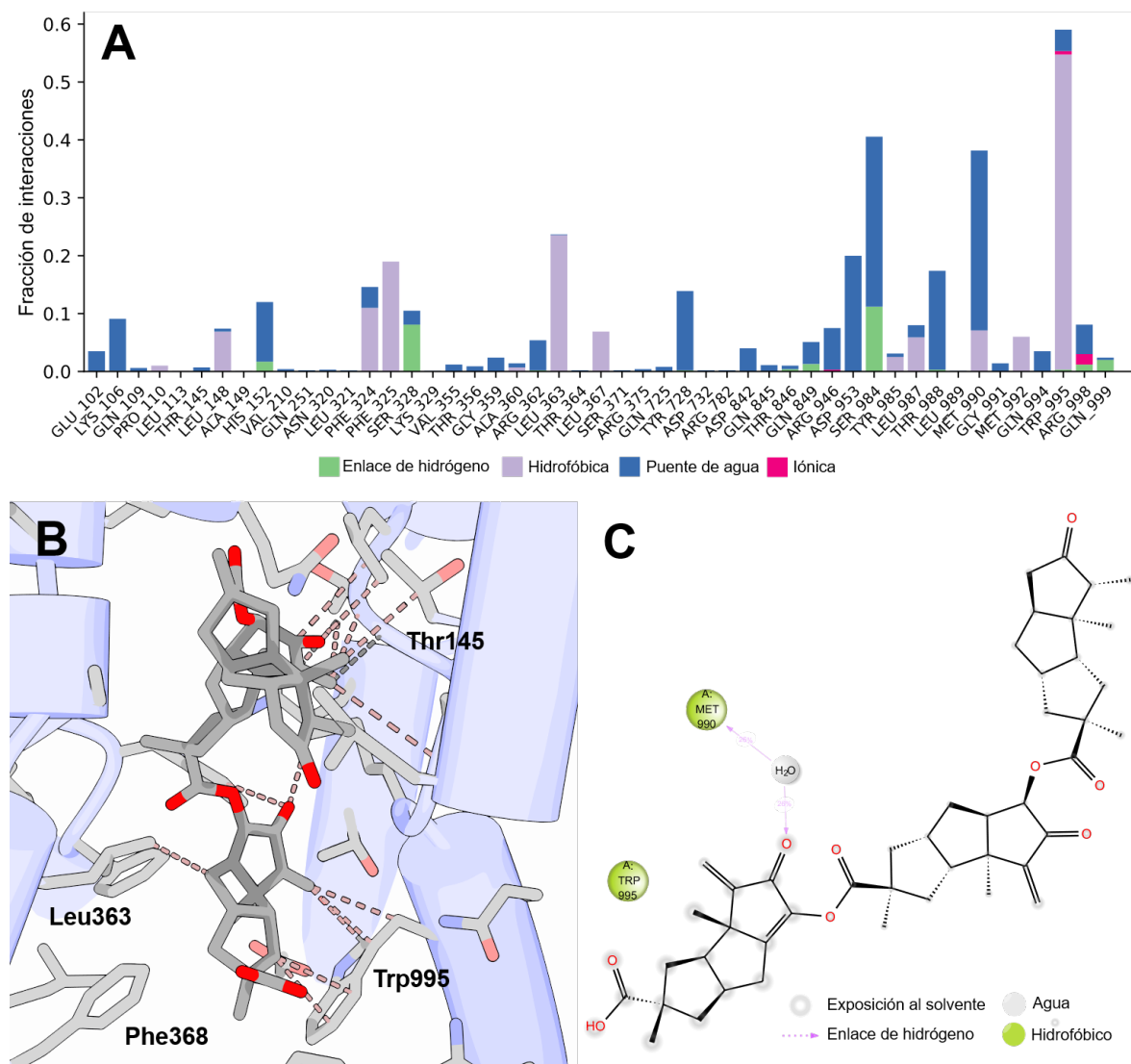


Figura 17. Análisis del complejo MRP4-sterhirsutina I: (A) Interacciones, (B) Representación 3D, (C) Interacciones en 2D.

VI.3.3.1 MC-031

Para el complejo MRP4-MC-031, el diagrama RMSD (Figura 18) revela que la proteína se estabiliza alrededor de los 40 ns, posteriormente la unión con el ligando induce una transición hacia un estado conformacional diferente a la estructura inicial. Por otra parte, el ligando mantiene valores de RMSD relativamente bajos y estables los primeros 40 ns de la simulación, indicando un anclaje inicial firme en el sitio de unión. Sin embargo, a partir de los 40 ns el inhibidor presenta un incremento progresivo en el RMSD, este aumento indica un desplazamiento gradual del ligando respecto a su posición inicial dentro del sitio de unión.

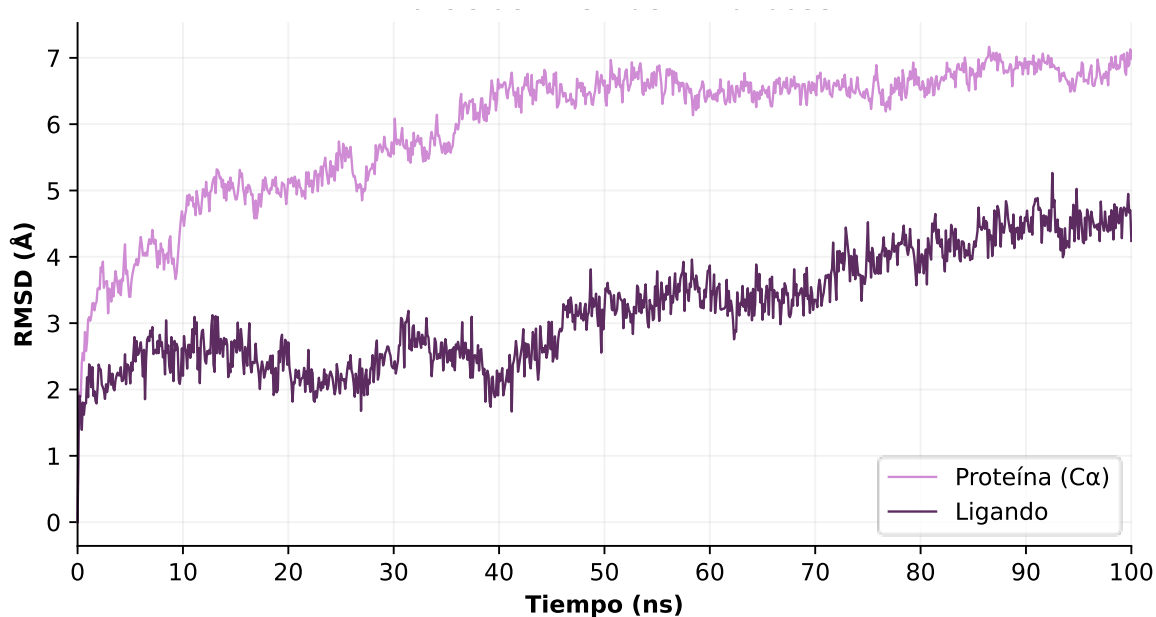


Figura 18. Gráfica RMSD del complejo MRP4-MC-031.

El ligando MC-031 como se observa en la Figura 19, revela un perfil de interacciones caracterizados por puentes de hidrógeno con residuos no descritos previamente como determinantes en la inhibición de MRP4. No obstante, el ligando logra establecer interacciones hidrofóbicas con los residuos de interés Phe324 y Trp995, además de una asociación con Arg362 mediante puentes de hidrógeno mediados por agua, un comportamiento que guarda similitud con el inhibidor control. La elevada frecuencia de estas interacciones mediadas por agua sugiere que el ligando posee una marcada dependencia de la red de hidratación para su estabilización

energética. Este fenómeno explica el desplazamiento observado en el diagrama RMSD a los 40 ns: la red de agua otorga una mayor libertad conformacional al ligando, permitiéndole explorar distintas regiones del bolsillo de unión sin abandonar la cavidad. La solvatación progresiva del sitio activo debilita el contacto hidrofóbico con Trp995, lo que se traduce en un incremento notable de las fluctuaciones en el RMSD.

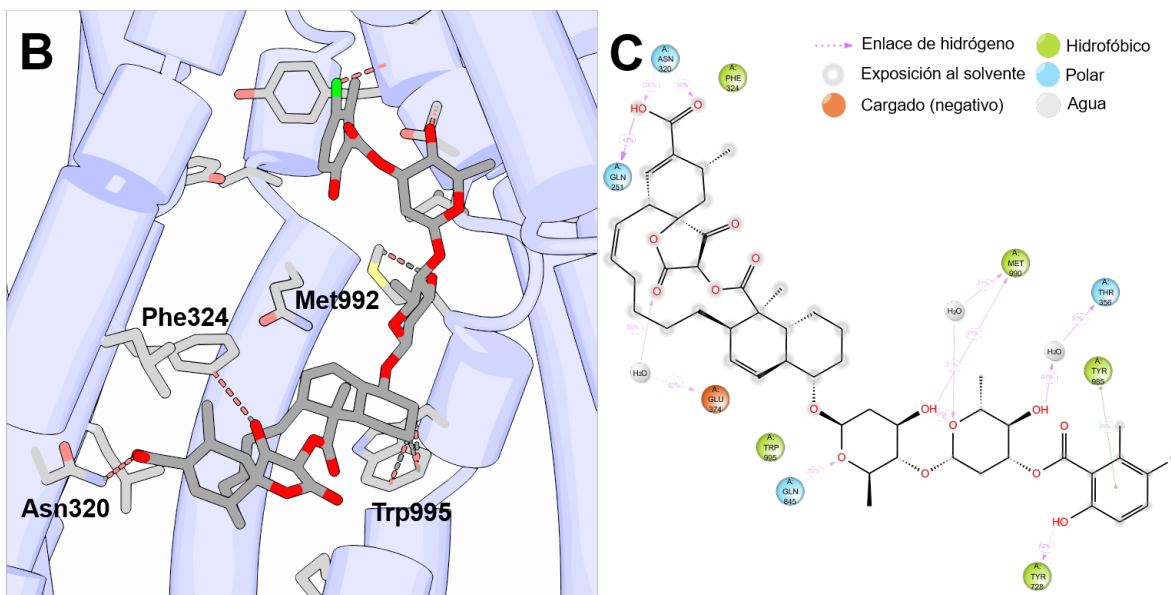
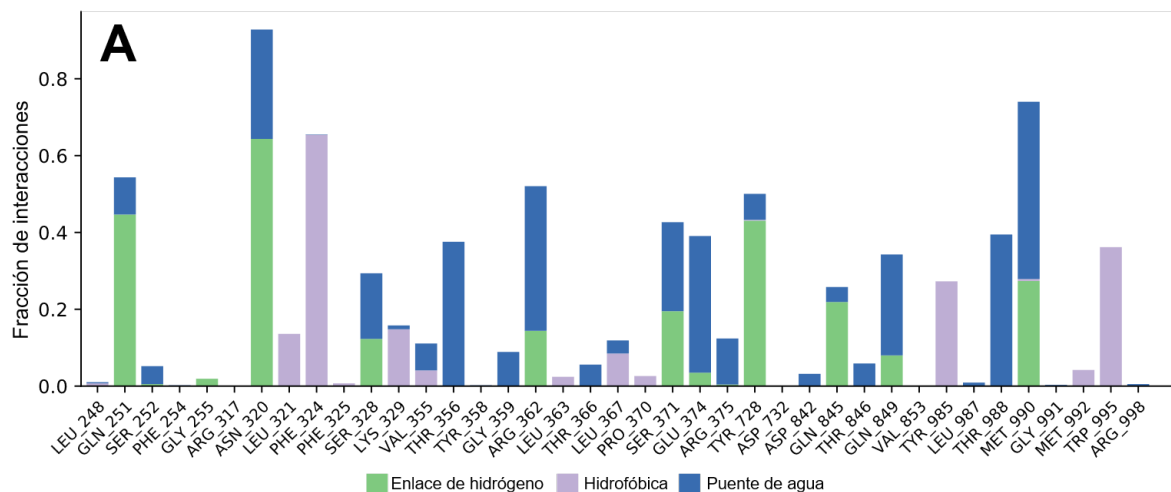


Figura 19. Análisis del complejo MRP4- MC-031: (A) Interacciones, (B) Representación 3D, (C) Interacciones en 2D.

VI.4.1 Simulaciones de los ligandos de DB

VI.4.1.1 Albendazol

A continuación se presentan los resultados de las simulaciones de dinámica molecular para los tres candidatos priorizados de la biblioteca DrugBank.

El análisis de la trayectoria del complejo MRP4-Albendazol revela una dinámica conformacional caracterizada por una alta flexibilidad del ligando, en contraste con la estabilidad del transportador. Como se evidencia en el diagrama de RMSD (Figura 20), la proteína alcanza el equilibrio conformacional a los 10 ns, por el contrario, el albendazol presenta fluctuaciones pronunciadas entre los 30 a 60 Å. Este comportamiento sugiere que el fármaco no logra anclarse de manera rígida en una única pose, sino que explora múltiples microestados conformacionales mediante desplazamientos continuos dentro del sitio de unión.

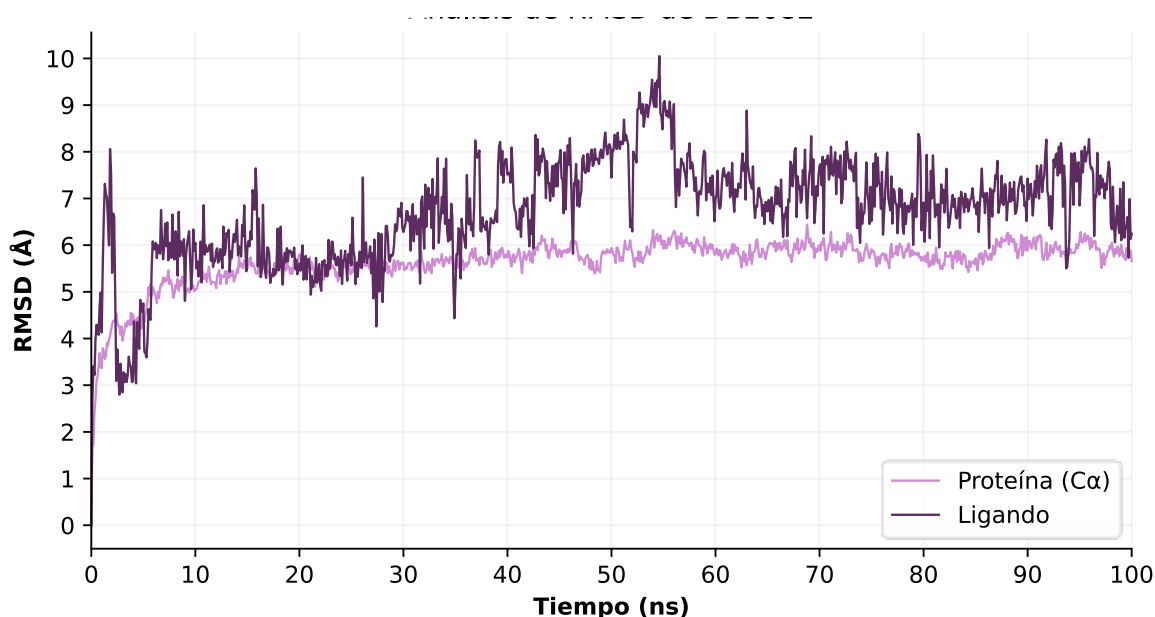


Figura 20. Gráfica RMSD del complejo MRP4 – albendazol.

El perfil de interacciones (Figura 21) revela que albendazol interactúa predominantemente con un número reducido de residuos. Entre estos, destacan el Trp995 y la Phe324 mediante interacciones hidrofóbicas, así como el Asp842 a través de puentes de hidrógeno. El acoplamiento π -stacking del núcleo aromático del ligando y el residuo Trp995, actúa como el principal determinante de estabilidad

a lo largo de la simulación. De manera complementaria, el residuo Asp842 proporciona un anclaje polar crítico al conformar una densa red de puentes de hidrógeno directos y puentes mediados por disolvente con los grupos amino del ligando. Aunque, la sinergia entre interacciones aromáticas centrales y la red de solvatación sugiere que el ligando adopta una conformación de alta estabilidad termodinámica dentro del sitio de unión. Su cadena alifática no es lo suficiente voluminosa para mantener interacciones estables y simultáneas con los residuos reportados para un inhibidor.

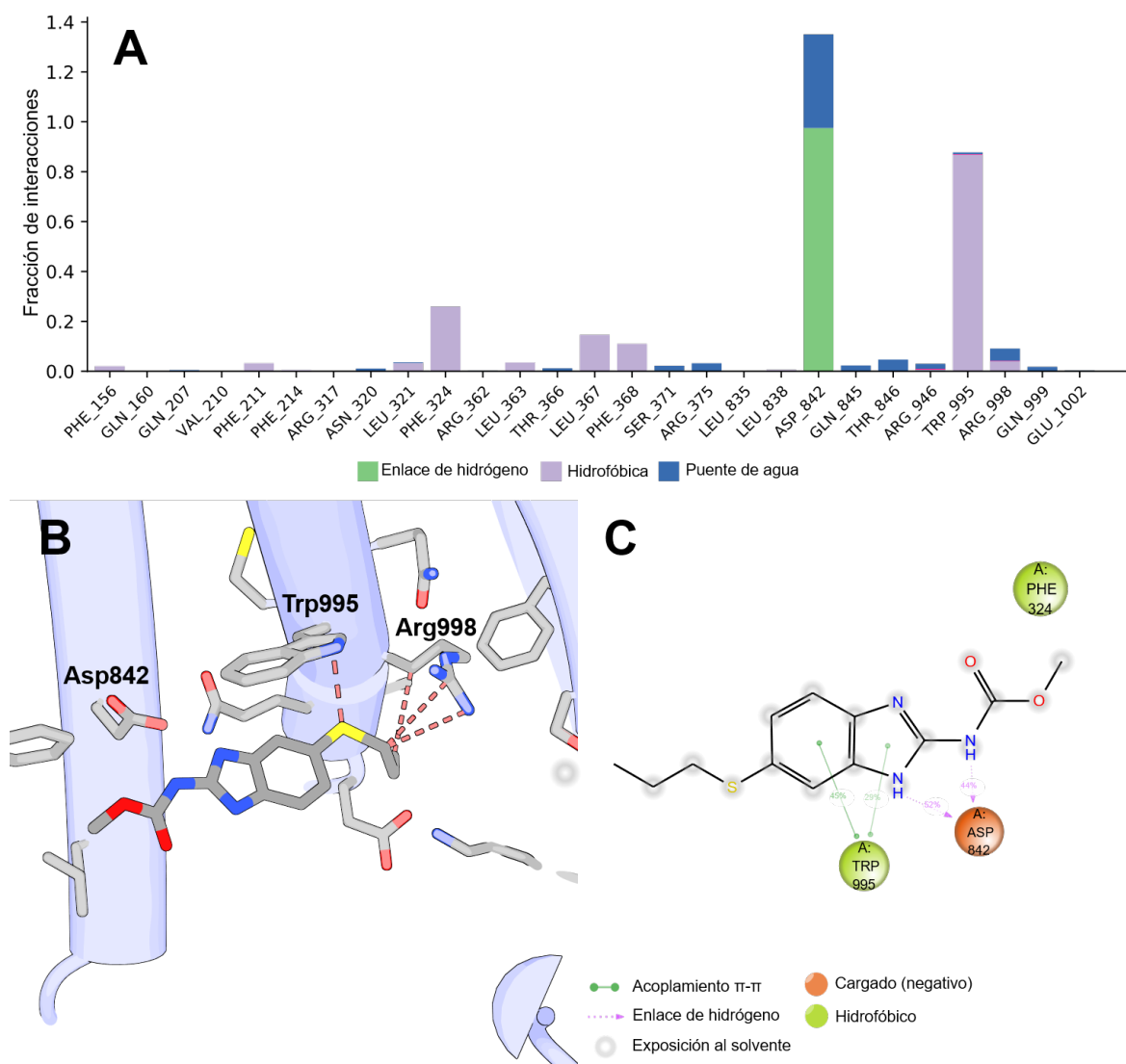


Figura 21. Análisis del complejo MRP4-albendazol: (A) Interacciones, (B) Representación 3D, (C) Interacciones en 2D.

VI.4.2.1 Lifitegrast

El análisis de la dinámica molecular del complejo con lifitegrast revela un comportamiento de notable estabilidad estructural a lo largo de toda la trayectoria. Como se observa en el diagrama de RMSD (Figura 22), la proteína alcanza el equilibrio conformacional a los 20 ns, esto sugiere que la unión del fármaco no induce distorsiones estructurales que comprometan la integridad global de la proteína. Por su parte, lifitegrast exhibe una fase de estabilización temprana a los 5 ns. Además, la trayectoria del ligando mantiene una tendencia estrictamente paralela a la de la proteína, acoplándose a sus fluctuaciones cinéticas. Este comportamiento es un indicador clásico de una pose de acoplamiento favorable, donde el compuesto permanece firmemente anclado dentro del bolsillo de unión sin experimentar reorientaciones drásticas.

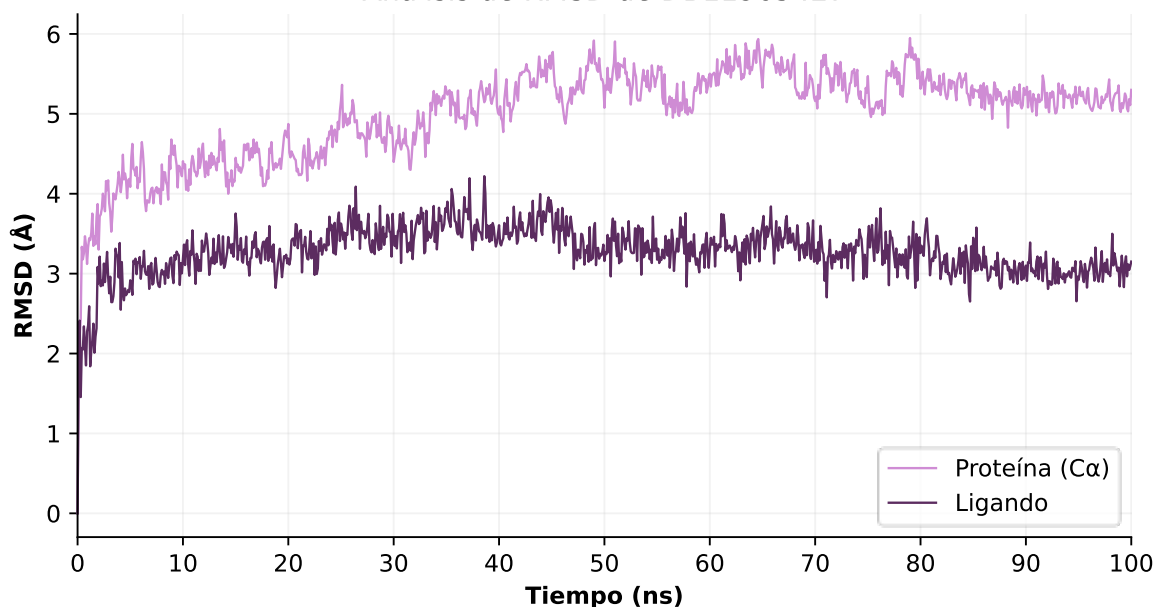


Figura 22. Gráfica RMSD del complejo MRP4 –lifitegrast.

Al analizar el perfil de interacciones del lifitegrast (Figura 23) revela que, gracias a su estructura química rica en grupos polares y anillos aromáticos, el fármaco logra establecer una extensa red de interacciones con diversos residuos. De manera particular, el compuesto exhibe un anclaje hidrofóbico dual extraordinario, al interactuar con Trp995 casi el total de la simulación y al mantener un acoplamiento

π - π cercano al 100 % con Phe324. Por su parte, la Arg362 se posiciona como la interacción de mayor relevancia al formar múltiples puentes de hidrógeno simultáneos durante todo el tiempo de simulación. Este potente anclaje se complementa de forma sinérgica con una densa red de solvatación estructurada por Asp842, la cual aporta una fracción masiva de puentes mediados por agua. En conjunto, estas interacciones le permiten al lifitegrast lograr una saturación estérica y electrónica eficiente en el sitio de unión.

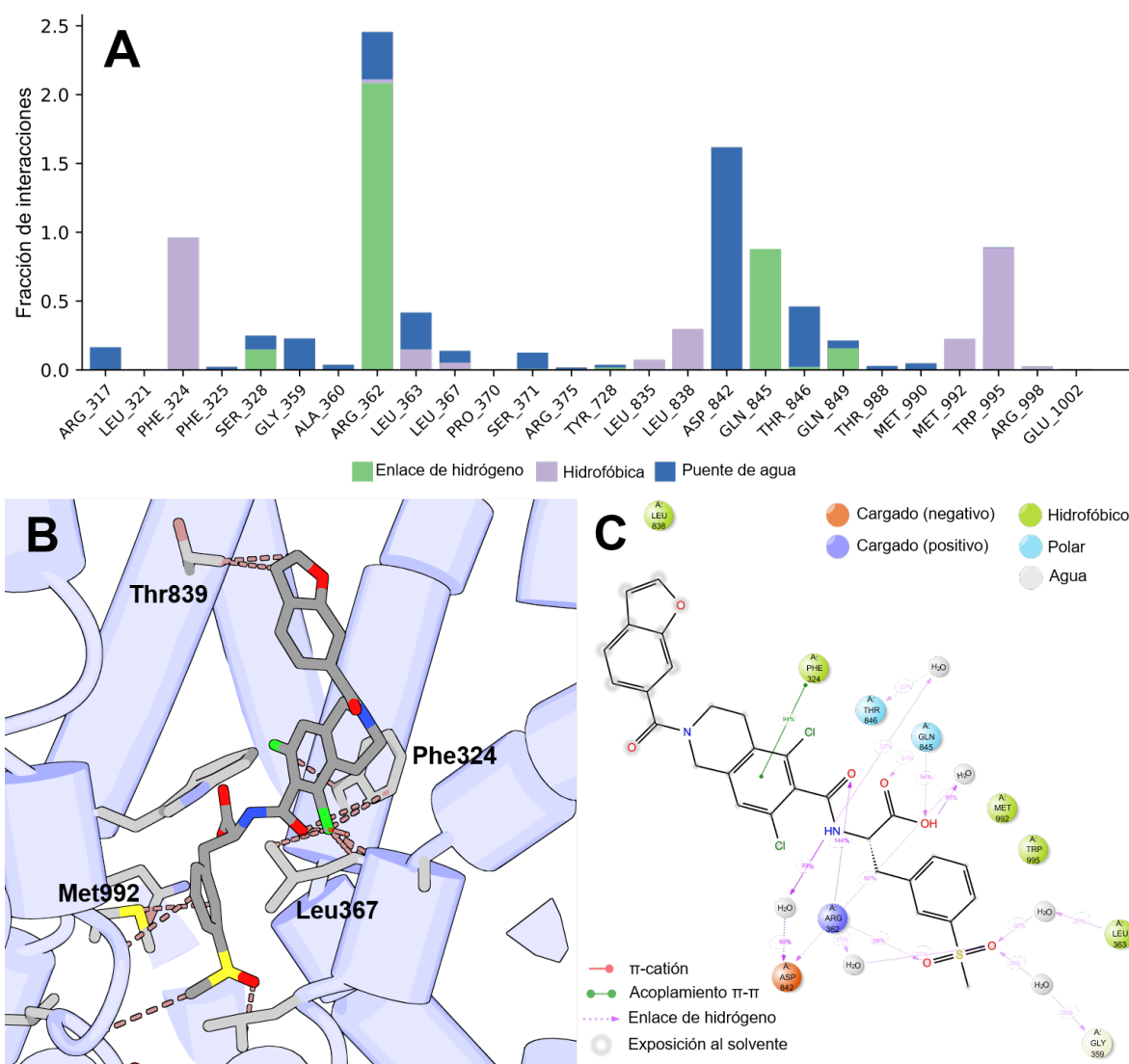


Figura 23. Análisis del complejo MRP4-lifitegrast: (A) Interacciones, (B) Representación 3D, (C) Interacciones en 2D.

VI.4.3.1 Avatrombopag

El diagrama RMSD del complejo MRP4-avatrombopag (Figura 24) revela un comportamiento de inestabilidad y exploración conformacional. La proteína alcanza un estado de equilibrio a los 30 ns, estabilizándose en fluctuaciones que oscilan entre 4.8 y 6.4 Å. Por su parte, avatrombopag muestra una trayectoria más variable, con una movilidad limitada durante los primeros 35 ns de la simulación, seguida de un reacomodo conformacional abrupto a los 40 ns. Posteriormente el ligando entra en un régimen de fluctuación constante y elevada hasta el final de la simulación.

Este comportamiento sugiere que avatrombopag, aunque posee cierta libertad conformacional, mantiene una permanencia en el sitio de unión, lo que nos indica una interacción dinámica con el transportador más que una unión rígida y estática.

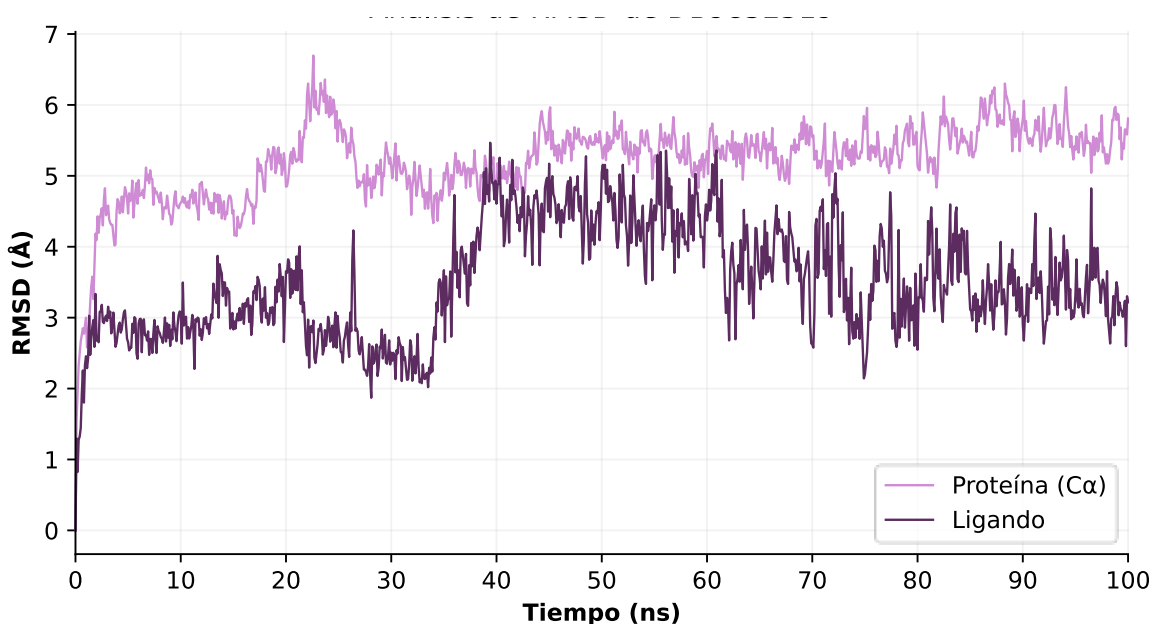


Figura 24. Gráfica RMSD del complejo MRP4-avatrombopag.

El análisis del perfil de interacciones (Figura 25) revela que la estabilidad temporal del complejo con avatrombopag se sustenta principalmente en una red de interacciones polares conformada por los residuos Lys329, Tyr728 y Asp732. Asimismo, el ligando establece puentes de hidrógeno con Arg362, los cuales

contribuyen a la estabilización de su núcleo aromático dentro del sitio de unión. Adicionalmente, avatrombopag presenta interacciones hidrofóbicas con Trp995 y Phe368, residuos que, al encontrarse ubicados en hélices transmembrana opuestas dentro de la cavidad del transportador, favorecen la estabilización del ligando. La ocupación de esta cavidad por avatrombopag sugiere un bloqueo estérico del paso de sustratos endógenos, lo que interfiere con la función de transporte de MRP4. En conjunto, este patrón de interacciones y su persistencia a lo largo de la simulación respaldan la clasificación de avatrombopag como un potencial inhibidor de MRP4.

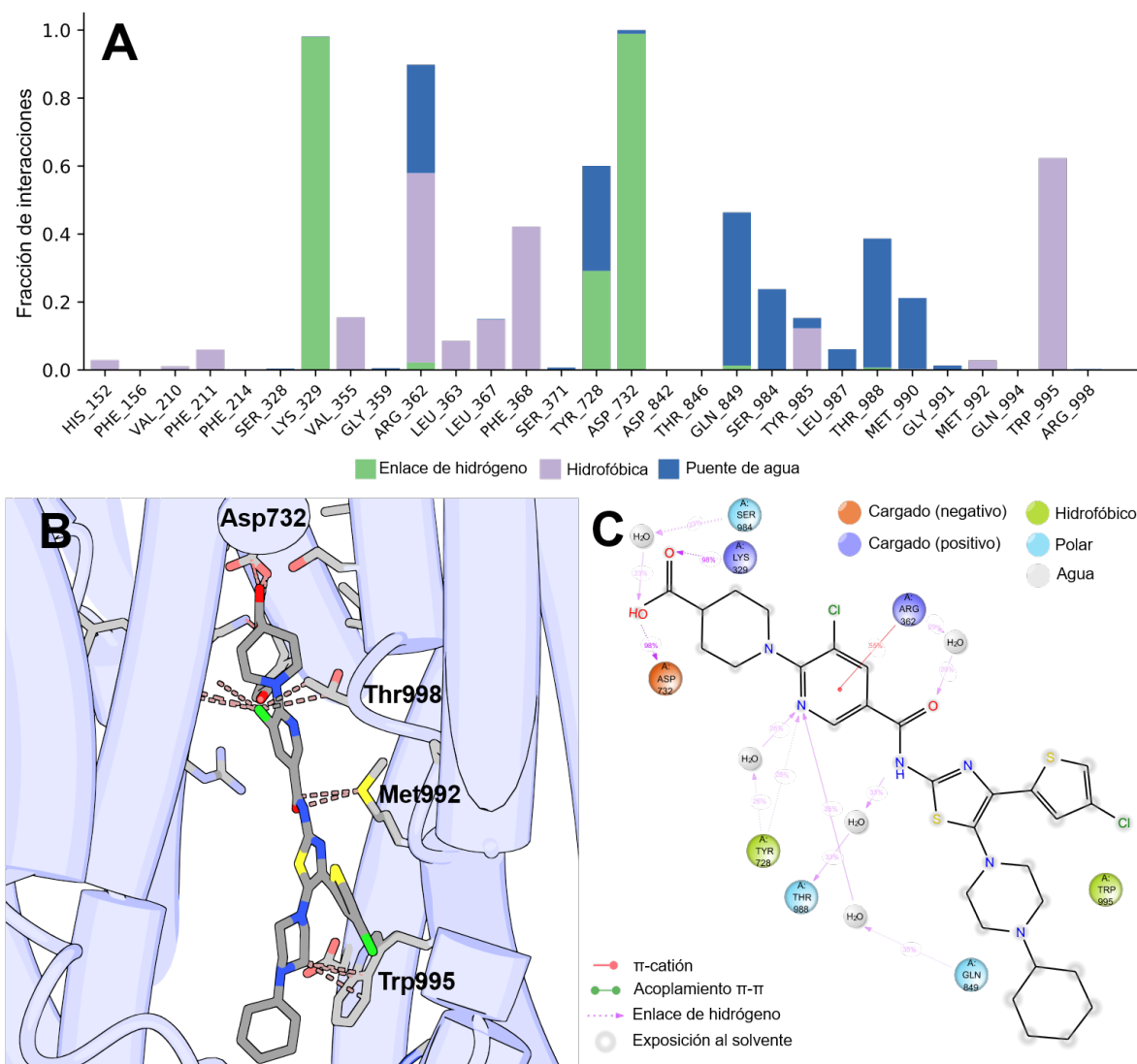


Figura 25. Análisis del complejo MRP4-avatrombopag: (A) Interacciones, (B) Representación 3D, (C) Interacciones en 2D.

VI.5.1 Afinidad teórica de los ligandos con MRP4

Para determinar la afinidad teórica de los complejos proteína-ligando, el cambio de energía libre de Gibbs (ΔG) fue calculado a partir de las simulaciones de metadinámica.

Con el fin de contextualizar el significado termodinámico de los valores obtenidos y facilitar la comparación entre candidatos, se presenta el desarrollo matemático que permitió graficar el cambio en la energía libre (Figura 26):

$$\Delta G = -nRT \ln(K) \quad (7)$$

Donde:

n : Número de sitios de unión independientes en la proteína objetivo.

R : Constante universal de los gases $1.987 \times 10^{-3} \frac{\text{Kcal}}{\text{mol}\cdot\text{K}}$

T : Temperatura absoluta del sistema en Kelvin (K).

K : Constante de afinidad del complejo molecular.

Suponiendo que el ligando se une a un solo sitio de la proteína (sitio de unión de MRP4), simplificamos a $n = 1$:

$$\Delta G = -RT \ln(K) \quad (8)$$

La diferencia de los valores de energía libre de la molécula A, normalmente el control (Mol_a) y un ligando identificado como más afín (Mol_b) se representan a continuación:

$$\Delta\Delta G = \Delta G_{\text{Mol}_a} - \Delta G_{\text{Mol}_b}$$

Si sustituimos la ecuación del Paso 1 para el control y la molécula objetivo, tenemos:

$$\Delta\Delta G = [-RT \ln(K_{\text{Mol}_a})] - [-RT \ln(K_{\text{Mol}_b})] \quad (9)$$

$$\Delta\Delta G = -RT \ln(K_{\text{Mol}_a}) + RT \ln(K_{\text{Mol}_b}) \quad (10)$$

A continuación, se factoriza el término común ($-RT$) de la ecuación:

$$\Delta\Delta G = -RT[\ln(K_{Mol_b}) - \ln(K_{Mol_a})] \quad (11)$$

Se aplica la una propiedad fundamental del logaritmo, la regla del cociente:

$$\Delta\Delta G = -RT \left[\ln \frac{K_{Mol_b}}{K_{Mol_a}} \right] \quad (12)$$

En la ecuación siguiente, el termino $\frac{K_{Mol_b}}{K_{Mol_a}}$ refleja cuantas veces es más afín la molécula objetivo de nuestro control.

$$\frac{\Delta\Delta G}{-RT} = \ln \frac{K_{Mol_b}}{K_{Mol_a}} \quad (13)$$

Se aplica la función inversa del logaritmo natural para despejar la afinidad relativa:

$$e^{\frac{\Delta\Delta G}{-RT}} = \frac{K_{Mol_b}}{K_{Mol_a}} \quad (14)$$

Finalmente se sustituyen los valores constantes:

$$e^{\frac{\Delta\Delta G}{-(1.987 \times 10^{-3} \frac{\text{Kcal}}{\text{mol}} \cdot \text{K})(310.15 \text{ K})}} = \frac{K_{Mol_b}}{K_{Mol_a}} \quad (15)$$

La ecuación siguiente se puede graficar $\Delta\Delta G$ en función de $\frac{K_{Mol_b}}{K_{Mol_a}}$:

$$e^{\frac{\Delta\Delta G}{-(0.61627 \frac{\text{Kcal}}{\text{mol}})}} = \frac{K_{Mol_b}}{K_{Mol_a}} \quad (16)$$

En la Figura 26 se observa que para obtener una afinidad relativa 10 veces mayor respecto a nuestra molécula control ceefourin-1, se requiere una diferencia de al menos 1.36 kcal/mol calculado con la ecuación 16.

Relación entre afinidad relativa y cambio de energía libre

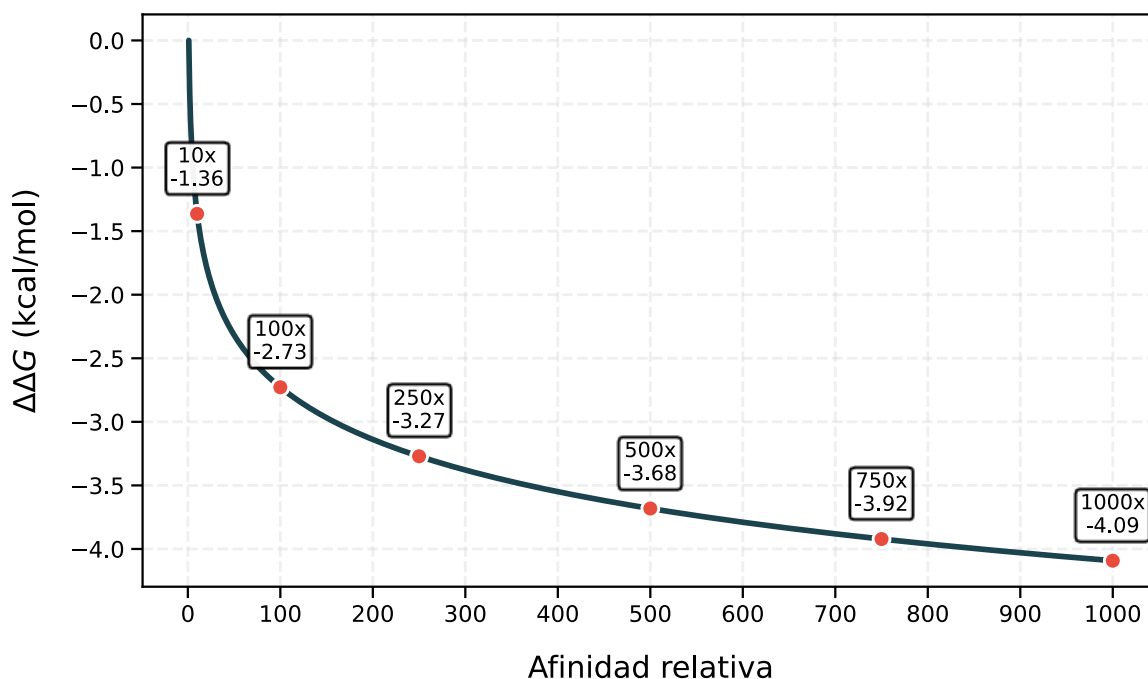


Figura 26. Relación entre afinidad relativa y el cambio de energía libre.

VI.5.1.1 Ceefourin-1

El análisis del perfil de energía libre para ceefourin-1 (compuesto control), establece un marco de referencia excepcional para validar el modelo computacional. Como se observa en la gráfica, el ligando exhibe una afinidad por el centro del bolsillo de unión (Figura 27A), presentando un mínimo global de energía de -56.65 kcal/mol a una distancia de apenas 1.0 Å de la CV (Figura 27C), consecuencia de su ubicación en el centro del bolsillo de unión, como se observan en la Figura 27B.

El gráfico *free-energy surface* (FES) de ceefourin-1 muestra que el ligando control es estable en el centro del bolsillo de MRP4.

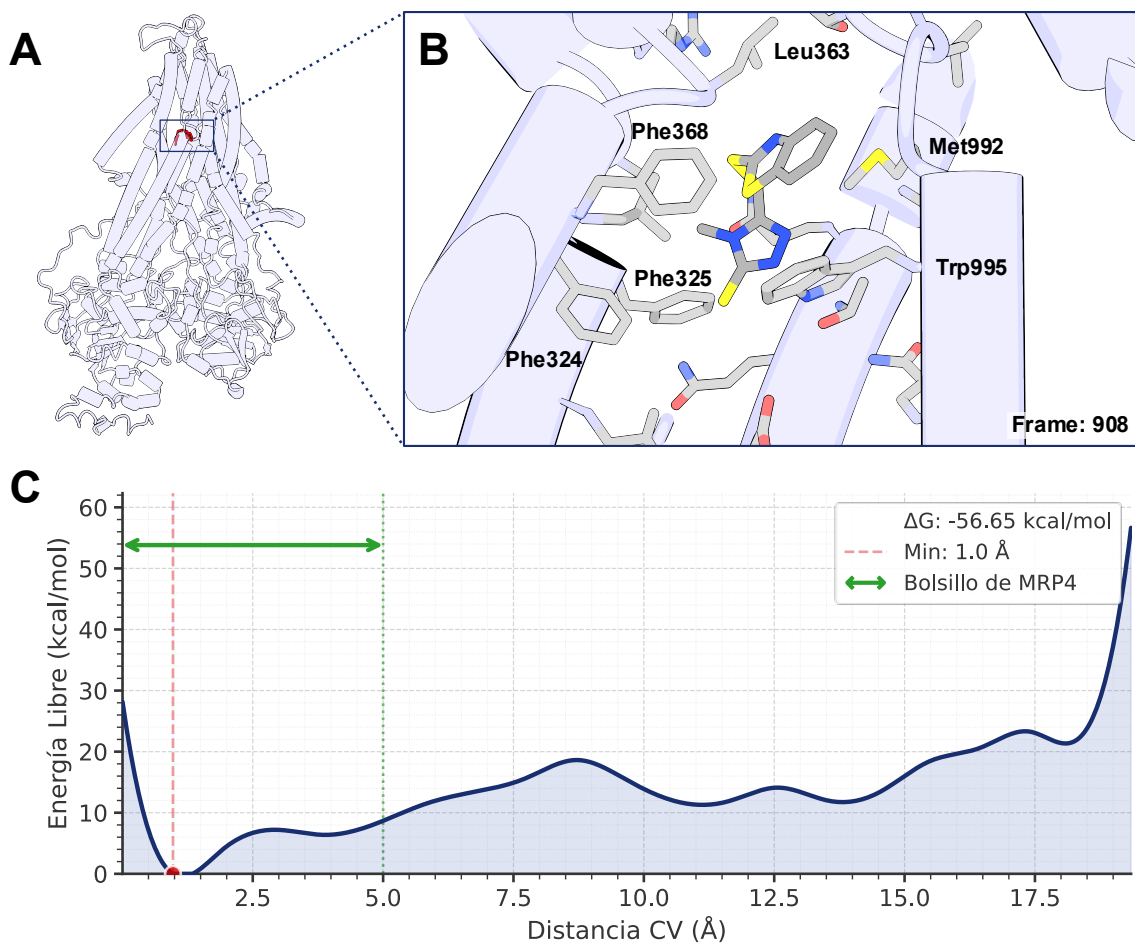


Figura 27. Perfil termodinámico de MRP4WT-ceefourin-1: (A) Ubicación general del complejo proteína-ligando. (B) Acercamiento a los residuos del estado de mínima energía. (C) Perfil FES de la simulación.

VI.6.1 Afinidad teórica de ligandos de NPA

VI.6.1.1 Sterhirsutina H

El análisis del perfil de energía libre revela un fuerte rechazo de sterhirsutina H por el bolsillo de MRP4, el cual no logra estabilizarse termodinámicamente y experimenta un desplazamiento hacia el exterior como se observa en la Figura 28A, ubicando su mínimo global de energía a una distancia pronunciada de 17.9 Å. Esta coordenada posiciona a la molécula en una región superior, mostrando una estabilización con una energía libre de -54.87 kcal/mol (Figura 28C), interactuando con residuos periféricos (Figura 28B).

Este comportamiento es indicativo de que sterhirsutina H de no sufrir cambios fisicoquímicos por su paso por el organismo actuaría como un sustrato de MRP4.

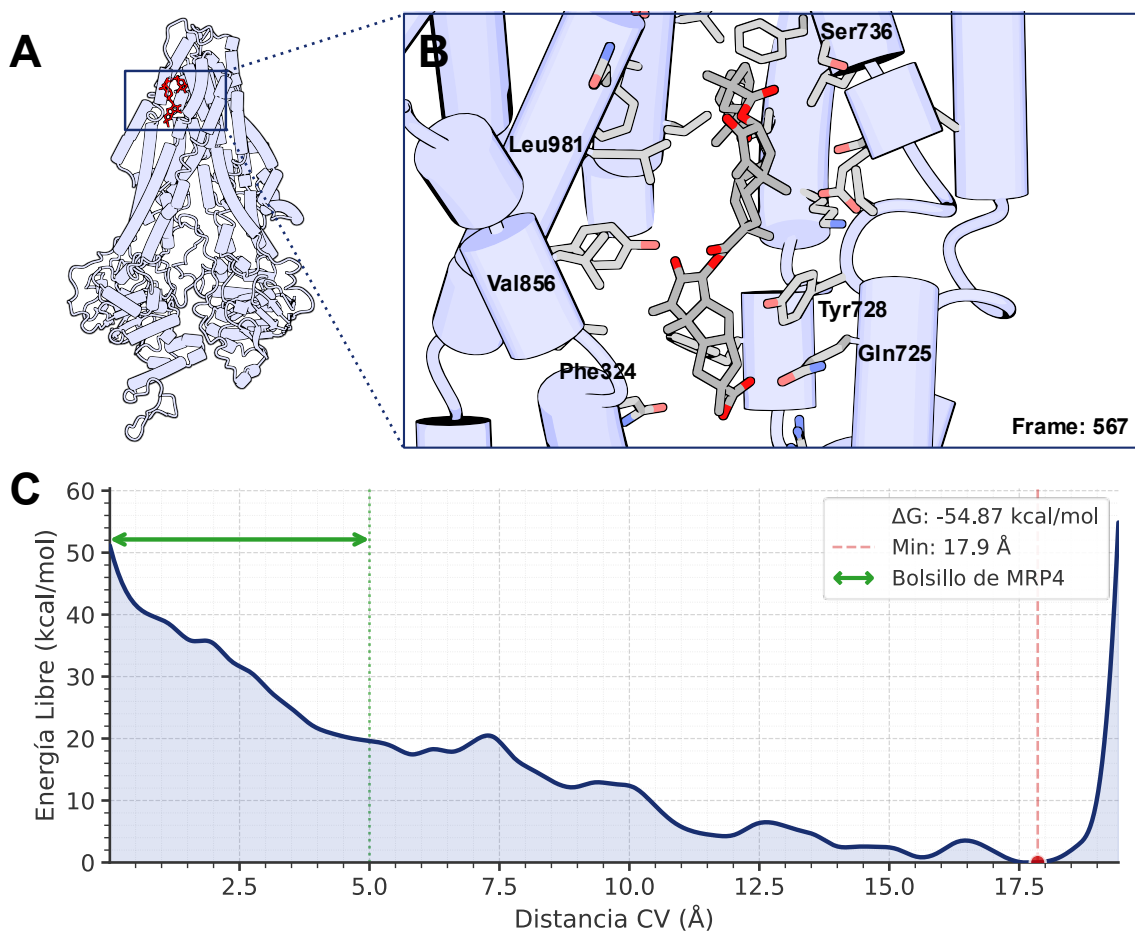


Figura 28. Perfil termodinámico de MRP4WT-sterhirsutina H: (A) Ubicación general del complejo proteína-ligando. (B) Acercamiento a los residuos del estado de mínima energía. (C) Perfil FES de la simulación.

VI.6.2.1 Sterhirsutina I

El análisis del perfil de energía libre muestra que este sterhirsutina I exhibe un comportamiento similar con la sterhirsutina H. La fuerte penalización energética en la región inicial mostrada en la Figura 29C (0 a 5 Å), impulsa a la molécula a localizar su mínimo global a una distancia de 15.5 Å. La vista general de la proteína (Figura 29A) sitúa a la molécula en la región superior. En este sitio sterhirsutina I logra un acoplamiento termodinámico con una afinidad teórica de -61.80 kcal/mol (Figura

29B). La evidencia *in silico* sugiere que este compuesto, de no sufrir cambios fisicoquímicos se comportaría como un sustrato exógeno.

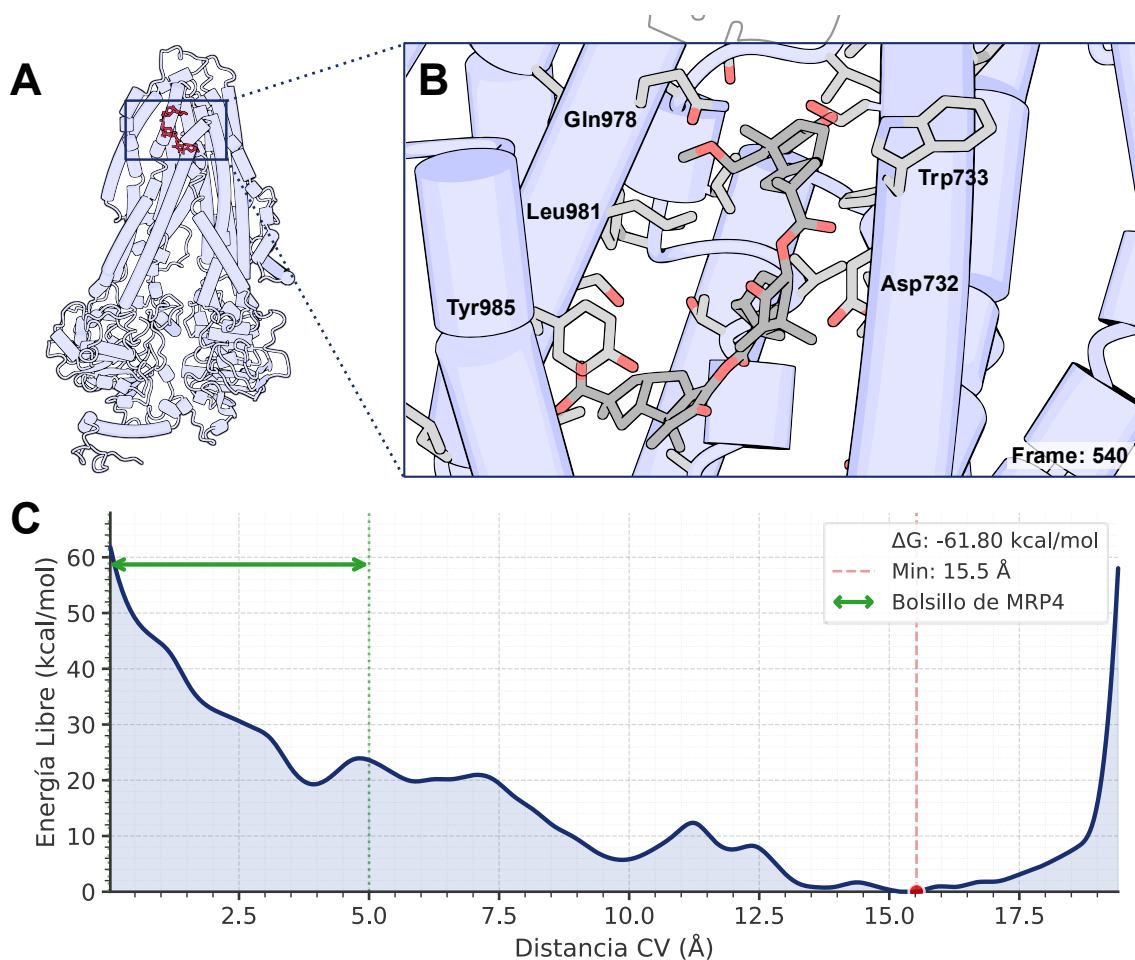


Figura 29. Perfil termodinámico de MRP4WT-sterhirsutina I: (A) Ubicación general del complejo proteína-ligando. (B) Acercamiento a los residuos del estado de mínima energía. (C) Perfil FES de la simulación.

VI.6.3.1 MC-031

El análisis del perfil de energía libre demuestra que MC-031 presenta una energía desfavorable dentro del sitio de unión. Aunque en una vista macroscópica del complejo (Figura 30A) el ligando pudiera aparentar estar centralizado, la distancia de la CV y los residuos adyacentes (Figura 30B) muestran una realidad distinta. El ligando ubica su mínimo global a una distancia de 11.3 Å como se muestra en la Figura 30C. La molécula se sitúa en una cavidad casi externa de la proteína, la

afinidad de MC-031 por esta cavidad alcanza un valle de -63.76 kcal/mol. Este comportamiento sugiere que MC-031 se perfila teóricamente como un sustrato.

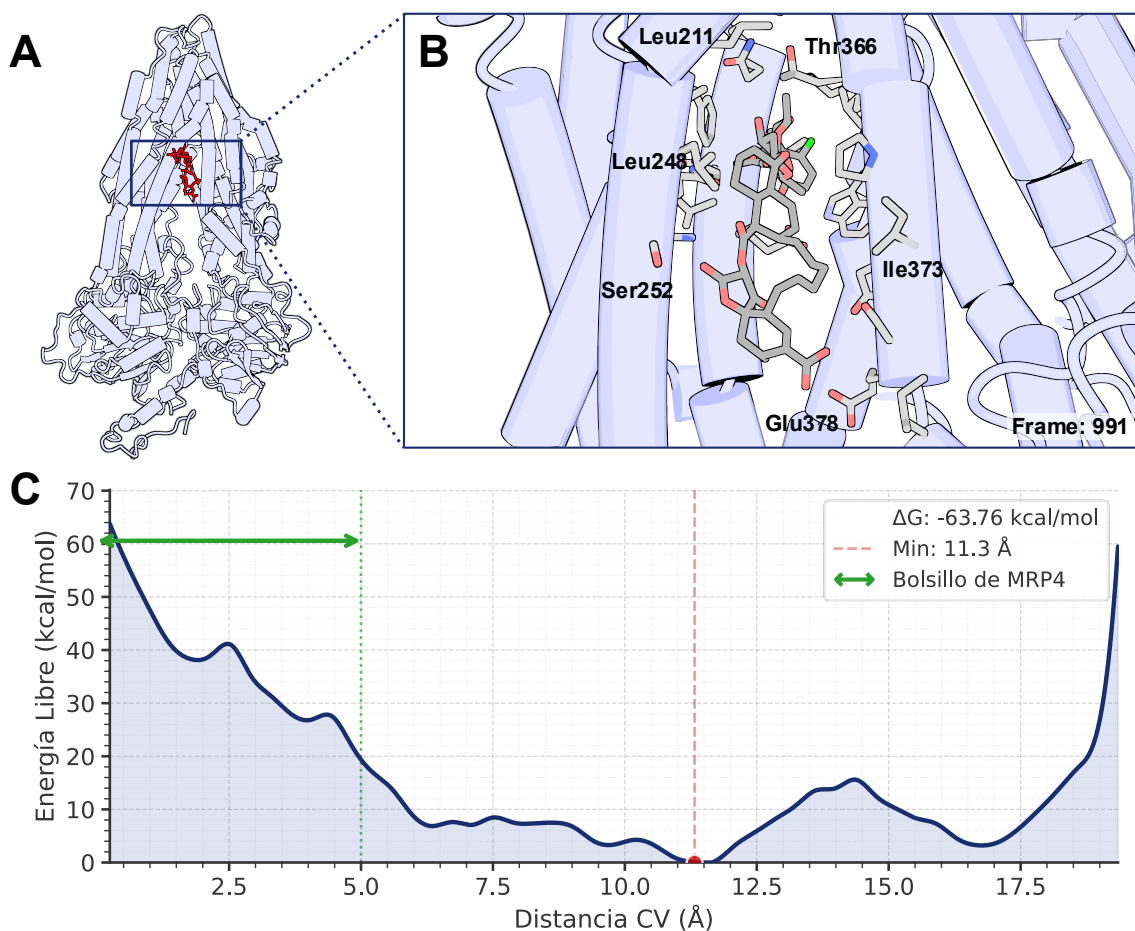


Figura 30. Perfil termodinámico de MRP4WT-MC-031: (A) Ubicación general del complejo proteína-ligando. (B) Acercamiento a los residuos del estado de mínima energía. (C) Perfil FES de la simulación.

VI.7.1 Afinidad teórica de los ligandos de DB

VI.7.1.1 Albendazol

El análisis del perfil de energía libre del albendazol revela una clara aversión por el bolsillo de MRP4, con un mínimo global en 15.5 Å como se muestra en la Figura 31A. La inspección estructural (Figura 31A y 31B) confirma esta ubicación en la sección superior del transportador (-55.97 kcal/mol) interactuando con residuos

periféricos (Figura 31B). Albendazol se encuentra, en la sección superior, en donde es posible que la hidrólisis del ATP proporcione la energía necesaria para su expulsión, sugiriendo que albendazol se comportaría como un sustrato de MRP4.

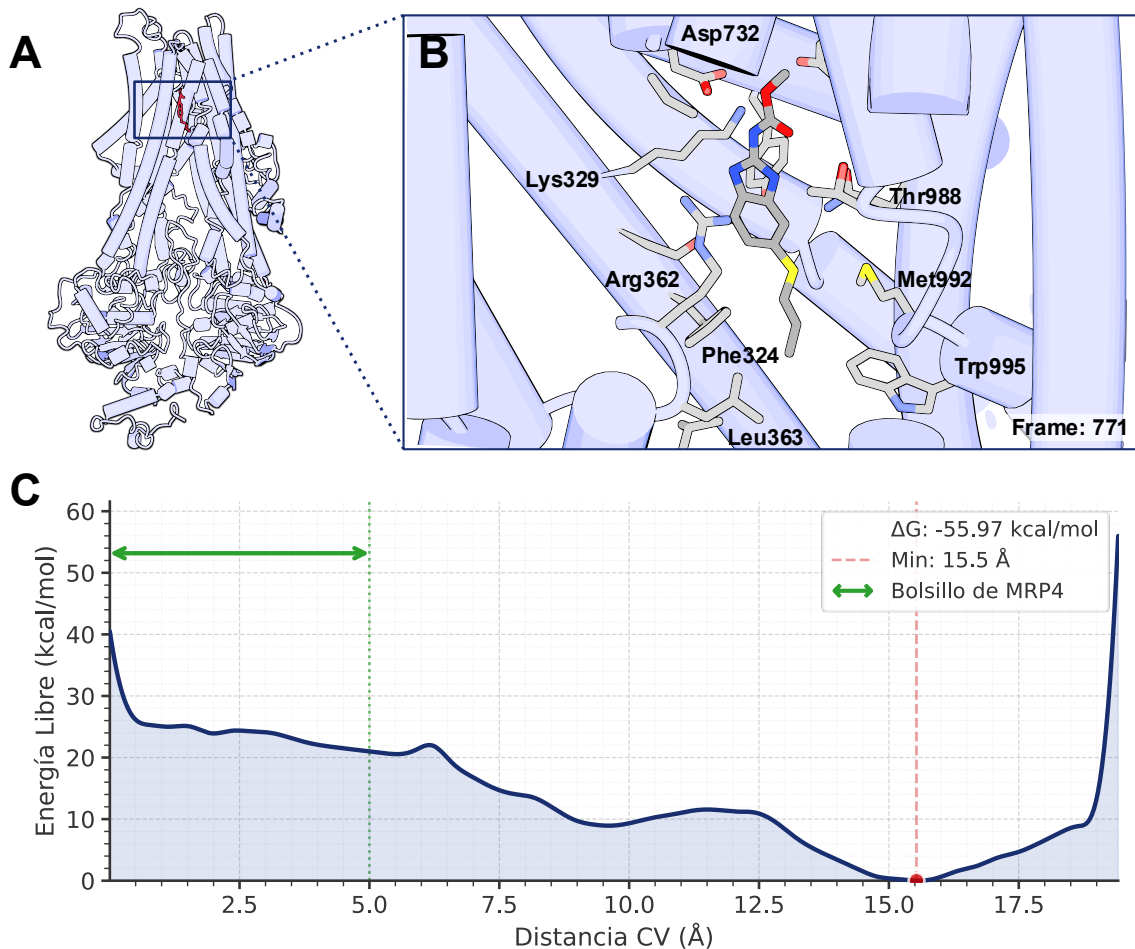


Figura 31. Perfil termodinámico de MRP4WT-albendazol: (A) Ubicación general del complejo proteína-ligando. (B) Acercamiento a los residuos del estado de mínima energía. (C) Perfil FES de la simulación.

VI.7.2.1 Lifitegrast

El mapa FES (Figura 32C) muestra un alto costo energético para mantener a lifitegrast dentro del sitio de unión. Ubicando su mínimo global de energía a una distancia de 16.6 Å, en esta coordenada el compuesto se ancla a una región periférica polar, alcanzando una estabilización de -68.97 kcal/mol.

Sin embargo, desde una perspectiva del ciclo funcional de MRP4, esta elevada afinidad revela que el ligando se coordina en un sitio alostérico sin lograr tocar los segmentos transmembranales que mantienen el estado de inhibición, perfilándolo más como un posible sustrato.

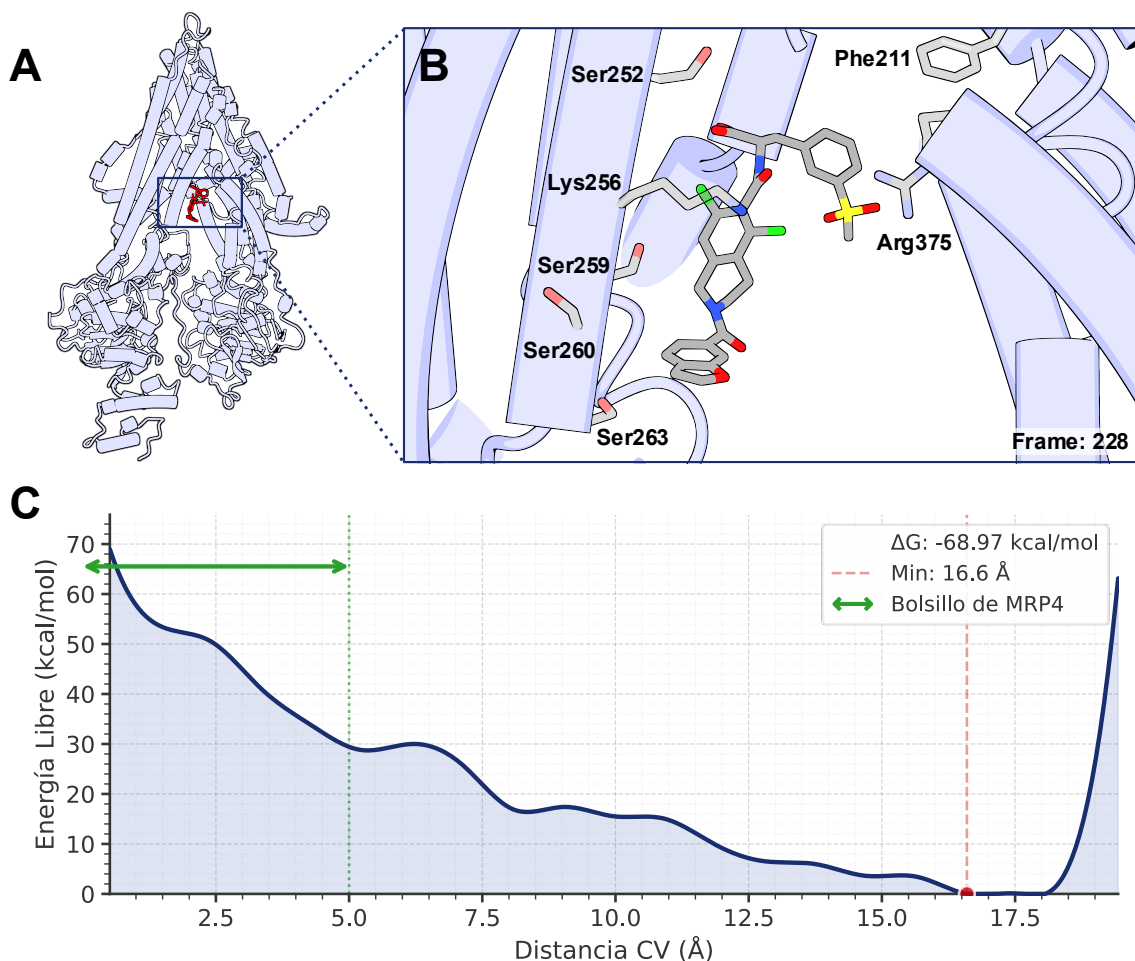


Figura 32. Perfil termodinámico de MRP4WT-lifitegrast: (A) Ubicación general del complejo proteína-ligando. (B) Acercamiento a los residuos del estado de mínima energía. (C) Perfil FES de la simulación.

VI.7.3.1 Avatrombopag

El análisis del perfil de energía libre demuestra que avatrombopag exhibe una destacada afinidad por la parte superior del bolsillo de unión (Figura 33A). A diferencia de los compuestos evaluados anteriormente, esta molécula no sufre repulsión en el sitio de unión, debido a que su mínimo global de energía se ubica a

una distancia de apenas 1.9 Å (Figura 33C). La inspección estructural (Figura 33B) confirma que esta coordenada le permite interactuar directamente con el bolsillo de MRP4. Su comportamiento termodinámico es congruente con el de un antagonista competitivo, justificando su priorización para ensayos experimentales.

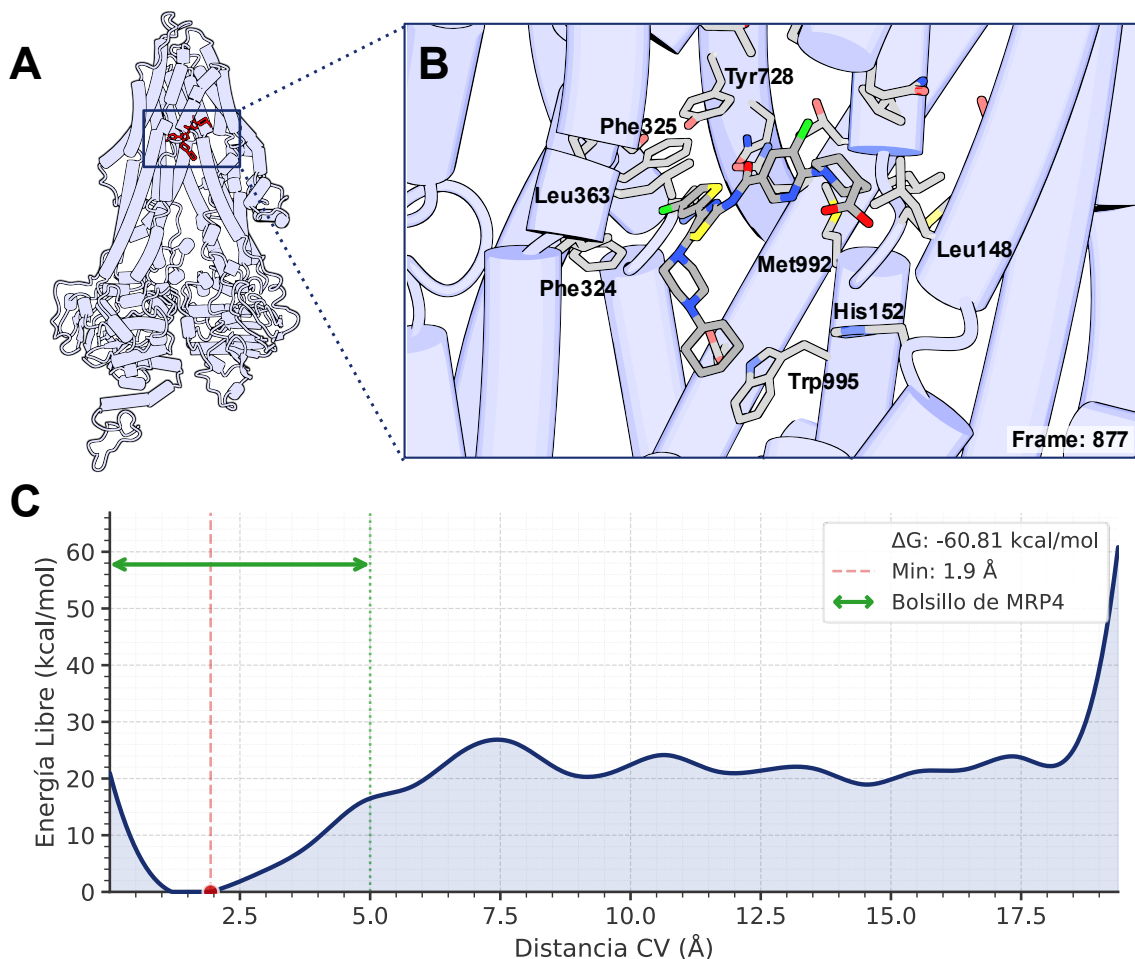


Figura 33. Perfil termodinámico de MRP4WT-avatrombopag: (A) Ubicación general del complejo proteína-ligando. (B) Acercamiento a los residuos del estado de mínima energía. (C) Perfil FES de la simulación.

VI.3 Enfoque alternativo mediante quimioinformática

VI.1.1 Exploración del espacio químico

La exploración del espacio químico de una biblioteca nos permitió caracterizar la diversidad estructural y fisicoquímica del conjunto de moléculas disponibles,

identificando agrupaciones moleculares para orientar la selección de candidatos, esto nos permitió evitar la redundancia estructural, garantizando una cobertura química para explorar distintos *scaffolds* con MRP4.

Mediante un Análisis de Componentes Principales (PCA) sobre la matriz resultante de descriptores ECFP4 (*Extended-Connectivity Fingerprints*, diámetro 4), se permitió proyectar el espacio químico de los 36,454 compuestos de la base de datos *Natural Product Atlas*, como se muestra en la Figura 34 (Van Santen y col., 2019).

La visualización de los dos componentes CP1 y CP2 (Figura 34) exhibió una amplia dispersión general, confirmando la heterogeneidad estructural y la idoneidad de la quimioteca.

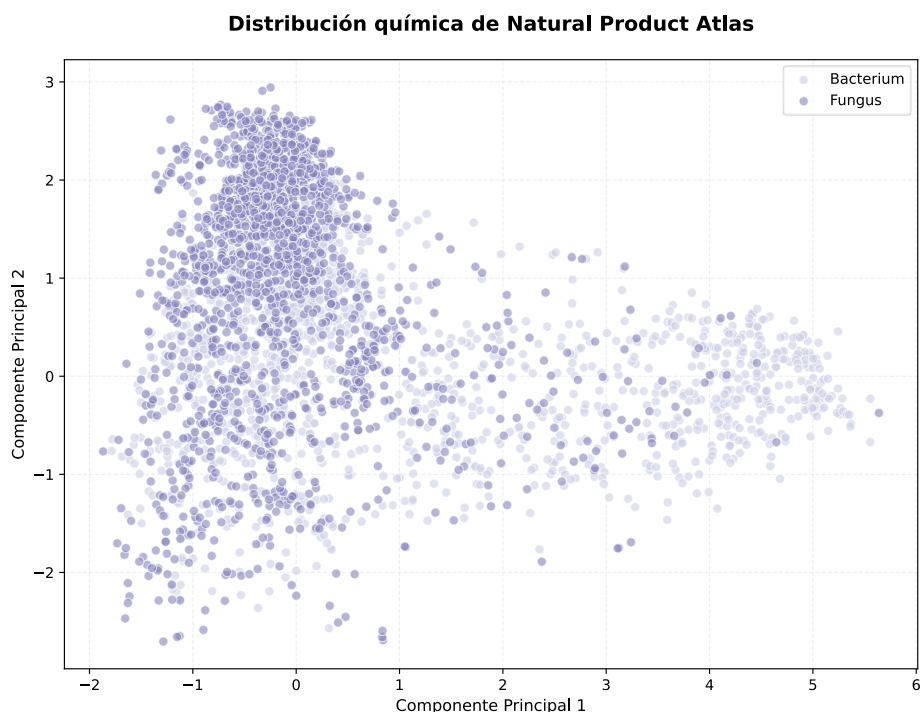


Figura 34. Análisis PCA del espacio químico de *Natural Product Atlas*. Proyección basada en descriptores ECFP4 agrupado por origen biológico.

Al analizar esta distribución según el origen de los metabolitos, se revelaron agrupaciones congruentes con la naturaleza biosintética de cada grupo.

Por un lado, se observó la formación de un clúster denso de compuestos fúngicos centrado en las coordenadas (0, 2), que refleja la tendencia de los hongos a generar

variaciones de grupos funcionales sobre andamios moleculares altamente conservados (Ertl y Schuffenhauer, 2008).

En contraste, los metabolitos bacterianos mostraron una distribución mucho más extensa a lo largo del CP1, mostrado en la Figura 34. Esta dispersión muestra la presencia de un clúster bacteriano aislado en las coordenadas (4.5, 0), mostrando estructuras similares. En conjunto, este mapeo demuestra que la biblioteca abarca dominios químicos amplios y complementarios (Medema y Fischbach, 2015).

Al proyectar el espacio químico de *DrugBank* mediante PCA (Figura 35), se observó una distribución densamente homogénea, sin formación de clústeres evidentes entre fármacos aprobados, experimentales o en investigación (Knox y col., 2024).

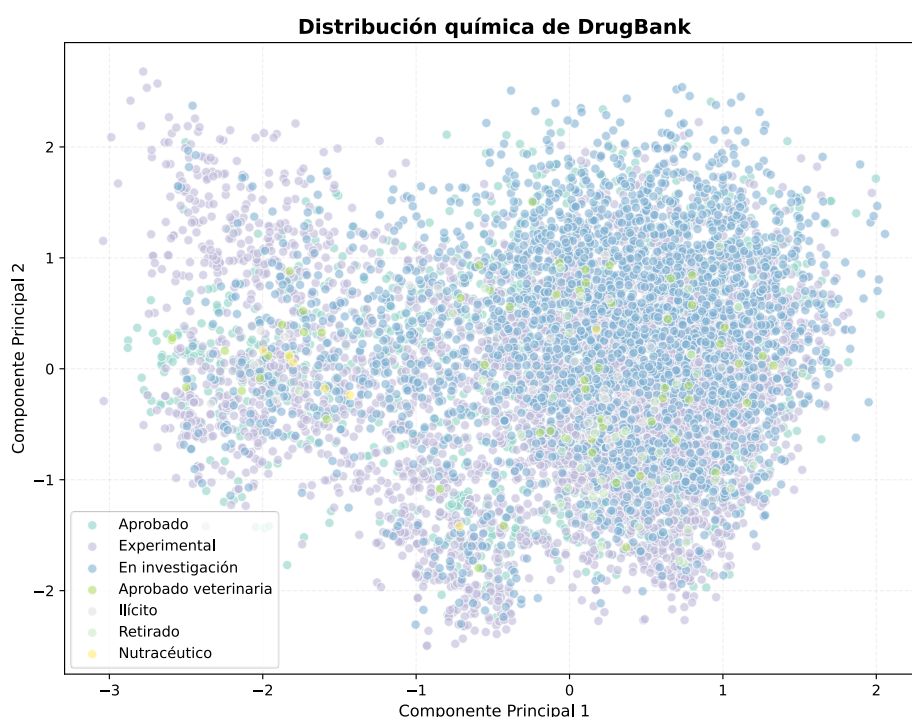


Figura 35. Análisis PCA del espacio químico de *DrugBank*. Proyección basada en descriptores ECFP4 agrupado por clasificación clínica.

A diferencia de los productos naturales, esta superposición refleja el diseño racional dictado por la química farmacéutica, al optimizar las moléculas para cumplir con estrictos parámetros farmacocinéticos (ADME), el espacio químico se comprime intencionalmente hacia un dominio compartido de propiedades *Drug-Likeness*

(Mignani y col., 2016). En el contexto de esta investigación, este resultado es ideal, pues garantiza que cualquier ligando identificado contra MRP4 provendrá de un espacio químico clínicamente estudiado en el caso de los fármacos aprobados, asegurando un perfil de seguridad y eficacia definidos.

VI.2.1 Depuración empleando quimioinformática

La Figura 36 resume la selección en cascada de las quimiotecas NPA (36,454 compuestos) y *DrugBank* (9,125).

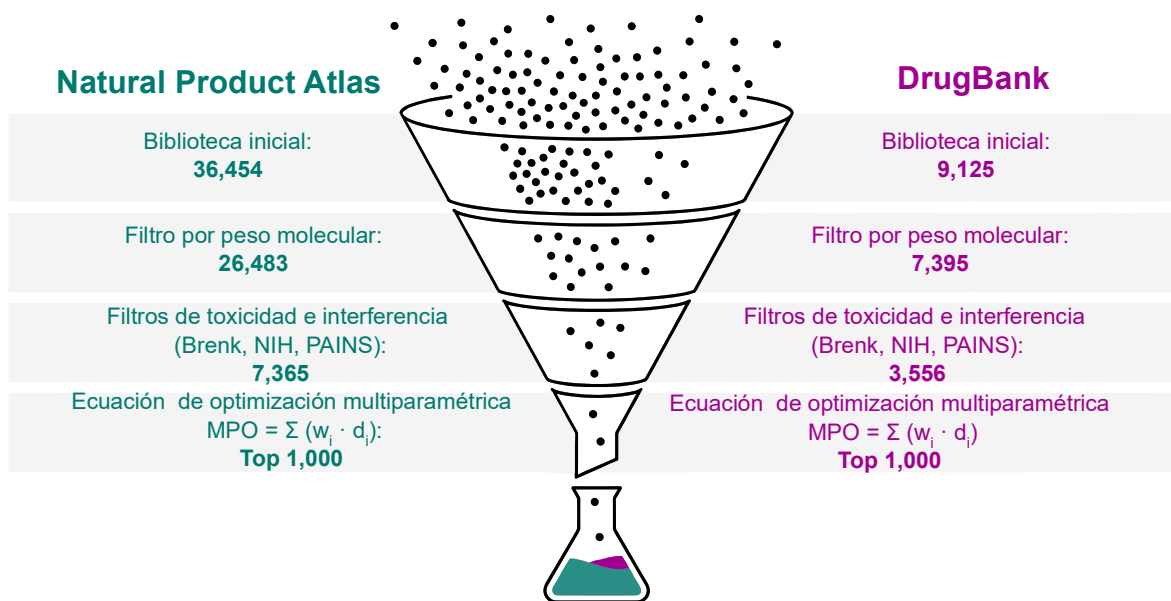


Figura 36. Proceso de selección jerárquica y depuración estructural de ligandos prospectivos dirigidos a MRP4.

La primera etapa consistió en un filtro de peso molecular, un parámetro indispensable en el diseño de fármacos para garantizar perfiles farmacocinéticos favorables, tales como una adecuada permeabilidad en membranas celulares y buena biodisponibilidad oral. Este enfoque también facilita la identificación de *scaffolds* novedosos capaces de unirse a MRP4, conservando un margen de peso molecular amplio para futuras etapas de optimización estructural. En esta fase, ambas colecciones experimentaron una pequeña reducción de tamaño: NPA se redujo a 26,483 moléculas, mientras que *DrugBank* se ajustó a 7,395. Posteriormente, se aplicaron los filtros de toxicidad e interferencia (Brenk, NIH,

PAINS), cuya importancia radica en descartar alertas estructurales que puedan generar reactividad inespecífica o falsos positivos en experimentos. Esta etapa representó la mayor reducción cuantitativa: NPA se redujo a 7,365 compuestos, mientras que *DrugBank* se depuró hasta retener 3,556 moléculas. Finalmente, la función de Optimización Multiparamétrica (MPO) permitió ponderar las propiedades de las moléculas restantes para extraer estrictamente el Top 1,000 de cada biblioteca, con los mejores perfiles fisicoquímicos para avanzar a la fase de acoplamiento molecular.

VI.3.1 Validación del *Ensemble Docking*

El análisis de las curvas ROC (Figura 37) corroboró la alta capacidad discriminadora de las tres estructuras evaluadas. La robustez de esta validación retrospectiva se sustenta por un diseño de *cross-docking* y la eliminación reducida de sesgos garantizada al preparar los ligandos co-cristalizados de *novο* para evitar que conservaran su conformación tridimensional original.

El área bajo la curva ROC (AUC) indica la capacidad del modelo para distinguir entre clases, específicamente, representa la probabilidad de que el modelo clasifique mejor a un ligando (activo) que un decoy (inactivo) seleccionado aleatoriamente (Google, 2026).

Estadísticamente, el modelo 8IZ7 (MRP4-sulindac) exhibió el desempeño superior (AUC = 90.4), seguido por 9KRM (87.1) y 8ZBU (83.3) (Huang y col., 2023; X. Wen y col., 2025; Z. Xie y col., 2025). Alcanzar métricas con un AUC superior a 80 en las tres dianas demuestra un buen rigor metodológico para identificar verdaderos inhibidores de MRP4 frente a diferentes conformaciones del sitio de unión (Tabla 4).

Tabla 4. Interpretación de los valores del Área Bajo la Curva (Trifonova y col., 2014).

Valor AUC (%)	Calidad de la Prueba	Interpretación
90 – 100	Excelente	Discriminación sobresaliente, altamente confiable.
80 – 89	Muy buena	Discriminación muy efectiva, rendimiento robusto.
70 – 79	Buena	Discriminación aceptable, pero con margen de optimización.
60 – 69	Satisfactoria	Discriminación débil, poca diferencia sobre el azar.
50 – 59	Insatisfactoria	Sin capacidad discriminadora, equivalente a una clasificación aleatoria.

Estas diferencias en el perfil de reconocimiento aportan afinidades y modos de unión complementarios, justificando su integración mediante *ensemble docking* para capturar la movilidad del transportador.

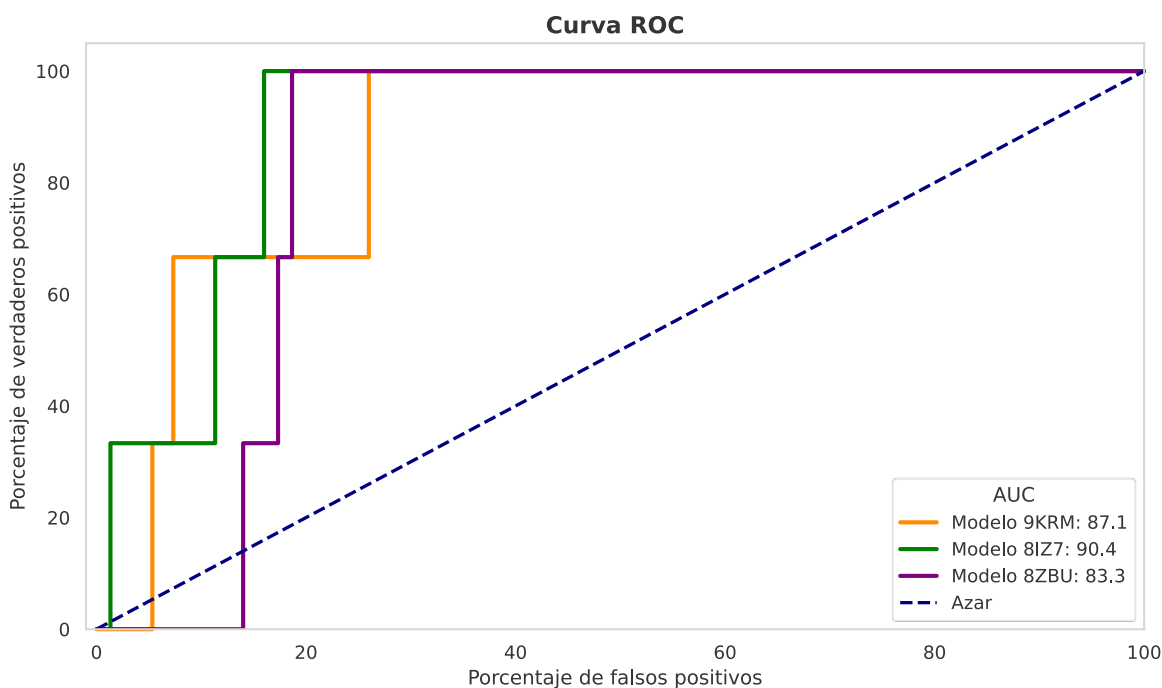


Figura 37. Curvas ROC semilogarítmicas para la evaluación del rendimiento de clasificación de los modelos 9KRM, 8IZ7 y 8ZBU.

El rendimiento del protocolo de *ensemble docking* en las etapas iniciales, se muestra de manera gráfica mediante el conjunto de curvas ROC semilogarítmicas (Figura 38). Es crucial que en esta evaluación los modelos alcancen un enriquecimiento temprano significativo frente a su proporción de señuelos (50 señuelos por cada ligando activo), esta información permite confirmar que los modelos no operan por azar, sino que logran identificar y posicionar las interacciones verdaderas de sus ligandos por encima del ruido generado por los señuelos.

Desde una perspectiva estructural, el modelo con PDB 8IZ7 (MRP4-sulindac) exhibió la topología más favorable para el enriquecimiento temprano, alcanzando el mayor Log AUC (40.2). Este valor sugiere que la topología del bolsillo de MRP4 inducida por el sulindac permite una rápida identificación estructural de verdaderos sustratos activos frente a los señuelos en las primeras fracciones de la búsqueda.

De manera sinérgica, la conformación 9KRM (MRP4-metotrexato) demostró un perfil de selectividad competitivo (Log AUC = 33.3), reafirmando la capacidad de estos estados conformacionales para posicionar rápidamente a sustratos que puedan potencialmente inhibir a MRP4.

Aunque la estructura 8ZBU (MRP4-Lapatinib) presentó una dinámica de priorización inicial más conservadora (Log AUC = 26), esta aparente asimetría se debe a la longitud de lapatinib, debido a que es la molécula más larga y flexible de todas y su modo de unión es distinto al de los activos anteriores, esta diversidad justifica su uso en la estrategia de *ensemble docking*. La divergencia en los valores de LogAUC prueba que los cristales abordan el espacio del bolsillo de unión desde perspectivas conformacionalmente distintas, evitando la redundancia

Este análisis refleja el poder predictivo temprano de cada modelo, indicando la probabilidad de encontrar exitosamente ligandos activos al evaluar únicamente la fracción correspondiente al 15 % superior del conjunto de datos analizado.

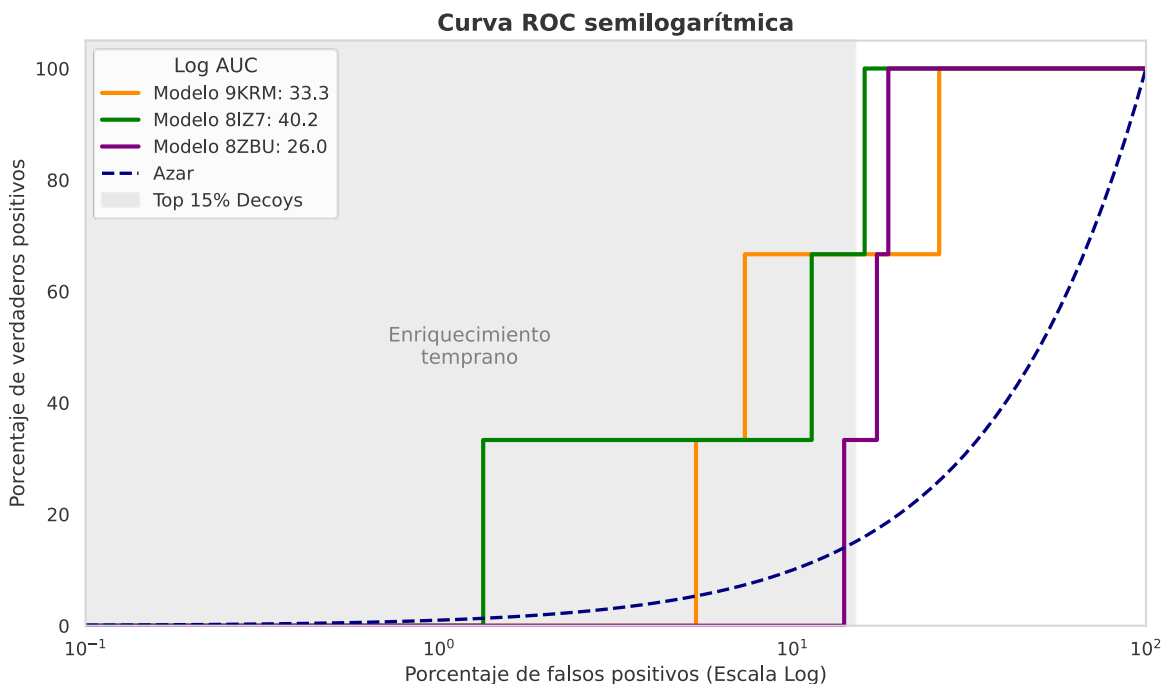


Figura 38. Curvas ROC semilogarítmicas para la evaluación del enriquecimiento temprano en los modelos de MRP4

A diferencia de las conformaciones previas, validadas frente a sustratos más rígidos como sulindac y metotrexato, la estructura con PDB 8IZ9 representa el estado de reconocimiento de uno de sus sustratos endógenos, la prostaglandina E1 (PGE1). Debido a esta discrepancia bioquímica, su validación se abordó de manera independiente mediante un análisis independiente. El objetivo de esta evaluación no fue integrarla como un filtro selectivo primario, sino permitir la exploración de una topología de bolsillo adicional.

La distribución en el diagrama de violín observado en la Figura 39 revela que PGE1 se posiciona cerca de la mediana de la puntuación de los señuelos. Este comportamiento es una consecuencia directa de la naturaleza estructural del ligando. A diferencia de los sustratos exógenos, PGE1 es una molécula lipídica altamente flexible con una elevada cantidad de enlaces rotables y carente de subestructuras aromáticas rígidas.

Los algoritmos de acoplamiento imponen penalizaciones a ligandos con alta flexibilidad conformacional, lo que dificulta su puntuación frente a señuelos más

rígidos que logran minimizar su energía con facilidad. En este contexto, la integración de este modelo al *ensemble docking* cumplió la función de diversificar el espacio de búsqueda.

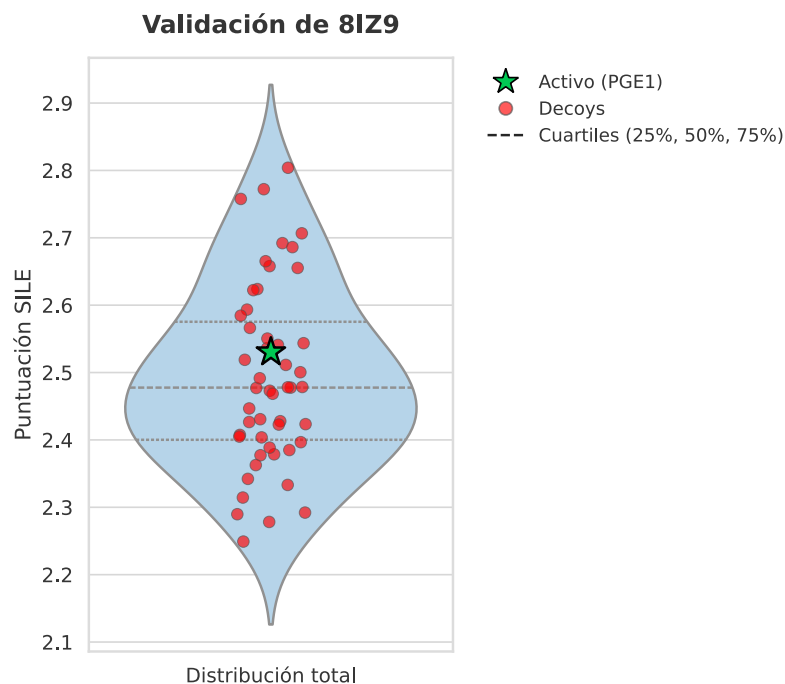


Figura 39. Gráfico de violín para la evaluación de la capacidad discriminativa del modelo 8IZ9

VI.4.1 *Ensemble Docking* y análisis de las interacciones

La Tabla 5 resume el perfil de los ligandos priorizados tras el proceso de *ensemble docking*, los datos completos del top 15 % de ambas bibliotecas se detallan en la sección de Anexos (9.3.1 y 9.3.2).

La selección final se fundamentó en un consenso estricto de tres métricas: *docking score*, el SILE y la puntuación predictiva mediante redes neuronales convolucionales de GNINA (*CNN score*).

Tabla 5. Resultados de ensemble docking para los ligandos seleccionados de *Natural Product Atlas* y *DrugBank* frente a MRP4. Los valores de *Docking score* se presentan en kcal/mol.

ID	Propiedad	Conformación de MRP4			
		8IZ7	8ZBU	9KRM	8IZ9
<i>Natural Product Atlas</i>					
NPA013206	<i>Docking score</i>	-11.25	-11.87	-10.39	-11.47
	SILE	3.67	3.87	3.39	3.74
	CNN score	0.80	0.86	0.91	0.82
NPA029076	<i>Docking score</i>	-9.27	-9.54	-8.95	-9.61
	SILE	3.28	3.38	3.16	3.40
	CNN score	0.89	0.88	0.92	0.86
NPA026693	<i>Docking score</i>	-9.02	-7.87	-9.88	-9.21
	SILE	3.32	2.89	3.63	3.38
	CNN score	0.81	0.88	0.96	0.82
<i>DrugBank</i>					
42611257	<i>Docking score</i>	-9.37	-8.94	-8.88	-9.05
	SILE	3.28	3.13	3.11	3.17
	CNN score	0.79	0.83	0.79	0.83
5281040	<i>Docking score</i>	-9.58	-9.60	-9.38	-10.41
	SILE	3.14	3.15	3.07	3.42
	CNN score	0.85	0.86	0.81	0.81
5291	<i>Docking score</i>	-9.10	-9.21	-9.69	-10.08
	SILE	3.08	3.12	3.28	3.41
	CNN score	0.86	0.85	0.86	0.80

Dentro de la colección NPA, el compuesto aspergilazina A (NPA013206) se consolidó como el candidato más sobresaliente. Este ligando exhibió la mayor afinidad termodinámica global del estudio (*docking score* entre -10.39 y -11.87 kcal/mol en todo el ensamble), en conjunto con valores SILE (>3.39) que confirman que su *docking score* de unión no es un artefacto de un gran volumen molecular, sino producto de una alta especificidad y complementariedad geométrica por la cavidad del bolsillo de unión de MRP4.

De manera paralela, los compuestos aspergicandidusina A (NPA029076) y enhipirazinona A (NPA026693) demostraron perfiles sólidos, destacando este último por su excelente puntuación tridimensional en la conformación 9KRM (*CNN score* = 0.96). Su estructura molecular se muestra en la Figura 40.

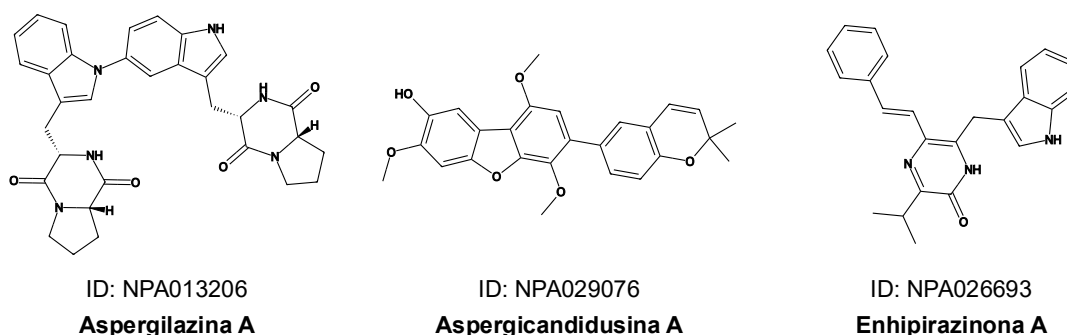
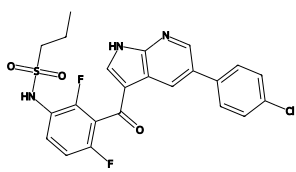
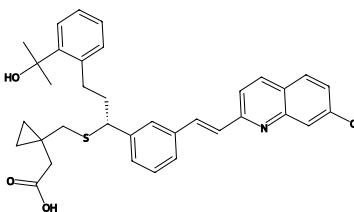


Figura 40. Estructuras químicas 2D de los ligandos seleccionados de *Natural Product Atlas*.

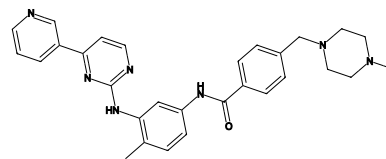
Por parte de la quimioteca *DrugBank*, los compuestos priorizados revelaron dinámicas de reconocimiento complementarias. Mientras que el compuesto vemurafenib (42611257) mantuvo valores de *docking score* consistentes en las cuatro dianas, los candidatos montelukast (5281040) e imatinib (5291) mostraron un notable incremento en su rendimiento al ser evaluados contra la conformación 8IZ9 (alcanzando valores de *docking score* de -10.41 y -10.08 kcal/mol, y métricas SILE > 3.41) que se muestran en la Figura 41.



ID: 42611257
Vemurafenib



ID: 5281040
Montelukast



ID: 5291
Imatinib

Figura 41. Estructuras químicas 2D de los ligandos seleccionados de *DrugBank*.

Para garantizar que la capacidad de unión de los ligandos fuera traducida en una inhibición potencialmente real, se analizó exhaustivamente la red de interacciones cristalográficas de MRP4, estos resultados se muestran en la sección de Anexos (9.3.3 y 9.3.4).

En la Figura 42 se revela un claro patrón entre sustratos e inhibidores. Mientras que todos los sustratos comparten una red de anclaje basal: Phe324, Leu363, Leu367 y Trp995 (resaltados en negritas). Los inhibidores coinciden en dos residuos críticos para el bloqueo funcional del transportador: His152 y Met992 (resaltados en rojo).

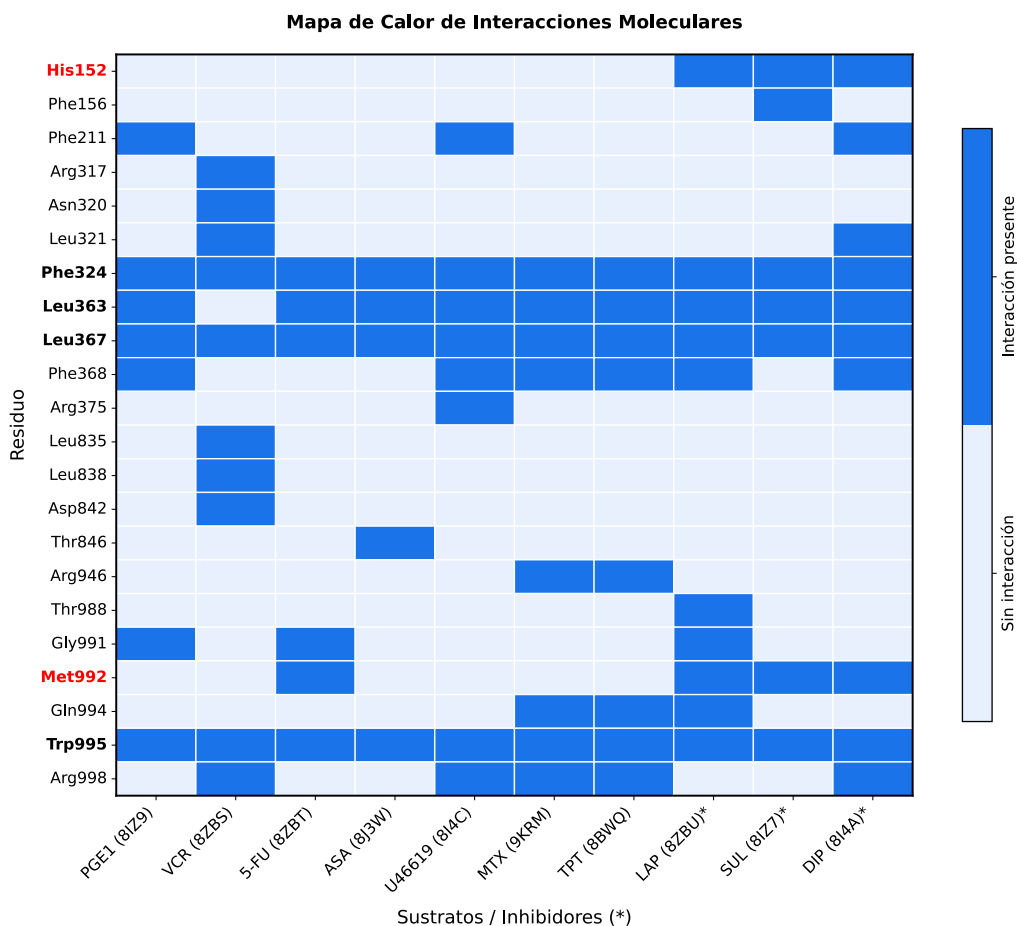


Figura 42. Perfil de interacciones de sustratos e inhibidores de referencia en estructuras de MRP4 resueltas por Cryo-EM. La red de anclaje basal se resalta en negritas, mientras que los residuos críticos para la inhibición se resaltan en rojo.

Con este patrón de interacciones definido, se evaluó la unión de los compuestos priorizados. Se verificó visualmente que los candidatos no solo se acoplaran en la red basal de anclaje, sino que interactuaran con los residuos exclusivos de inhibidores (LAP = Lapatinib, SUL = Sulindac, DIP = Dipiridamol), asegurando que potencialmente son capaces de replicar las interacciones moleculares necesarias para bloquear competitivamente a MRP4.

VI.5.1 Simulación de los ligandos de NPA

VI.5.1.1 Aspergilazina A

El análisis de dinámica molecular del complejo con aspergilazina A muestra un comportamiento consistente con un proceso de reacomodo conformacional posterior al *docking*. En la Figura 43, el incremento inicial del RMSD durante los primeros 20 a 40 ns corresponde al movimiento de los aminoácidos y aspergilazina A ajustando su conformación a un estado estable. Posteriormente, la proteína alcanza una meseta alrededor de los 75 ns, indicando estabilidad estructural del sistema completo.

Las fluctuaciones del ligando reflejan una adaptación dinámica dentro del sitio de unión, las líneas tanto de la proteína como del ligando muestran cambios de RMSD similares, reflejando un fenómeno de ajuste inducido.

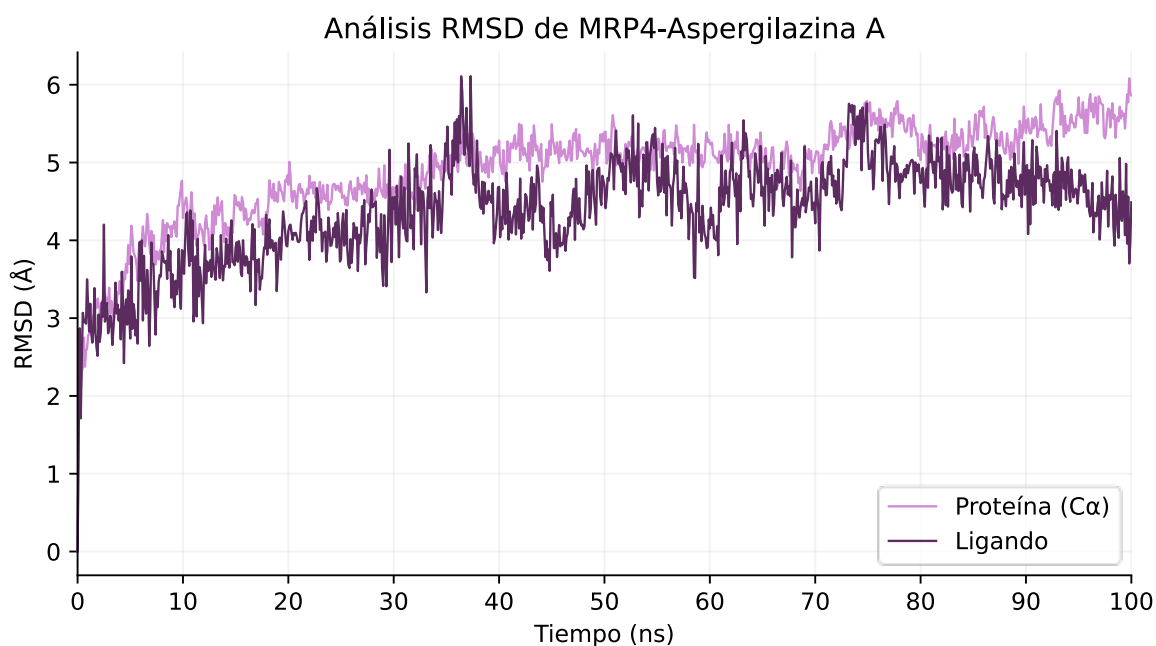


Figura 43. Gráfica RMSD del complejo MRP4WT-aspergilazina A.

El análisis de interacciones (Figura 44) evidencia contactos persistentes, principalmente hidrofóbicos con residuos aromáticos como Trp995, Phe324 y Arg362 complementados por interacciones con residuos exclusivamente

hidrofóbicos como Leu363 y Leu367. Además, presenta interacciones menores mediadas por agua que no contribuyen al anclaje principal.

Por otro lado, durante el tiempo de simulación se presentan contactos apenas perceptibles con aminoácidos clave como His152 y Met992. En conjunto los resultados indican que aspergilazina A forma un complejo estable con MRP4, donde el anclaje basal logra un comportamiento de ajuste inducido que logra estabilizar al complejo.

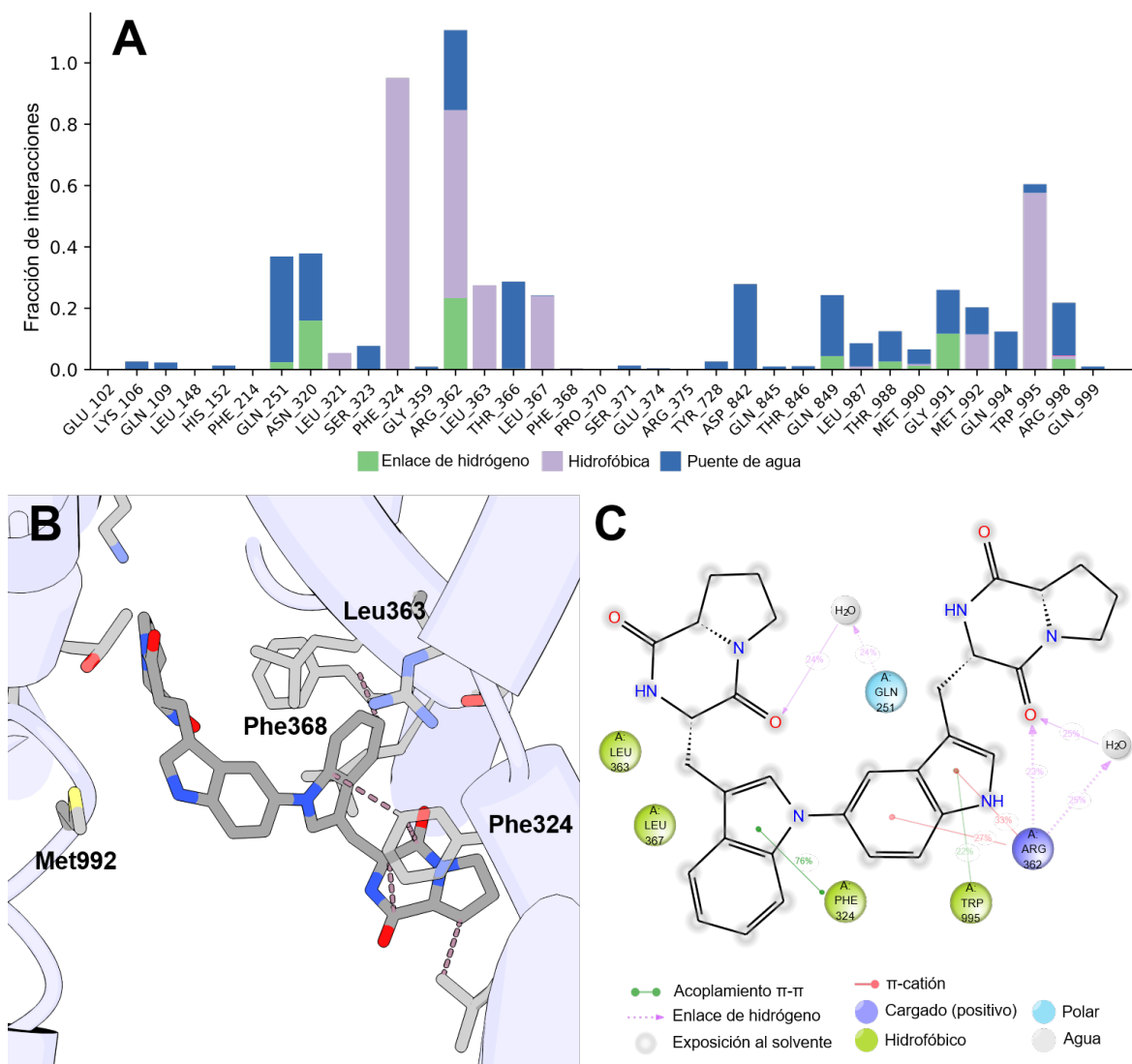


Figura 44. Análisis del complejo MRP4WT-aspergilazina A: (A) Interacciones, (B) Representación 3D, (C) Interacciones en 2D.

VI.5.2.1 *Aspergicandidusina A*

El análisis de la trayectoria de dinámica molecular del complejo con aspergicandidusina A revela un perfil estructural con cambios bruscos en los valores de RMSD. Al observar la evolución el gráfico se aprecia que mientras la estructura global de la proteína ($C\alpha$) alcanza una estabilización en torno a los 6 Å, el ligando exhibe fluctuaciones mayores alrededor de los 55, 80 y 85 ns, alcanzando desviaciones de hasta 7 Å. Sin embargo, es fundamental destacar que este comportamiento no es indicativo de un evento de disociación, puesto que en ningún momento el compuesto abandona el sitio de unión. Por el contrario, estas amplias variaciones en el RMSD son directamente atribuibles a una rotación completa de la molécula a los 55 y 65 ns, mientras que a los 85 ns la molécula se reacomoda totalmente en una nueva posición en el mismo sitio tras los cambios conformacionales previos. Estas fluctuaciones le permiten al ligando explorar de manera diversos sub-estados conformacionales y reacomodar su estructura de anillos aromáticos sin desprenderse del bolsillo de MRP4.

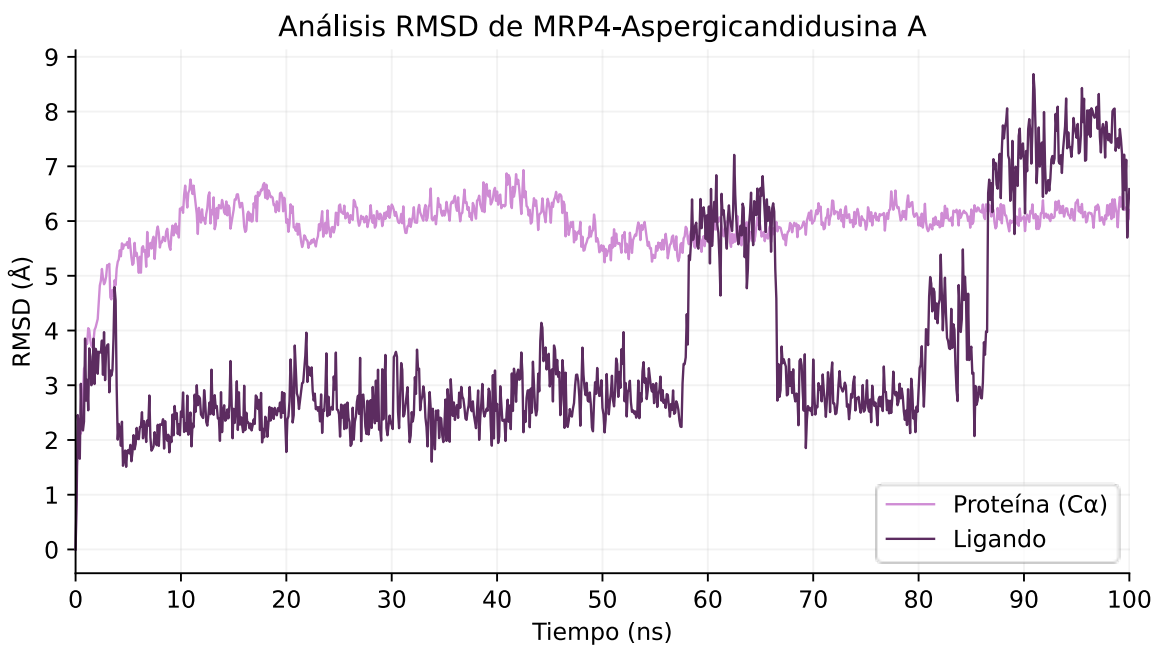


Figura 45. Gráfica RMSD del complejo MRP4WT-aspergicandidusina A.

A pesar de esta pronunciada movilidad interna, el análisis de interacciones demuestra que el ligando permanece firmemente sujeto al residuo central del sitio de unión Trp995, el cual sostiene interacciones hidrofóbicas y de acoplamiento π - π prácticamente todo el tiempo de la simulación. La participación conjunta de Leu367 y Leu363 permite levemente la retención del compuesto en la región central a través de interacciones puramente hidrofóbicas. Así mismo destaca la formación de interacciones puramente hidrofóbicas. Así mismo destaca la formación de interacciones π -catión con Arg998, el cual ancla la parte tricíclica del ligando en conjunto con Phe211. Finalmente, Phe368 interactúa con un acoplamiento π - π que estabiliza al ligando al final de la simulación.

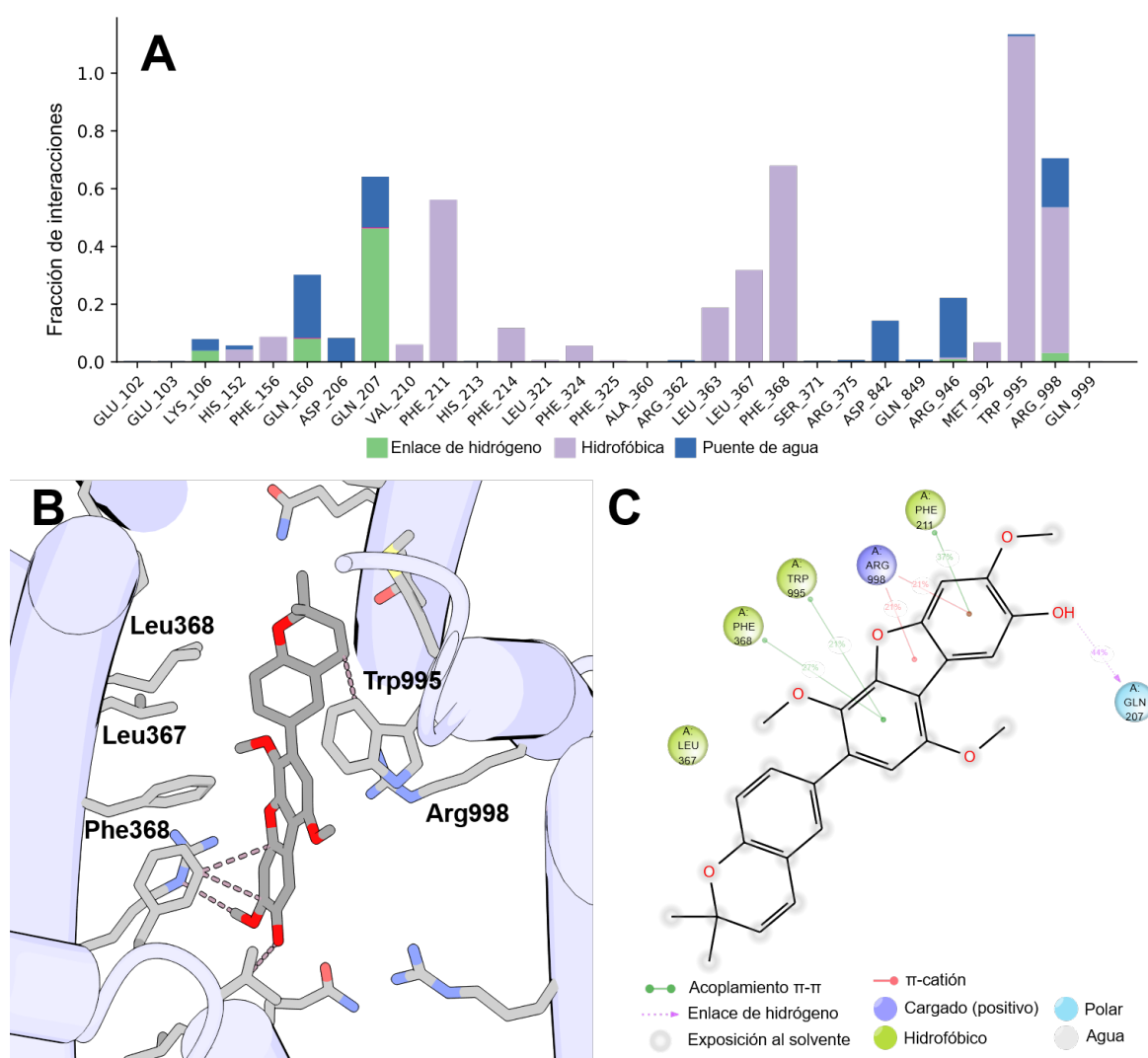


Figura 46. Análisis del complejo MRP4WT-aspergicandusina A: (A) Interacciones, (B) Representación 3D, (C) Interacciones en 2D.

VI.5.3.1 Enhypirazinona A

El análisis de dinámica molecular del complejo con enhypirazinona A muestra un comportamiento con pocas fluctuaciones en los valores de RMSD. En la Figura 47, se observa que la proteína experimenta un incremento gradual y posteriormente un acomodo estructural alrededor de los 50 ns, tras el cual alcanza una meseta estable.

Por su parte, las fluctuaciones mínimas del ligando (que oscilan entre 1.5 y 4 Å) se mantienen en un margen estrecho durante todo el tiempo de la simulación. Esto refleja que, si bien hay una adaptación de la proteína, el ligando logra resistir los movimientos del transportador, manteniéndose fuertemente asociado al sitio de unión.

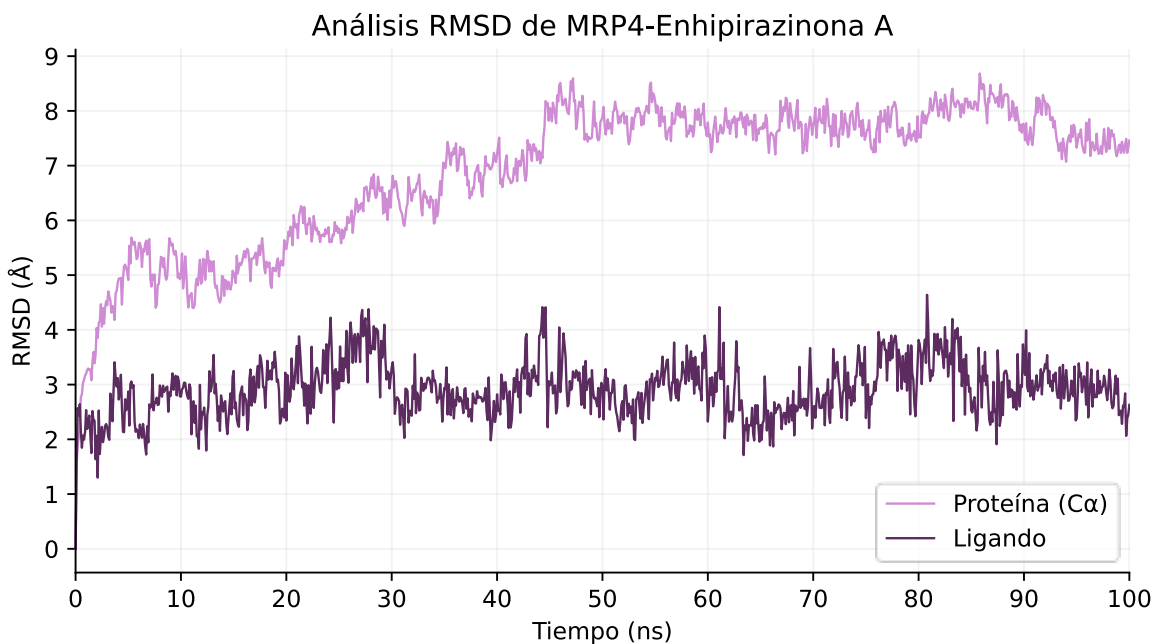


Figura 47. Gráfica RMSD del complejo MRP4WT-enhypirazinona A.

El análisis de interacciones que se observa en la Figura 48 muestra una red de contactos aromáticos persistentes y que explican esta estabilidad. El acomodo está fuertemente dirigido por interacciones π - π y π -catión con una serie de residuos aromáticos (Phe211, Phe368) y polares (Arg946).

Adicionalmente, residuos como Trp995, Phe368 y Leu367 contribuyen de manera secundaria a la estabilidad del complejo.

La conformación observada confirma un encaje tridimensional en el sitio de unión altamente hidrofóbico de MRP4. En conjunto, los resultados indican que enhyprazinona A forma un complejo sumamente estable a lo largo del tiempo gracias a una adaptación estructural de sus anillos aromáticos.

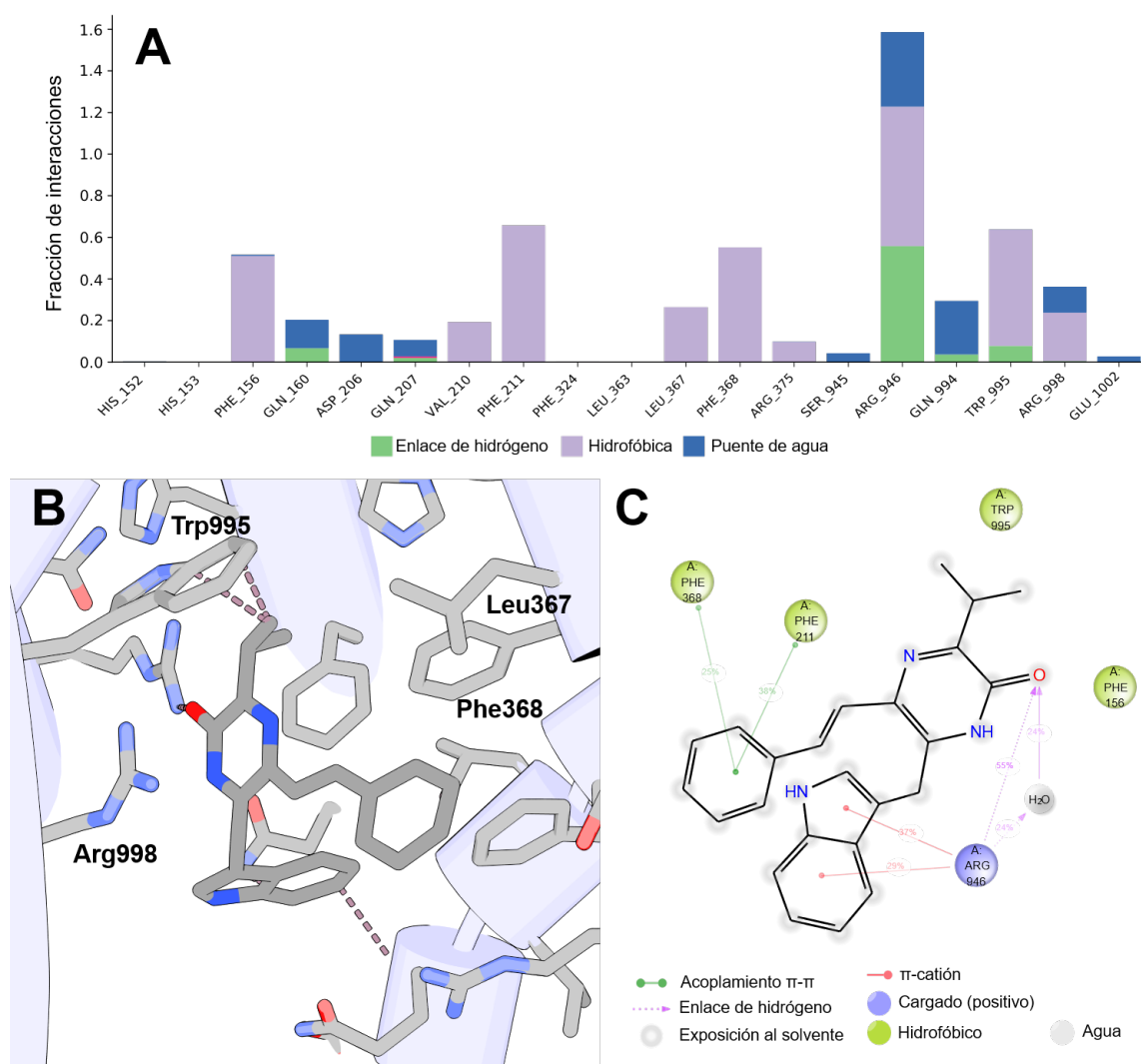


Figura 48. Análisis del complejo MRP4-enhyprazinona A: (A) Interacciones, (B) Representación 3D, (C) Interacciones en 2D.

VI.6.1 Simulación de los ligandos de DB

VI.6.1.1 Vemurafenib

El análisis de la trayectoria de dinámica molecular del complejo con vemurafenib ilustra un claro proceso de adaptación estructural, indicando que el proceso de dinámica molecular reveló un ajuste conformacional significativo respecto a la pose inicial de *docking*. La gráfica de RMSD de la Figura 49 muestra que alrededor de los 70 ns la molécula encuentra una conformación óptima y se estabiliza, formando una meseta sumamente estable en torno a los 4 Å que se mantiene inalterada hasta el final de la simulación.

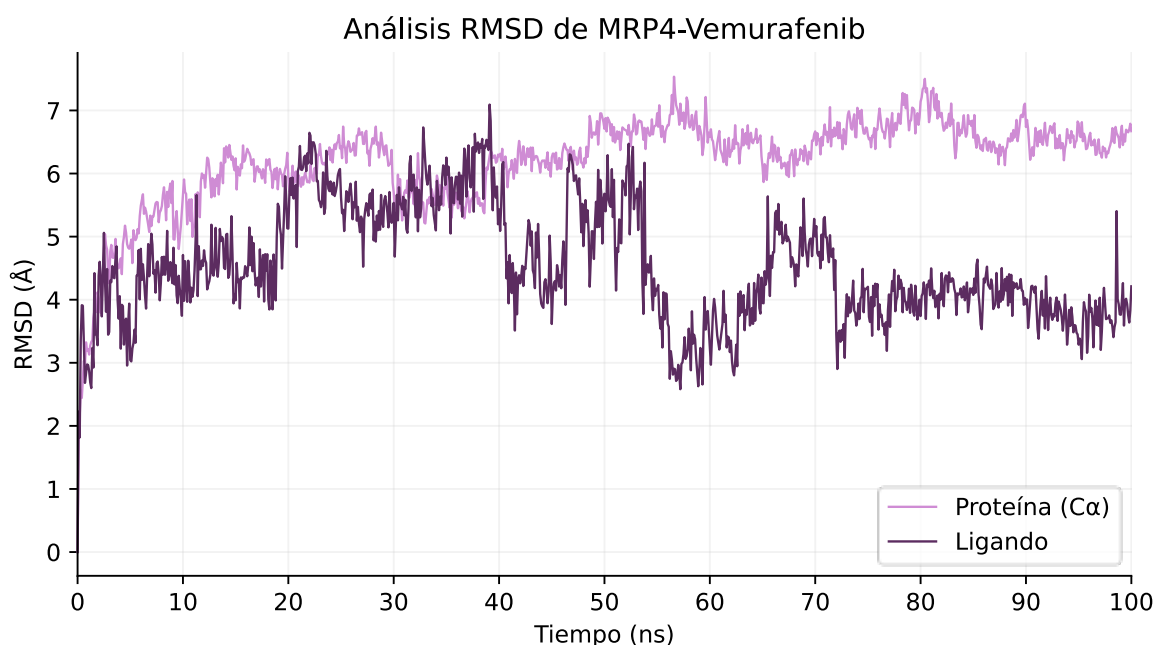


Figura 49. Gráfica RMSD del complejo MRP4WT-vemurafenib.

Este anclaje está sostenido principalmente por el núcleo hidrofóbico universal Trp995 mediante un fuerte acoplamiento π - π , que en conjunto con la interacción de puente de hidrógeno con Gln849 estabilizan la sección central de vemurafenib, mientras que Leu363 y Leu367 ayudan a estabilizar la cadena terminal alifática.

El grupo sulfonamida actúa como un ancla polar, formando enlaces de hidrógeno directos y mediados por agua con Thr366 y Asn320. Adicionalmente, se presentan

otras interacciones menores con Phe324 y Phe325. En conjunto este perfil refleja una inestabilidad dentro del bolsillo de MRP4, por lo que se requiere una simulación de un tiempo mayor para observar el comportamiento real de vemurafenib.

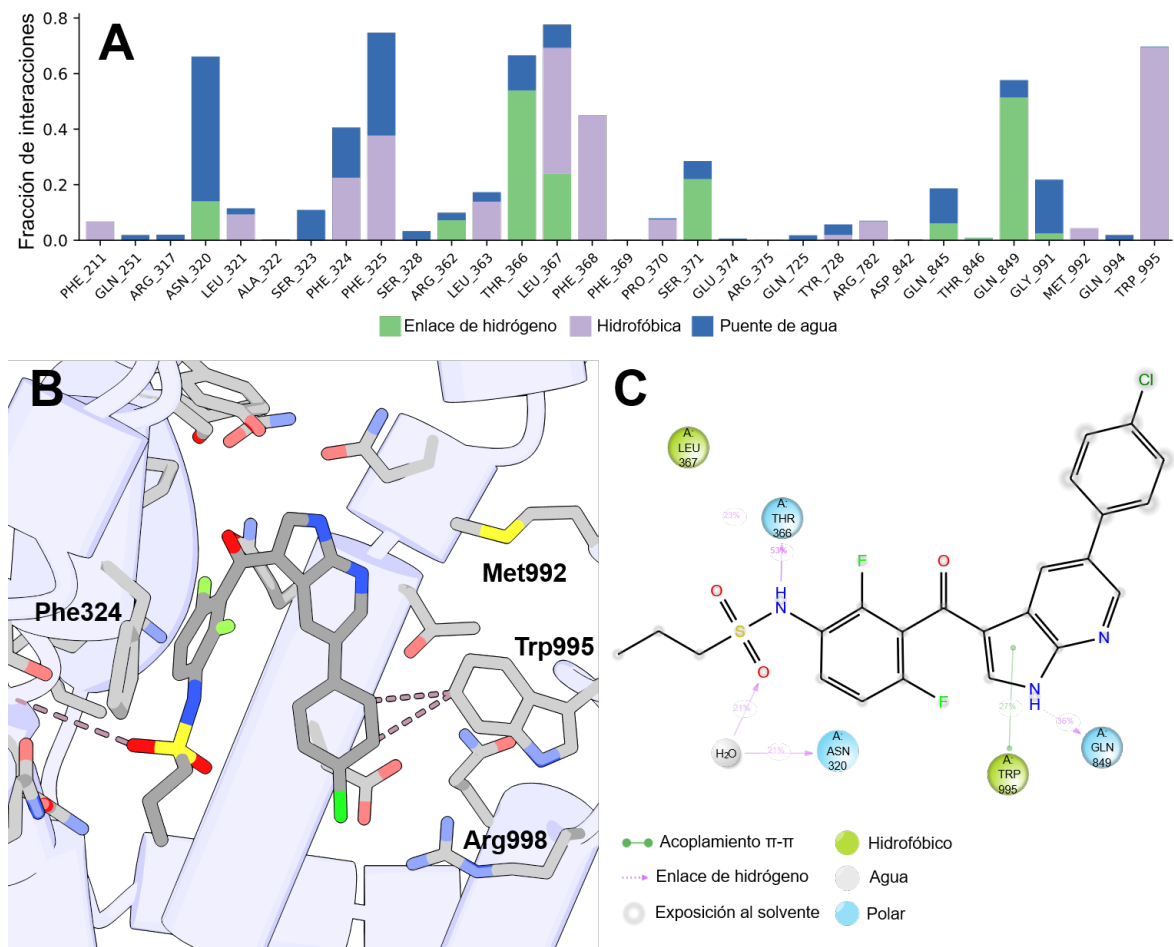


Figura 50. Análisis del complejo MRP4WT-vemurafenib: (A) Interacciones, (B) Representación 3D, (C) Interacciones en 2D.

El análisis de la trayectoria de dinámica molecular del complejo con el compuesto montelukast revela un claro proceso de búsqueda conformacional seguido de una firme estabilización a los 70 ns. Se aprecia que durante los primeros 70 ns el ligando experimenta fluctuaciones estructurales alcanzando desviaciones cercanas a los 3 Å, que corresponden a su reacomodo y adaptación dentro del sitio activo posterior al *docking*. La molécula encuentra una conformación óptima y formando una meseta

estable en torno a los 4 Å durante el último tercio de la simulación, confirmando su estabilidad dentro del bolsillo.

VI.6.2.1 Montelukast

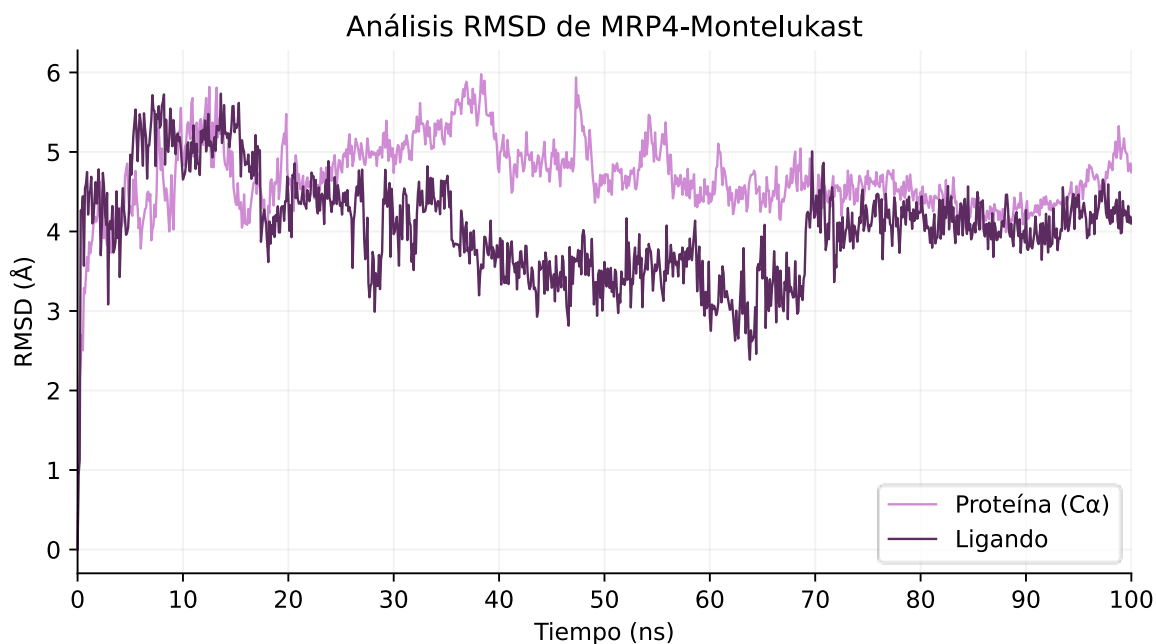


Figura 51. Gráfica RMSD del complejo MRP4WT-montelukast.

Esta estabilización final es el resultado de un anclaje mediado principalmente por puentes de hidrógeno (Arg998 y Gln999) y mediados por agua (Asp842). Entre otras interacciones hidrofóbicas se presenta Phe324, Arg362 y Trp995, así como interacciones basales con Leu363 y Leu367. Resulta de particular relevancia la interacción con el residuo Met992, dado que este aminoácido actúa es característico de ligandos con perfil inhibitorio.

Finalmente, la fuerte interacción de puente mediado por agua con Asp842 sugiere que el estado ionizado del ácido carboxílico del montelukast provoca una solvatación para estabilizar la carga negativa mediante el solvente. En conjunto estas interacciones muestran un perfil distinto al presentado por ligandos tradicionales de MRP4.

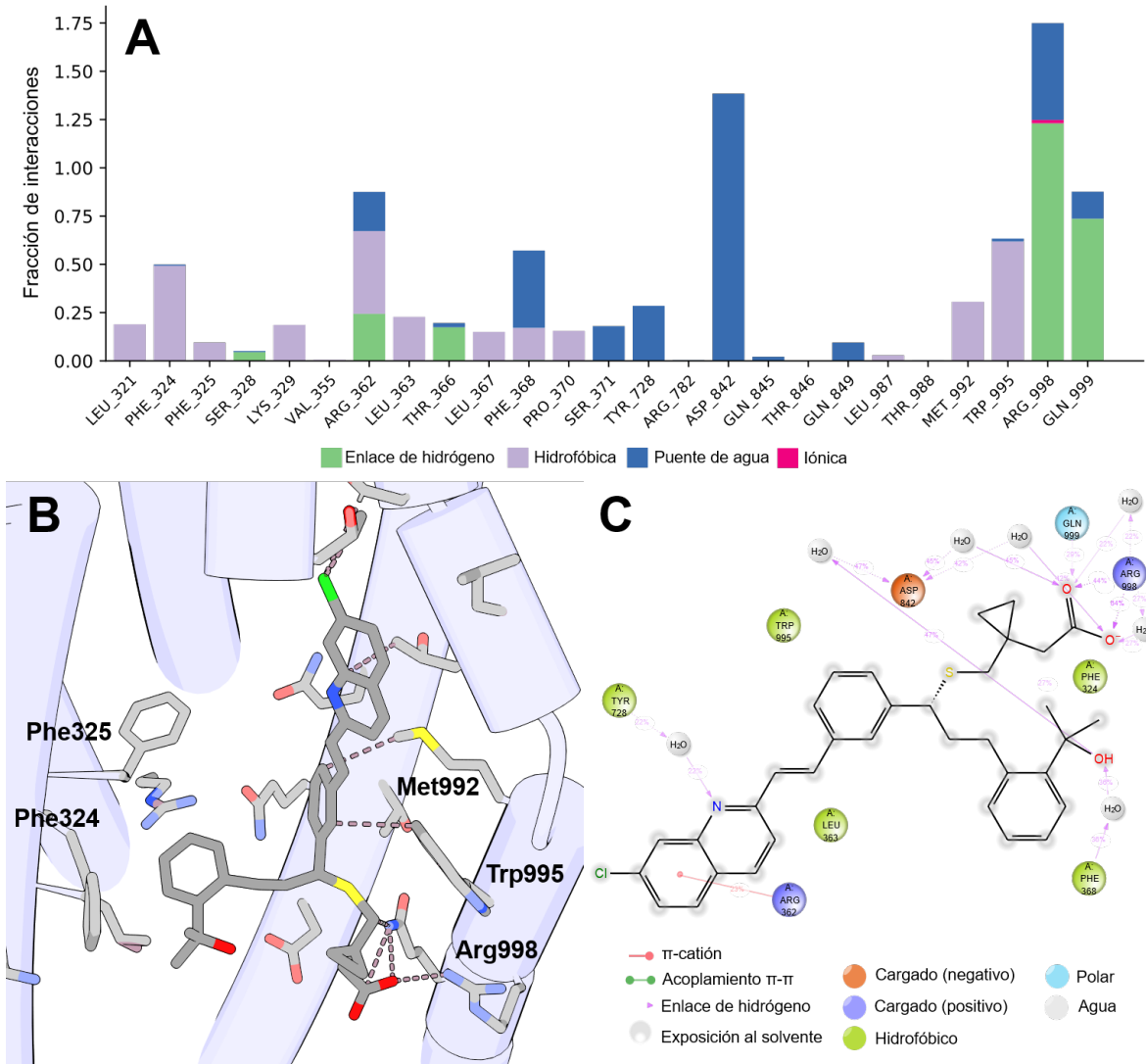


Figura 52. Análisis del complejo MRP4WT-montelukast: (A) Interacciones, (B) Representación 3D, (C) Interacciones en 2D.

VI.6.3.1 Imatinib

El análisis de la trayectoria del complejo con el compuesto imatinib revela un proceso de adaptación entre el complejo proteína-ligando que culmina en un estado altamente estable que comienza a los 55 ns. La gráfica de RMSD muestra que imatinib alcanza una meseta constante alrededor de los 4 Å que se mantiene hasta el final de la simulación, confirmando su fuerte afinidad por en el sitio activo de MRP4.

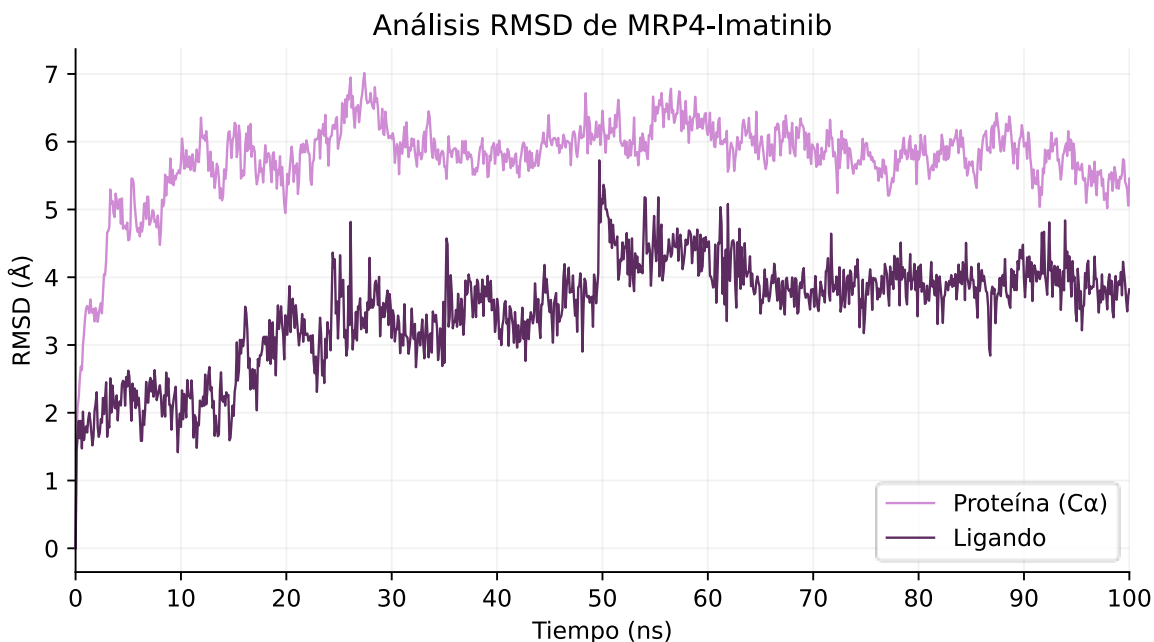


Figura 53. Gráfica RMSD del complejo MRP4WT-imatinib.

Esta estabilidad se sostiene por un fuerte anclaje con Trp995 mayormente por interacciones π - π e hidrofóbicas, de manera conjunta, la interacción con Arg362 ayuda a estabilizar la parte central de imatinib, ambos durante la totalidad de la simulación.

Por otro los anillos aromáticos ubicados en los extremos de la estructura del ligando se encuentran sostenidos por interacciones π - π con Tyr985 y Phe325, e hidrofóbicas con Phe324. De manera crucial, el análisis de interacciones muestra la participación de Met992, el cual es una interacción fuertemente asociada a los ligandos con un perfil inhibitorio.

Finalmente, Gln849 participa indirectamente con la estabilización de un puente mediado por agua, así como contactos directos con un puente de hidrógeno con el grupo amida de imatinib. Este perfil de interacciones refleja un potencial perfil inhibitorio para el bloqueo competitivo de MRP4.

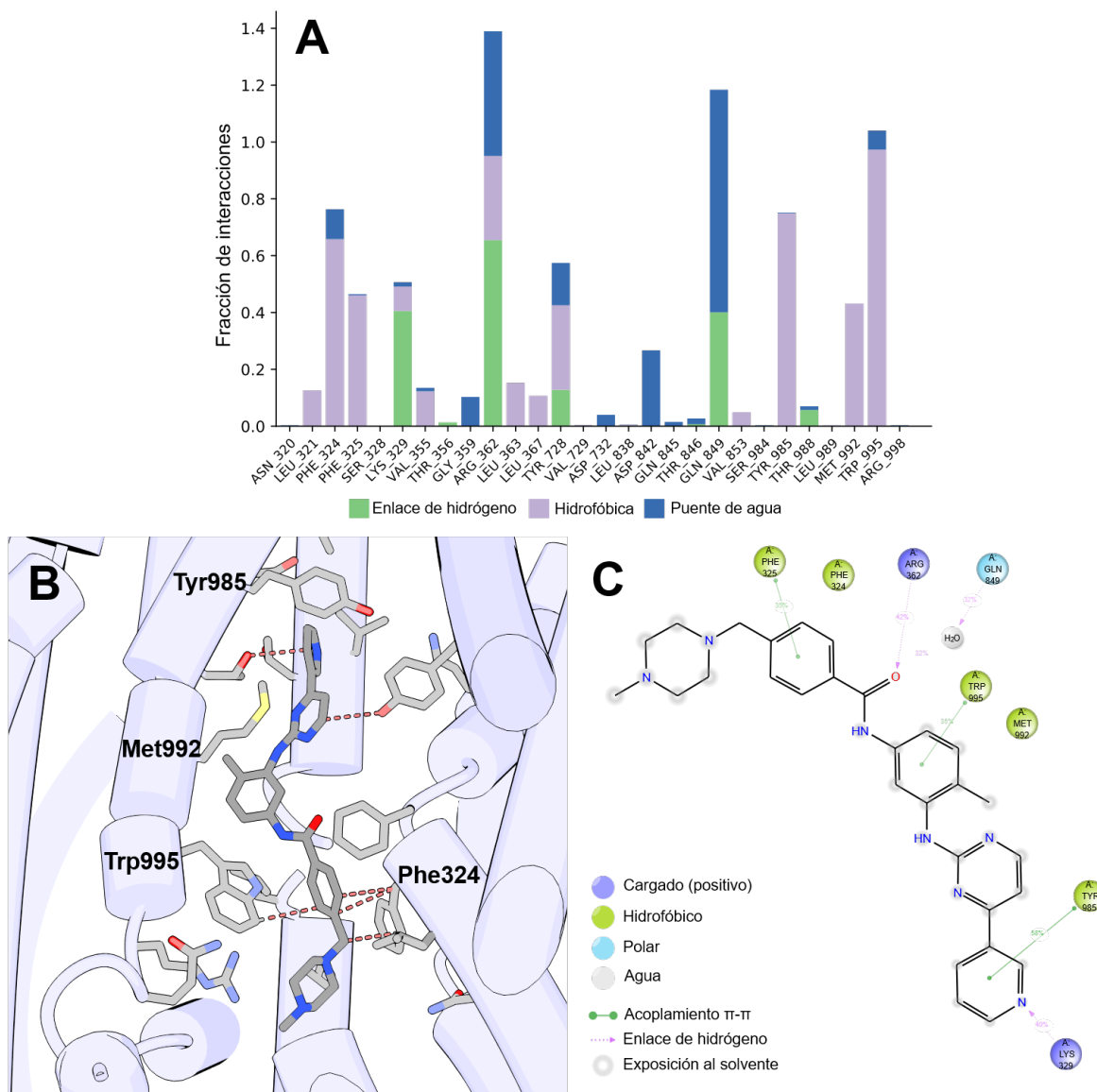


Figura 54. Análisis del complejo MRP4WT-imatinib: (A) Interacciones, (B) Representación 3D, (C) Interacciones en 2D.

VI.7.1 Afinidad teórica de los ligandos de NPA

VI.7.1.1 Aspergilazina A

El perfil de energía libre revela que aspergilazina A se estabiliza por debajo del bolsillo de MRP4, en su lugar, específicamente a 17.3 Å de distancia (respecto a la variable colectiva), logrando un acoplamiento termodinámicamente favorable con una afinidad teórica de -53.03 kcal/mol como se observa en la Figura 55C.

El mapa FES muestra una barrera energética de más de 50 kcal/mol situado a los 25 Å, evidenciando el alto costo energético para expulsar a aspergilazina A de esta zona del transportador. Su ubicación espacial (Figura 55A) muestra que comparte contactos residuos relevantes como Trp995 y Arg998. A pesar de lo anterior su afinidad teórica no es superior a ceefourin-1, por lo que es posible que actúe como un sustrato en condiciones fisiológicas.

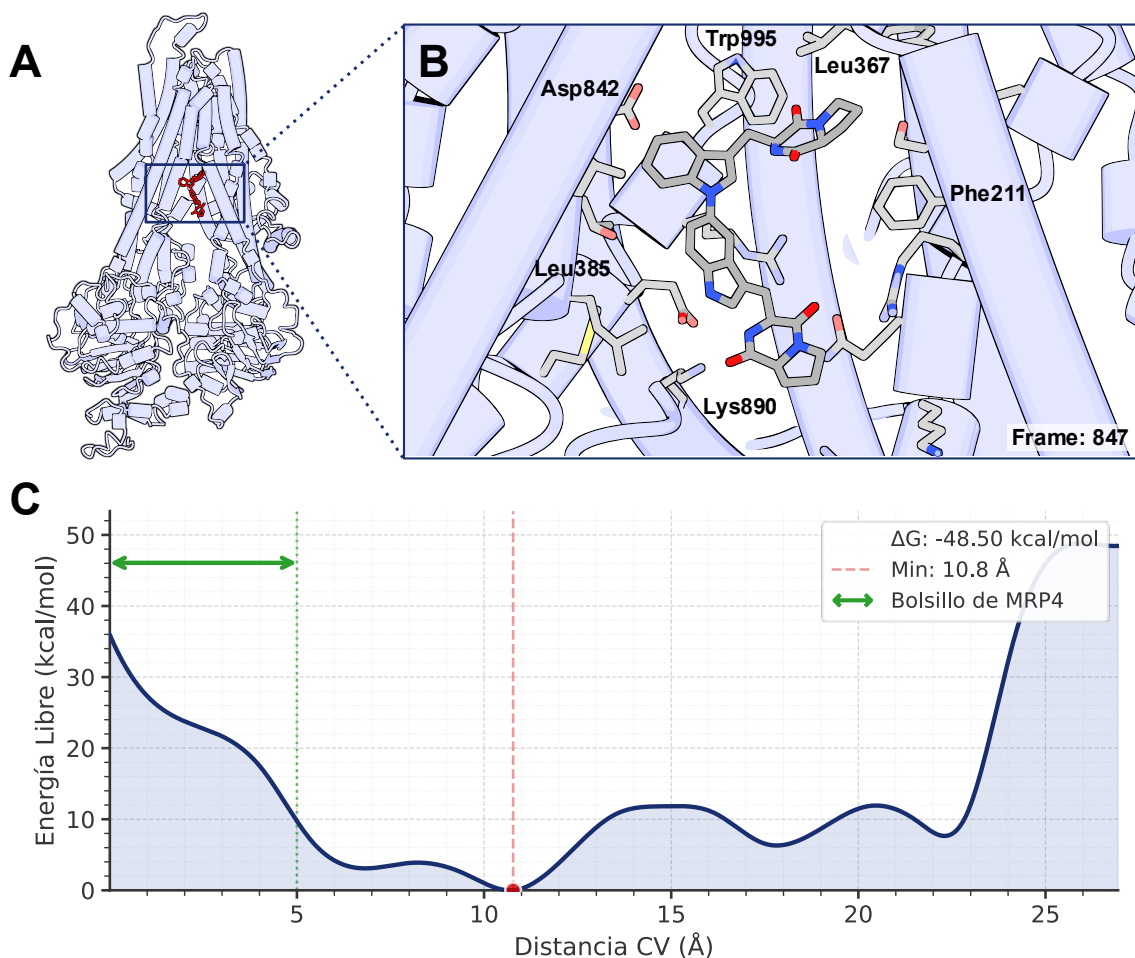


Figura 55. Perfil termodinámico de MRP4WT-aspergilazina A: (A) Ubicación general del complejo proteína-ligando. (B) Acercamiento a los residuos del estado de mínima energía. (C) Perfil FES de la simulación

VI.7.2.1 Aspergicandidusina A

El análisis del perfil de energía libre demuestra que aspergicandidusina A exhibe un evidente rechazo por el bolsillo principal del transportador, como se muestra en la

Figura 56C, la molécula se desplaza hasta encontrar su mínimo global de energía a una distancia de 21.3 Å. La Figura 56A demuestra que esta cavidad sitúa a aspergicandusina A en una región casi externa. Aunque presenta un mínimo energético de -33.48 kcal/mol coordinándose con residuos como Phe214 e Ile223, esta postura resulta poco favorable. La evidencia termodinámica sugiere que aspergicandusina A se comporta como un sustrato de MRP4.

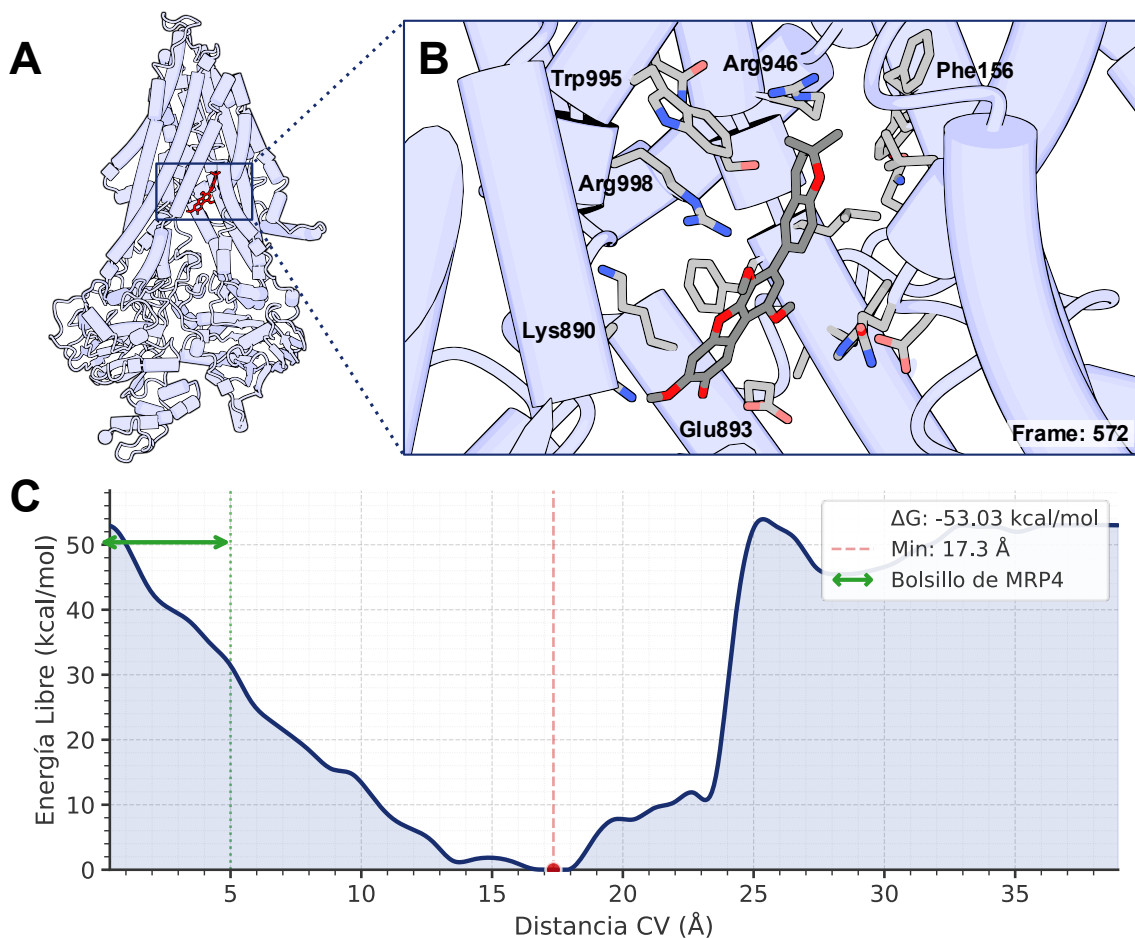


Figura 56. Perfil termodinámico de MRP4WT-aspergicandusina A: (A) Ubicación general del complejo proteína-ligando. (B) Acercamiento a los residuos del estado de mínima energía. (C) Perfil FES de la simulación

VI.7.3.1 Enhypirazinona A

El análisis del perfil de energía libre sugiere que enhypirazinona A no se estabiliza en el centro del bolsillo de unión clásico. El mínimo global de energía se encuentra a 10.8 Å, donde alcanza una afinidad teórica de -48.50 kcal/mol (Figura 57C). La inspección indica que esta coordenada sitúa a la molécula en una región interna, localizada por debajo de Trp995, que se muestra en la Figura 57B. Esta información sugiere de manera consistente que el anclaje a los 10.8 Å representa el estado de reposo más probable para el compuesto bajo las condiciones simuladas, sugiriendo que no podría mantenerse para bloquear la funcionalidad del transportador.

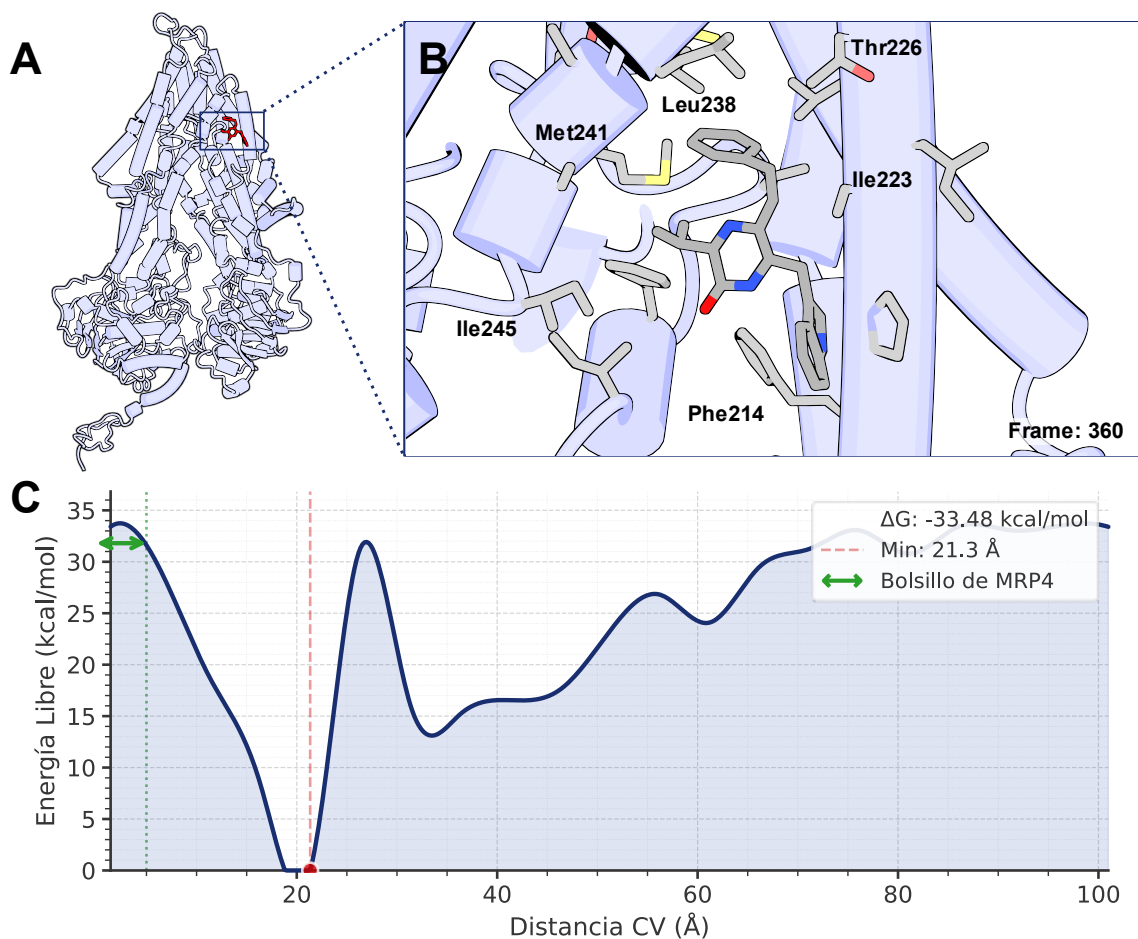


Figura 57. Perfil termodinámico de MRP4WT-enhypirazinona A: (A) Ubicación general del complejo proteína-ligando. (B) Acercamiento a los residuos del estado de mínima energía. (C) Perfil FES de la simulación

VI.8.1 Afinidad teórica de los ligandos de DB

VI.8.1.1 Vemurafenib

El análisis del perfil de energía libre de vemurafenib revela una marcada aversión termodinámica por el bolsillo de unión. El mínimo global se ubica a 20.2 Å (Figura 58C), con una afinidad teórica de -64.22 kcal/mol. La inspección estructural (Figura 58A) demuestra que esta coordenada se trata de una cavidad periférica, con un conjunto de residuos que incluyen a Leu835, Arg375, Arg650 y Lys827 mostrados en la Figura 58B. Este perfil sugiere que el compuesto posiblemente tendría un papel de sustrato.

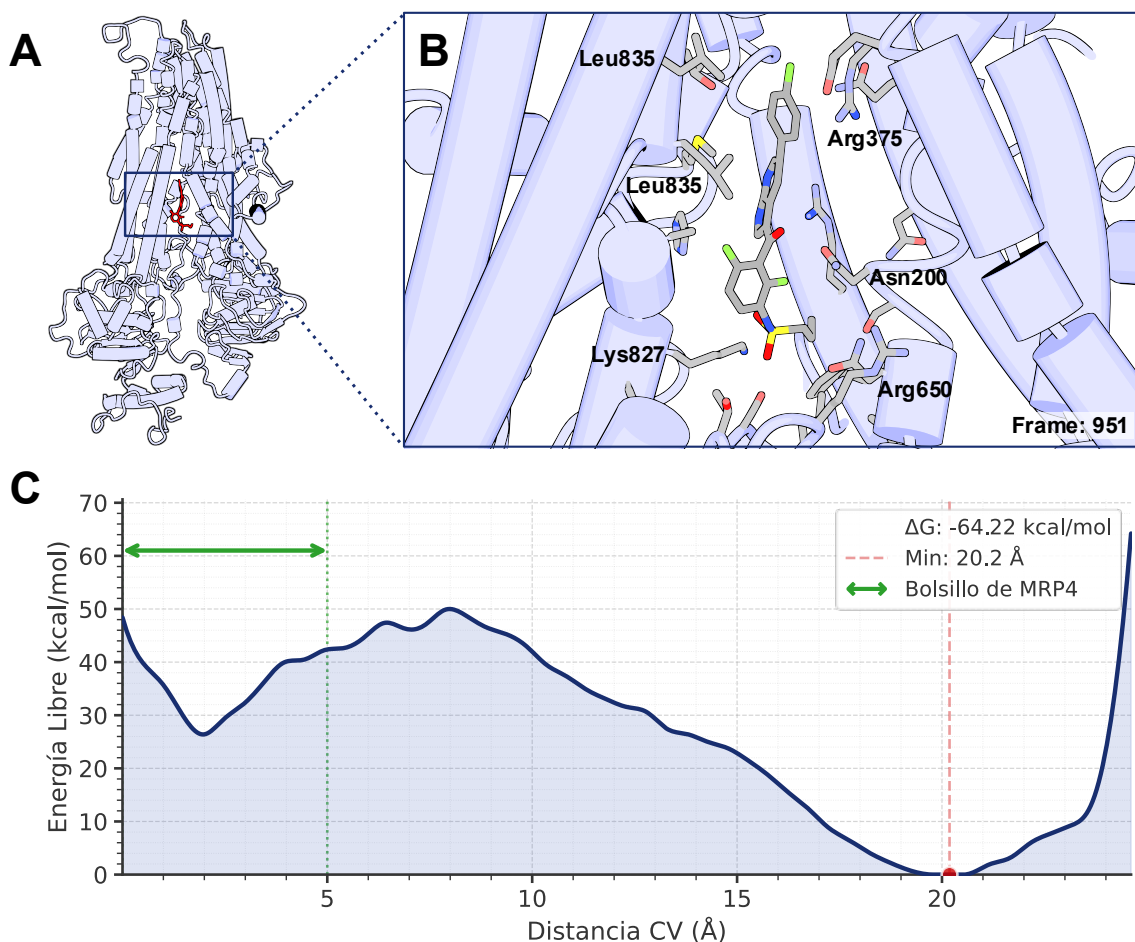


Figura 58. Perfil termodinámico de MRP4WT-vemurafenib: (A) Ubicación general del complejo proteína-ligando. (B) Acercamiento a los residuos del estado de mínima energía. (C) Perfil FES de la simulación

VI.8.2.1 Montelukast

El análisis del FES de montelukast muestra un mínimo global a una distancia pronunciada de 21.4 Å. Como lo revela la inspección estructural guiada por la posición del residuo central Trp995 (Figura 59B), esta coordenada ancla a la molécula por debajo del sitio activo (Figura 59A), con una afinidad teórica de -46.94 kcal/mol como se muestra en la Figura 59C. Montelukast exhibe barrera de activación alrededor de 24 Å, sin embargo, la afinidad teórica reportada sugiere que esta molécula no posee la capacidad de funcionar como un inhibidor de MRP4.

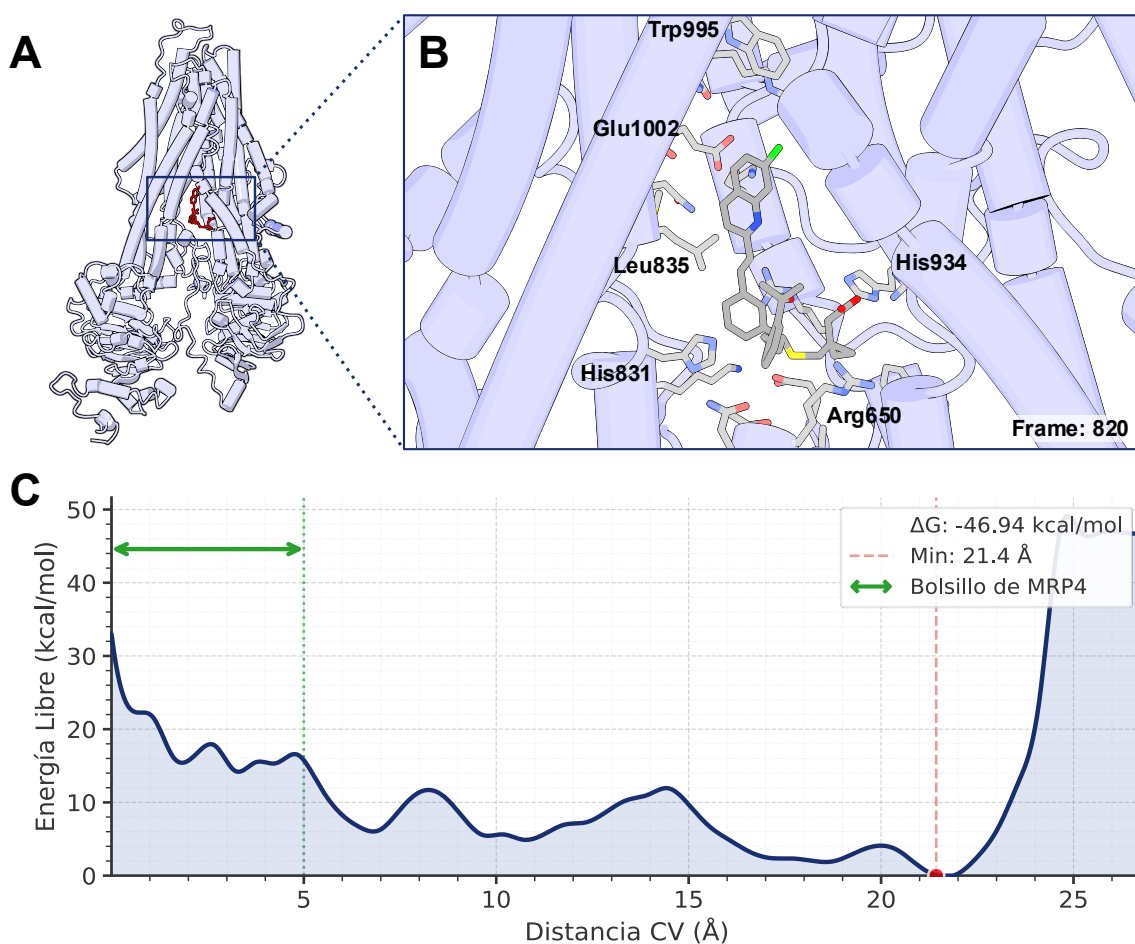


Figura 59. Perfil termodinámico de MRP4WT-montelukast: (A) Ubicación general del complejo proteína-ligando. (B) Acercamiento a los residuos del estado de mínima energía. (C) Perfil FES de la simulación.

VI.8.3.1 Imatinib

El análisis del perfil de energía libre de imatinib exhibe una elevada preferencia por el bolsillo de MRP4 mostrado en la Figura 60A. El mínimo global de energía se localiza a una distancia de 2.8 Å con una afinidad teórica de -64.55 kcal/mol de acuerdo con la Figura 60C. La inspección estructural corrobora este hallazgo, la molécula se coordina directamente con los residuos críticos del centro activo, tales como la Met992, Phe368 y Trp995 que se muestran en la Figura 60B. Los resultados en conjunto revelan que Imatinib se perfila como un potencial inhibidor competitivo muy robusto, justificado por su valor de energía libre superior al control ceefourin-1.

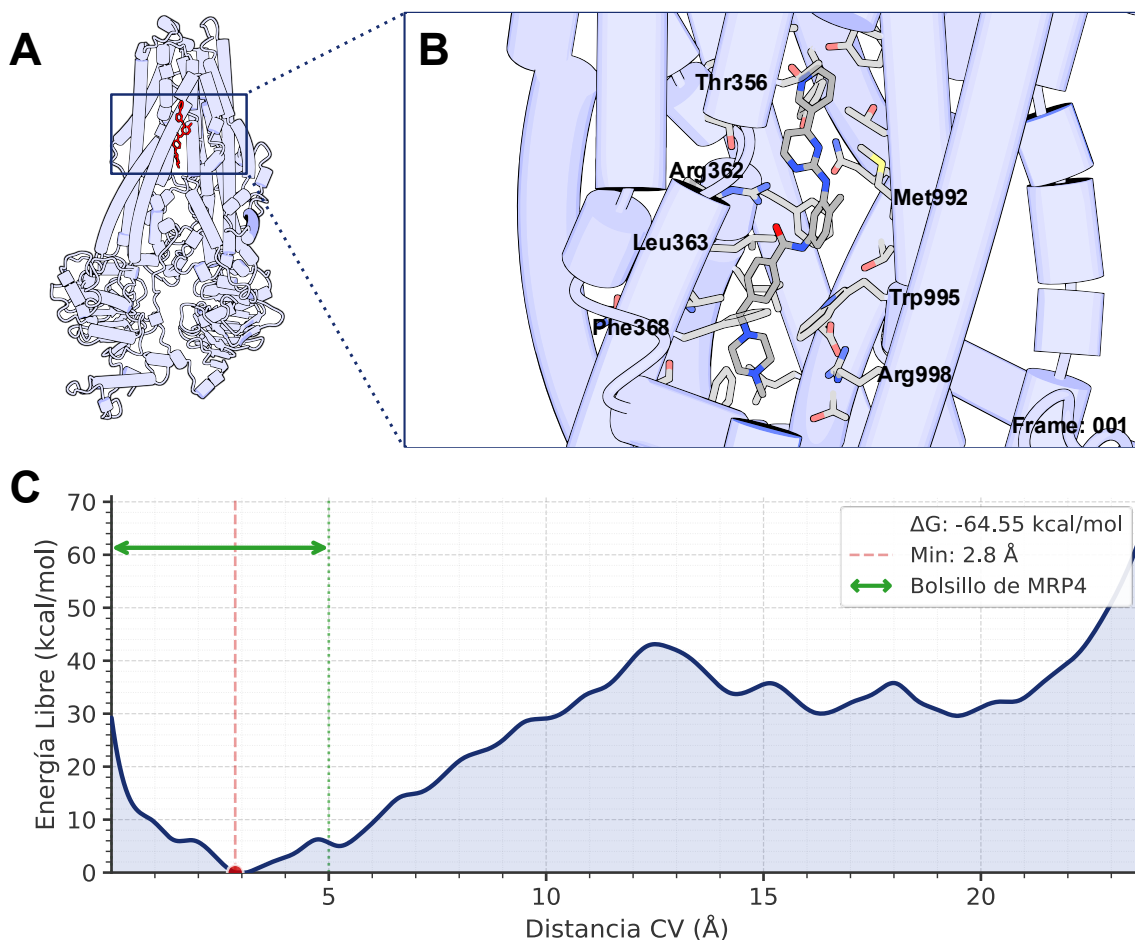


Figura 60. Perfil termodinámico de MRP4WT-imatinib: (A) Ubicación general del complejo proteína-ligando. (B) Acercamiento a los residuos del estado de mínima energía. (C) Perfil FES de la simulación.

VI.4 Comparación global de los cálculos de energía libre

La Tabla 6 resume los resultados globales de las simulaciones de metadinámica.

Tabla 6. Resultados de la simulación de metadinámica, agrupados por enfoque de selección y origen.

Compuesto	ΔG (kcal/mol)	Distancia CV (Å)	Grupo	Origen
Ceefourin-1	-56.65	1	Control	HTS
EBD9	-49.17	21	Diseño previo	De novo
EBD14	-49.75	2.9	Diseño previo	De novo
SHC-2-1	-45.19	66	Diseño previo	De novo
SHC-2-2	-63.75	5.7	Diseño previo	De novo
Sterhirsutina H	-54.87	17.9	Enfoque clásico	NPA
Sterhirsutina I	-61.80	15.5	Enfoque clásico	NPA
MC-031	-63.76	11.3	Enfoque clásico	NPA
Albendazol	-55.97	15.5	Enfoque clásico	DB
Lifitegrast	-68.97	16.6	Enfoque clásico	DB
Avatrombopag	-60.81	1.9	Enfoque clásico	DB
Aspergilazina A	-53.03	17.3	Enfoque alternativo	NPA
Aspergicandidusina A	-33.48	21.3	Enfoque alternativo	NPA
Enhyprazinona A	-48.50	10.8	Enfoque alternativo	NPA
Vemurafenib	-64.22	20.2	Enfoque alternativo	DB
Montelukast	-46.94	10.8	Enfoque alternativo	DB
Imatinib	-64.55	2.8	Enfoque alternativo	DB

En negritas se muestran los compuestos cuyo ΔG es más favorable que el control y su distancia CV es $\leq 5 \text{ \AA}$.

Las moléculas de diseño de *novo* de la serie EBD se obtuvieron mediante un enfoque basado en fragmentos, partiendo de inhibidores de MRP4 (quercetina y ceefourin-1) cuyos fragmentos de mayor afinidad se recombinaron hasta obtener EBD9 y EBD14 (Becerra Becerra, 2021). Estas estructuras se optimizaron posteriormente sustituyendo un grupo amida por *tert*-butilamida, incorporando además en SHC-2-2 un carbonilo adicional para potenciar sus interacciones polares, como se observa en la Figura 61 (Hernández Castro, 2024).

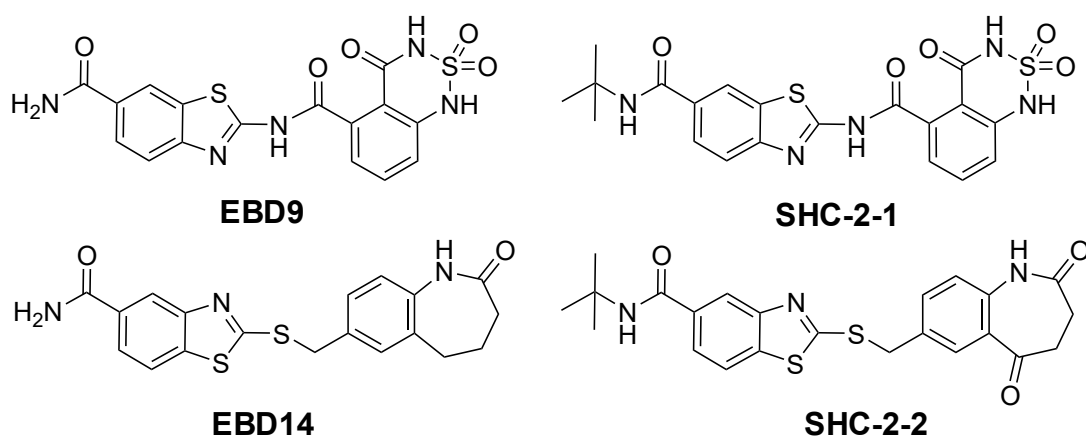


Figura 61. Estructura química de las moléculas diseñadas por el grupo DACSIF.

El presente trabajo las analiza mediante metadinámica, técnica que evalúa tanto la afinidad como la permanencia del ligando en el sitio objetivo, ya que la coordenada colectiva (CV) corresponde al centro de masa del sitio de unión de inhibidores.

Bajo este criterio, EBD9 y SHC-2-1 no resultan viables, al presentar baja afinidad con mínimos globales muy alejados del sitio de unión. Resulta más interesante el caso de EBD14 y su sucesor SHC-2-2.

El caso más interesante es el de EBD14 y su sucesor SHC-2-2. La molécula original EBD14 localizó su mínimo global dentro del sitio (2.9 \AA), aunque con una afinidad modesta (-49.75 kcal/mol). Su optimización, SHC-2-2, mejoró notablemente la

afinidad y superó al control (-63.75 frente a -56.65 kcal/mol), pero desplazó el mínimo global fuera del sitio objetivo (5.7 Å). Esto ilustra que las mejoras de afinidad no siempre preservan el reconocimiento específico del sitio. Finalmente, avatrombopag superó al control ceefourin-1 en afinidad (-60.81 kcal/mol) y ubicó su mínimo global dentro del sitio de unión (1.9 Å). A su vez, imatinib resultó aún más prometedor, al alcanzar la afinidad más favorable de este grupo (-64.55 kcal/mol) y localizarse igualmente dentro del sitio (2.8 Å), lo que lo posiciona como el candidato más prometedor del análisis (Tabla 6).

VI.5 Propiedades ADME-Tox

VI.1.1 Propiedades fisicoquímicas

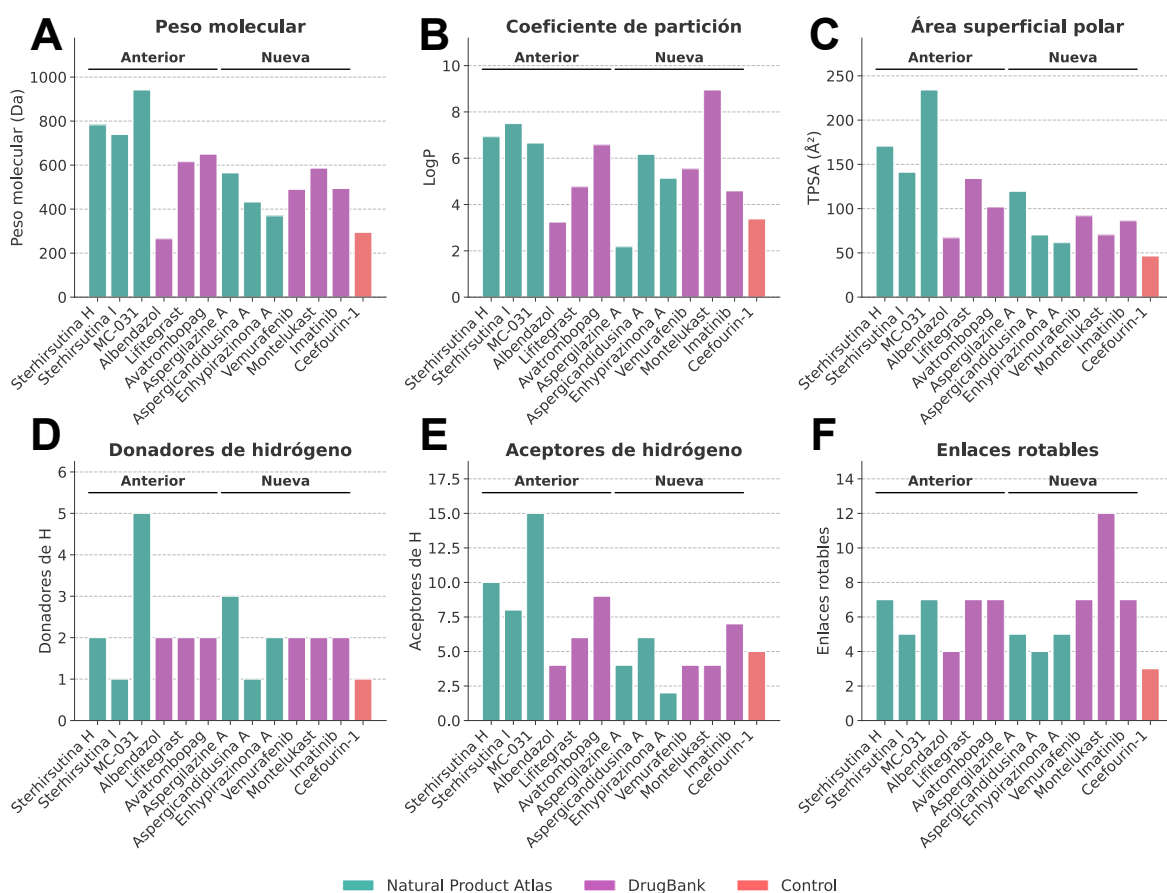


Figura 62. Perfil fisicoquímico comparativo para la evaluación estructural de los ligandos candidatos: (A) Peso molecular, (B) LogP, (C) TPSA, (D) Donadores Hidrógeno, (E) Aceptores de Hidrógeno, (F) Enlaces rotables.

Para comprender el comportamiento estructural de los ligandos frente a MRP4, se calcularon sus propiedades fisicoquímicas empleando RDKit (Landrum y col., 2025), que se observan en la Figura 62.

En primer lugar, las moléculas del NPA muestran un contraste entre el enfoque clásico y el enfoque alternativo. Los compuestos de la etapa inicial (sterhirsutina H, sterhirsutina I y MC-031) se caracterizan por ser moléculas con pesos moleculares que rondan o superan los 800 Da (Figura 62A) y un valor elevado del coeficiente de partición (Figura 62B). MC-031 presenta un Área Superficial Polar (TPSA) superior a los 200 Å² (Figura 62C) con la mayor cantidad de donadores y aceptores de hidrógeno del grupo (Figuras 62D y 62E), esto debido principalmente a su gran número de grupos éster, alcohol y ácido carboxílico.

En un entorno celular, estas dimensiones y exceso de polaridad comprometerían la permeabilidad pasiva. Por el contrario, la selección optimizada del NPA (aspergilazina A, aspergicandidusina A y enhypirazinona A) muestra un perfil fisicoquímico más asequible. Los pesos moleculares caen por debajo de los 600 Da, y su TPSA se reduce a niveles compatibles con la difusión celular. Destaca el enhypirazinona A, que exhibe el coeficiente de partición (LogP) más bajo de toda la serie (Figura 62B), indicando propiedades poco hidrofóbicas.

Los fármacos comerciales de *DrugBank* muestran un perfil más uniforme, propio de moléculas con propiedades *Drug-Likeness*. Albendazol presenta una estructura pequeña y rígida (Figura 62F). Mientras que, compuestos como imatinib, avatrombopag y vemurafenib mantienen propiedades intermedias y equilibradas. No obstante, destaca montelukast que presenta una alta flexibilidad, como se observa en la Figura 62F presenta la mayor cantidad de enlaces rotables (Figura 62F), así como un valor de coeficiente de partición de alrededor de 8 (Figura 62B).

Finalmente, el inhibidor de control ceefourin-1 exhibe un perfil distinto al resto de las moléculas evaluadas. Posee un peso molecular bajo (Figura 62A), presenta la polaridad mínima, con un TPSA inferior a 50 Å² (Figura 62C), así mismo cuenta con una estructura altamente rígida limitada a solo 3 enlaces rotables (Figura 62F). Esta

falta de flexibilidad y baja capacidad para formar puentes de hidrógeno consisten en las propiedades que le permiten mantenerse dentro del sitio de unión de MRP4.

El diagrama *BOILED-Egg* generado mediante el servidor SwissADME (Figura 63) permite predecir gráficamente la absorción gastrointestinal (región blanca), y la permeación de la barrera hematoencefálica (región amarilla), a partir de la lipofilidad y el TPSA de cada compuesto (Daina y col., 2017).

Al analizar la distribución de las moléculas evaluadas, se observa que los compuestos: sterhirsutina H, sterhirsutina I, vemurafenib, avatrombopag y lifitegrast, se localizaron fuera de ambas regiones del diagrama, lo que confirma su alta lipofilidad en conjunto con un TPSA considerable observado en la Figura 62, lo que indica una baja permeabilidad en intestino, sin embargo, es crucial considerar el metabolismo de cada compuesto para precisar su comportamiento.

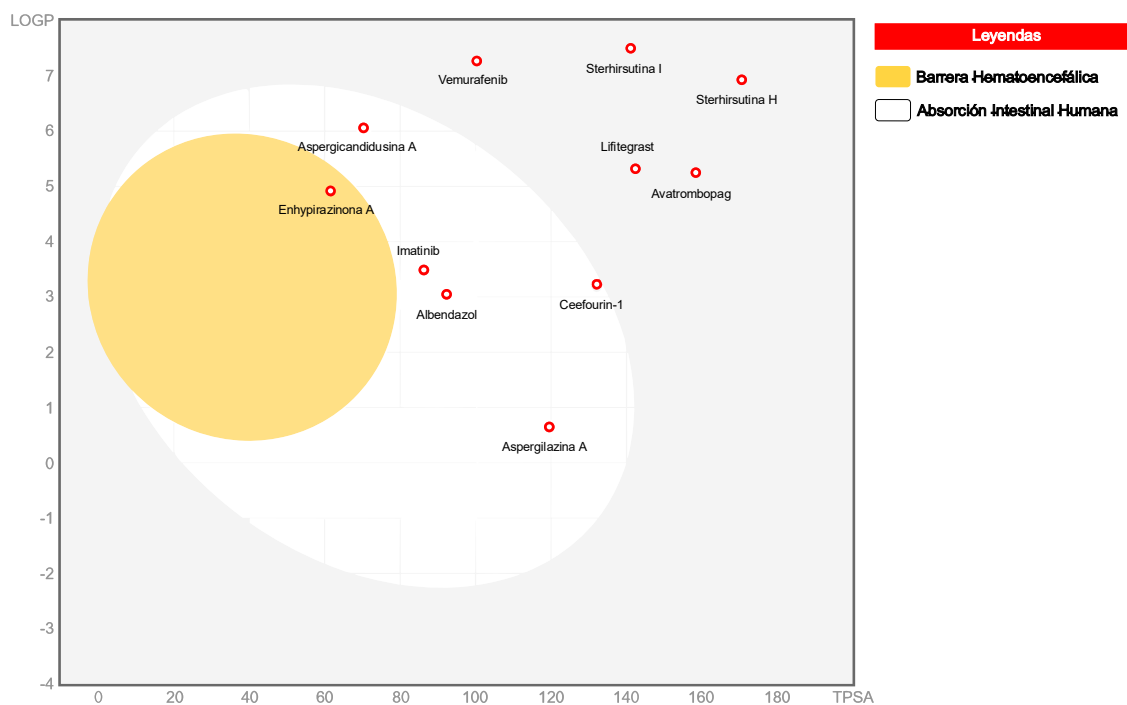


Figura 63. Diagrama *BOILED-Egg* (*SwissADME*). La región amarilla indica permeación de la BHE y la blanca, absorción intestinal.

VI.2.1 Propiedades *DrugLikeness*

La evaluación de las propiedades de similitud a fármaco permite estimar de forma temprana el comportamiento farmacocinético de los compuestos y su viabilidad como candidatos orales, mediante un conjunto de reglas que definen rangos óptimos de descriptores fisicoquímicos.

El resumen del análisis computacional realizado en el servidor SwissADME se presenta en la Figura 64 (Daina y col., 2017), donde se cuantifica el número total de violaciones a los filtros *DrugLikeness* (Egan y col., 2000; Ghose y col., 1998; Lipinski y col., 2001; Muegge y col., 2001; Veber y col., 2002) y alertas estructurales por molécula (Baell y Holloway, 2010; Brenk y col., 2008). Como se observa en la Figura 64, los candidatos de origen natural sterhirsutina H, sterhirsutina I y MC-031, concentran el mayor número de violaciones (14 a 16).

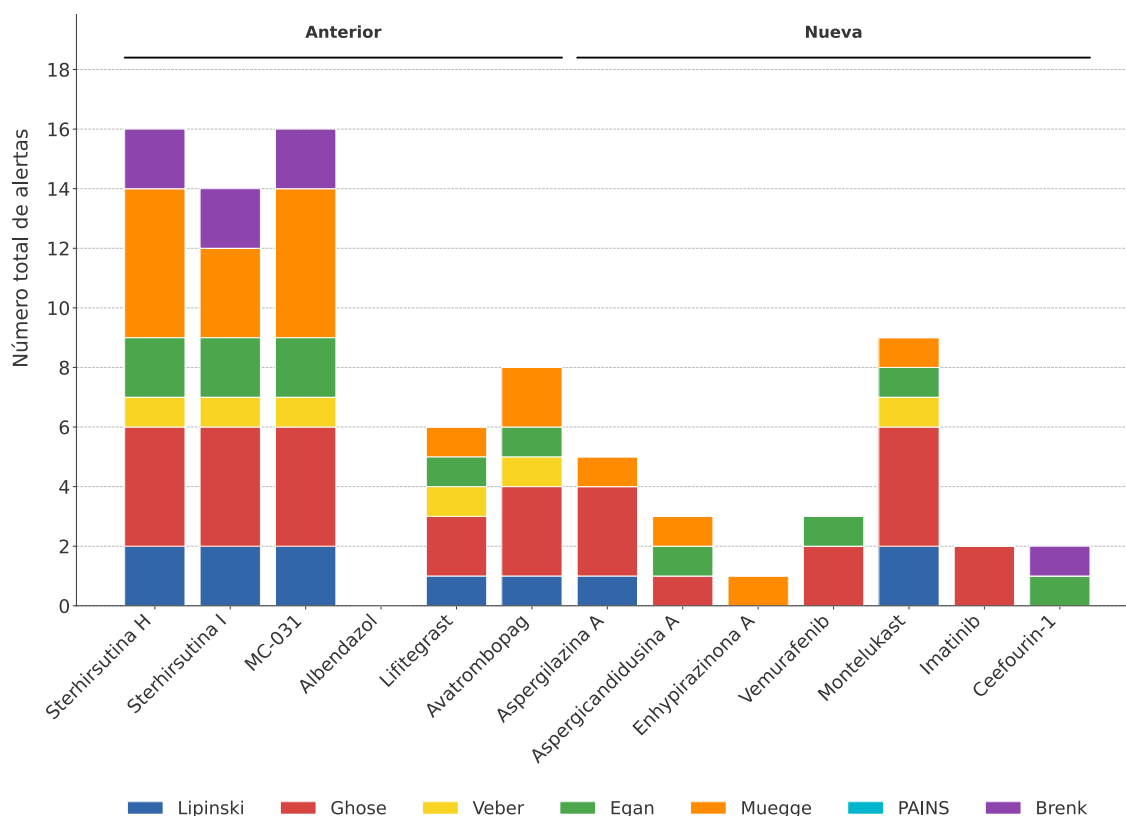


Figura 64. Gráfico de barras acumulado que muestra el número de violaciones a las propiedades *DrugLikeness* y el número de alertas de toxicidad para los compuestos analizados en SwissADME (Daina y col., 2017).

Cabe señalar que este conteo total tiende a sobreestimar el número real de descriptores problemáticos, ya que varios filtros comparten los mismos parámetros fisicoquímicos como el peso molecular, LogP y el TPSA, que se evalúan de forma redundante en varias reglas. Para el desglose exacto de violaciones a las reglas y alertas estructurales, referirse a la Tabla A10 y A11 en la sección de Anexos.

Más allá del conteo numérico de violaciones, resulta fundamental identificar las subestructuras específicas que originan dichas alertas. En la Figura 64 se presenta el análisis visual de los fragmentos indeseables detectados en los compuestos.

En este análisis, las moléculas sterhirsutina H e I presentan aceptores de Michael, que consisten en sistemas α - β insaturados, estos grupos electrofílicos forman enlaces covalentes irreversibles con proteínas endógenas, provocando toxicidad y clasificándose como compuestos PAINS (Baell y Holloway, 2010).

El candidato MC-031 evidenció un exceso de grupos éster lo expone a pasos metabólicos por enzimas carboxilesterasas, mientras que sus alquenos aislados son susceptibles de ser oxidados por el citocromo P450 hacia epóxidos, grupos altamente reactivos y mutagénicos (Casey Laizure y col., 2013; Guengerich, 2001).

Finalmente, ceefourin-1, presenta un grupo tiocarbonilo (Figura 64, Tabla A11 del Anexo), este fragmento genera una alerta toxicológica debido a su inestabilidad metabólica y su tendencia a formar intermediarios reactivos asociados a hepatotoxicidad (Brenk y col., 2008).

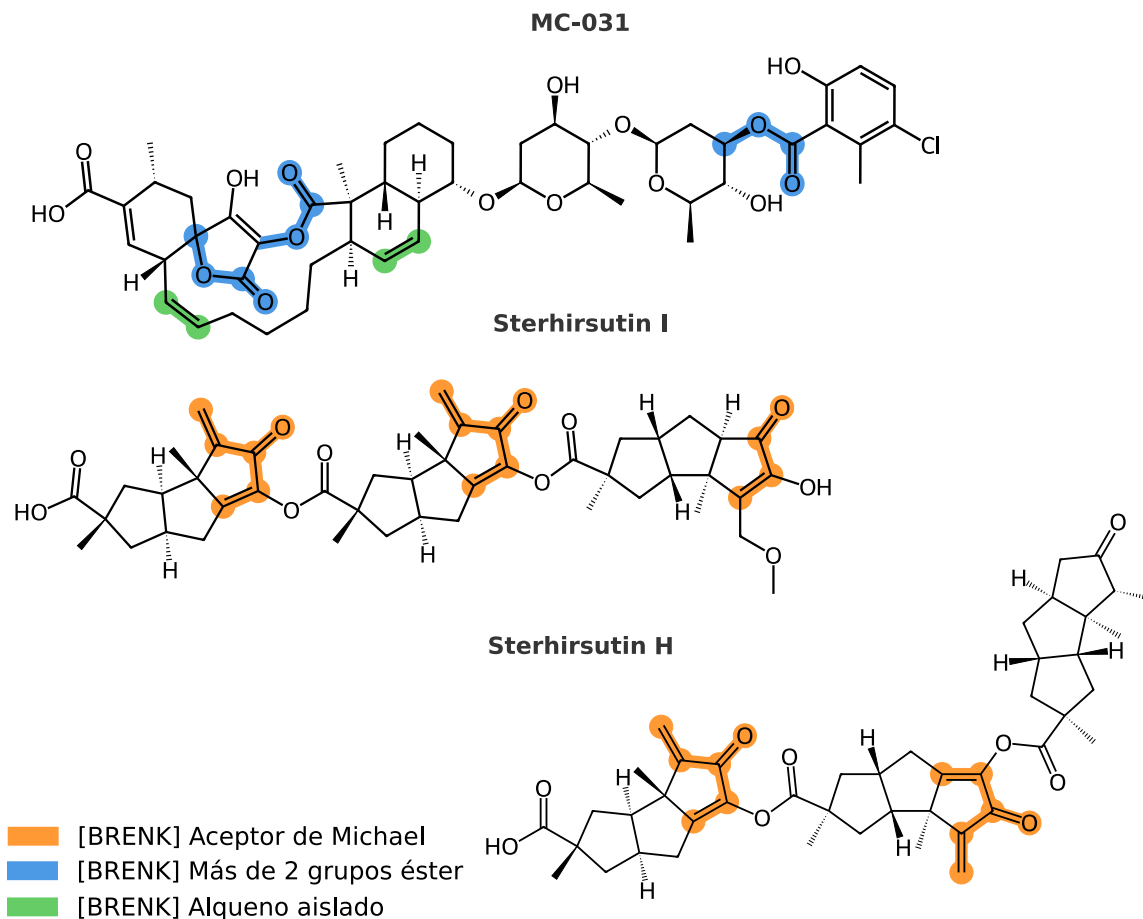


Figura 65. Análisis de subestructuras indeseables y de inviabilidad metabólica.

VI.3.1 Propiedades de toxicidad

La evaluación toxicológica temprana es esencial en el desarrollo de fármacos, pues permite descartar candidatos peligrosos antes de avanzar a etapas experimentales costosas. En este trabajo se realizó mediante el servidor ProTox 3.0, que utiliza un modelo de *Random Forest (Machine Learning)* para predecir propiedades de toxicidad, empleando *fingerprints* (Banerjee y col., 2024).

En el contexto de *Machine Learning*, los porcentajes de similitud y precisión son clave para interpretar cada predicción, el primero indica qué tan parecida es la molécula a los compuestos de referencia del conjunto de entrenamiento (importante en *Random Forest*), y el segundo, la exactitud del modelo. Como se observa en la Tabla 7, todos los compuestos se ubicaron en clases de toxicidad oral intermedia a

baja (Clases 3 a 6), sin alcanzar las categorías de mayor riesgo. La mayoría se concentró en la Clase 4, incluido el control ceefourin-1 (referencia). Entre los compuestos relevantes, avatrombopag (Clase 4) e imatinib (Clase 3), se sustentan en valores bajos de similitud y precisión ($\approx 48\%$ y $\approx 54\%$), por lo que deben interpretarse con cautela. En conjunto, ambos candidatos presentan un perfil de toxicidad oral comparable al del inhibidor de referencia.

Tabla 7. Propiedades de toxicidad oral obtenidas del servidor ProTox 3.

Compuesto	Toxicidad oral		
	Clase	Similitud (%)	Predicción (%)
Sterhirsutina H	3	64.78	68.07
Sterhirsutina I	6	64.58	68.07
MC-031	4	56.21	67.38
Albendazol	4	50	54.26
Lifitegrast	4	43.64	54.26
Avatrombopag	4	47.97	54.26
Aspergilazina A	3	63.1	68.07
Aspergicandidusina A	5	49.72	54.26
Enhypirazinona A	4	48.07	54.26
Vemurafenib	4	41.16	54.26
Montelukast	4	43.63	54.26
Imatinib	3	48.13	54.26
Ceefourin-1	4	54.5	67.38

Finalmente, se evaluó la posible interacción de los compuestos con los citocromos P450, un grupo de enzimas encargadas de metabolizar la mayoría de los fármacos en el organismo. Como se observa en la Figura 66, la mayoría de los compuestos se predijo con una inhibición nula o limitada a una sola isoforma, predominando CYP2C9, el caso más desfavorable correspondió a vemurafenib (posible inhibición de 4 isoformas). Entre los candidatos de interés, avatrombopag se predijo como inactivo frente a las seis isoformas, en un comportamiento idéntico al del control

xeefourin-1, mientras que imatinib solo se predijo como inhibidor potencial de CYP2D6. Este perfil limpio sugiere un bajo riesgo de interacciones metabólicas para ambos compuestos.

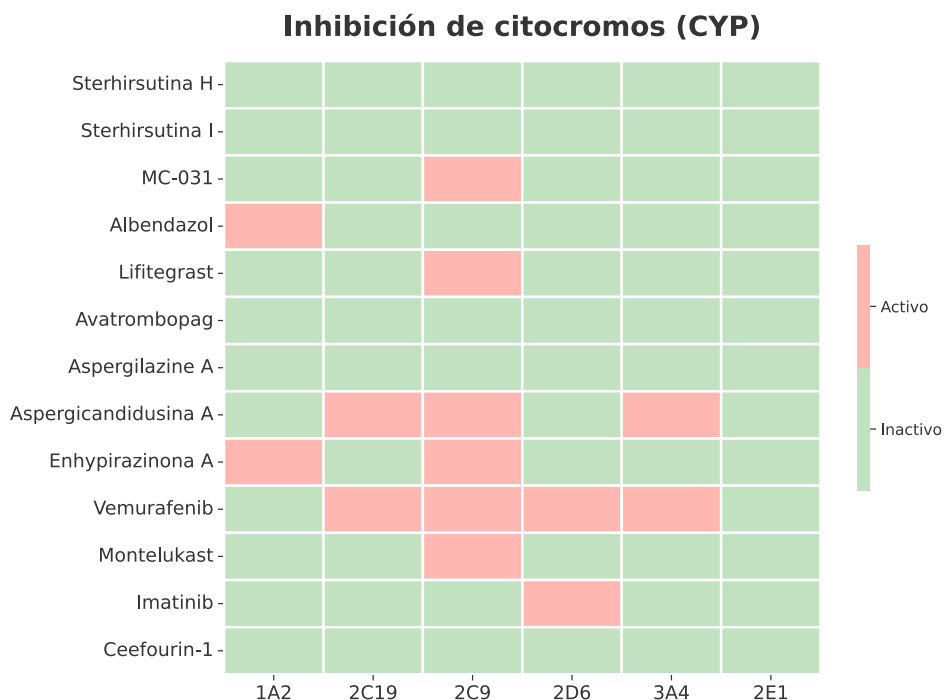


Figura 66. Mapa de calor de la inhibición de citocromos P450 predicha con ProTox 3.0. Las celdas indican activo (rojo) o inactivo (verde) frente a cada isoforma.

VI.6 Antecedentes y potencial de los candidatos seleccionados

El avatrombopag es un agonista del receptor de trombopoyetina de segunda generación, biodisponible por vía oral, aprobado en 2018 para el tratamiento de la trombocitopenia en pacientes adultos con enfermedad hepática crónica programados para procedimientos invasivos (Markham, 2021). No existe evidencia experimental publicada que documente una interacción directa entre avatrombopag y MRP4, por lo que los resultados del presente trabajo constituyen la primera evidencia de afinidad teórica de este fármaco por el sitio de unión del transportador, donde establece un complejo estable (ΔG de -60.81 kcal/mol y CV de 1.9 Å), posicionándolo como un candidato con potencial inhibitorio sobre MRP4.

Por otro lado, imatinib es un inhibidor de tirosina cinasas aprobado para el tratamiento de la LLA con cromosoma Filadelfia positivo, algunos estudios han reportado las interacciones entre imatinib y MRP4. Una interacción débil pero estadísticamente significativa entre imatinib y el MRP4 fue reportada por Hu y col. (2008), confirmando que el transportador reconoce físicamente al fármaco en células vivas. Posteriormente, estudios realizados por Hardwick y col. (2016), lo catalogaron como inhibidor parcial dependiente de la dosis, sin reportar un valor de IC_{50} . Finalmente, Morgan y col. (2013) reportaron una inhibición funcionalmente indetectable bajo condiciones metodológicas distintas. Estos estudios sugieren que el comportamiento de imatinib varía según el sustrato de estudio, sin embargo, confirman una interacción débil con MRP4 de carácter inhibitorio.

En conjunto los resultados del presente trabajo demuestran que el imatinib establece contactos directos y estables con los residuos críticos del bolsillo de unión de MRP4, alcanzando la mayor afinidad teórica del estudio (ΔG de -64.55 kcal/mol y CV de 2.8 \AA) y superando al inhibidor control ceefourin-1. Estos hallazgos muestran que es posible realizar modificaciones químicas dirigidas a los residuos de contacto identificados, lo que podría incrementar su capacidad de anclaje y traducirse en un bloqueo funcional completo.

VII. CONCLUSIONES

Con el objetivo de combatir la quimiorresistencia en LLA, esta investigación abordó la inhibición del transportador MRP4 (ABCC4) como una estrategia para restaurar la sensibilidad a los agentes anticancerígenos. Ante la ausencia de inhibidores aprobados clínicamente que bloqueen la expulsión de estos fármacos, el presente trabajo permitió abordar un comparativa entre diferentes enfoques para identificación de nuevos inhibidores dirigidos a MRP4, contrastando su rendimiento entre un enfoque clásico y un enfoque alternativo (implementando quimioinformática y *ensemble docking*) sobre las bibliotecas *Natural Products Atlas* y *DrugBank*.

El enfoque clásico, basado en la priorización por *docking score*, resultó insuficiente para garantizar la relevancia de los candidatos. En NPA, los tres compuestos con mayor *docking score* aparente (sterhirsutina H, sterhirsutina I y MC-031) fueron descartadas tras la metadinámica, que situó sus mínimos energéticos en regiones periféricas del transportador, además de presentar alertas estructurales críticas de toxicidad y metabolismo. En *DrugBank*, albendazol y lifitegrast mostraron un patrón similar. En contraste, avatrombopag logró estabilizar su mínimo energético (-60.81 kcal/mol) dentro del bolsillo principal, coordinándose con Trp995, Phe324, Leu363 y Met992, residuos clave en el reconocimiento de inhibidores, posicionándolo como un candidato prometedor.

El enfoque alternativo, que fue optimizado integrando filtros quimioinformáticos y *ensemble docking* validado retrospectivamente, condujo a candidatos con propiedades fisicoquímicas y consistencia termodinámica superiores. En NPA, aspergilazina A se consolidó como el candidato más sólido, con una afinidad termodinámica de -53.03 kcal/mol cerca del bolsillo principal, aunque sin alcanzar el desempeño del control ceefourin-1. aspergicandidusina A y enhyprazinona A fueron descartadas por localización periférica y afinidad insuficiente, respectivamente. El reposicionamiento en *DrugBank* reveló perfiles heterogéneos, vemurafenib quedó descartado al localizar su mínimo global en la periferia del transportador, y Montelukast fue descartado por presentar una afinidad teórica insuficiente para anclarse al bolsillo principal. De manera contrastante, imatinib se

posicionó como el hallazgo más prometedor del estudio, con la mayor afinidad teórica registrada (-64.55 kcal/mol), superior al control ceefourin-1 (-56.65 kcal/mol), estabilizando su mínimo dentro del bolsillo clásico de inhibidores y estableciendo contactos directos con Met992, Phe368 y Trp995, residuos clave en el reconocimiento de ligandos inhibidores.

En conjunto, estos resultados demuestran que la integración de herramientas computacionales avanzadas constituye una estrategia eficaz para reducir costos y tiempos en el descubrimiento de fármacos. La superioridad del enfoque alternativo sobre el clásico se evidencia tanto en la calidad fisicoquímica como en la coherencia termodinámica, consolidando este protocolo como un marco metodológico para la búsqueda de inhibidores dirigidos contra proteínas de alta movilidad y cambios conformacionales como MRP4. Sobre esta base, avatrombopag e imatinib se destacan como candidatos prioritarios con la evidencia *in silico* necesaria para avanzar a su validación experimental en modelos celulares de LLA que sobreexpresen MRP4. La identificación de nuevos inhibidores capaces de bloquear MRP4 abre la posibilidad de restaurar la sensibilidad a los agentes quimioterapéuticos y potenciar su acción mediante combinaciones con tratamientos convencionales, sentando las bases para estrategias terapéuticas más eficaces frente a la quimiorresistencia mediada por MRP4, no solo en LLA, sino en el amplio espectro de neoplasias donde este transportador representa una barrera crítica para el éxito del tratamiento.

VIII. PERSPECTIVAS

Los resultados del presente trabajo establecen un punto de partida sólido para una validación experimental. La prioridad inmediata consiste en el análisis biológico de avatrombopag e imatinib en modelos celulares que sobreexpresen MRP4, por ser los únicos candidatos que al igual que ceefourin-1, lograron estabilizarse dentro del bolsillo principal del transportador, permitiendo estudiar experimentalmente su capacidad inhibitoria sobre el eflujo de AMPc y 6-MP.

Utilizar métodos alquímicos como FEP (*Free Energy Perturbation*, por sus siglas en inglés) pueden ayudar a guiar modificaciones estructurales estimando la energía libre relativa del complejo, para aumentar la afinidad de imatinib por el sitio de unión de MRP4 (Ross y col., 2023).

En cuanto a la exploración del espacio químico, el protocolo empleando quimioinformática que está optimizado y estadísticamente validado, representa un punto de partida robusto y escalable a bases de datos masivas como ZINC20, ampliando considerablemente la probabilidad de identificar nuevos candidatos inhibidores de MRP4 con perfiles superiores y estructuras novedosas.

Complementariamente, la verificación computacional de la especificidad de los candidatos más prometedores mediante su evaluación *in silico* frente a transportadores de la misma familia como: MRP1, MRP2 y MRP3, representa una oportunidad estratégica para la selección de moléculas con mayor selectividad a MRP4.

Finalmente, la integración de métodos de aprendizaje automático entrenados sobre datos de inhibición reportados en bases de datos públicas como ChEMBL o PubChem representa un enfoque de vanguardia que permitiría construir modelos predictivos capaces de priorizar candidatos activos frente a MRP4 con una fracción del costo computacional requerido por el acoplamiento molecular a gran escala.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Abramson, J., Adler, J., Dunger, J., Evans, R., Green, T., Pritzel, A., Ronneberger, O., Willmore, L., Ballard, A. J., Bambrick, J., Bodenstein, S. W., Evans, D. A., Hung, C. C., O'Neill, M., Reiman, D., Tunyasuvunakool, K., Wu, Z., Žemgulytė, A., Arvaniti, E., ... Jumper, J. M. (2024). Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. *Nature* 2024 630:8016, 630(8016), 493–500. <https://doi.org/10.1038/s41586-024-07487-w>
- Agu, P. C., Afiukwa, C. A., Orji, O. U., Ezeh, E. M., Ofoke, I. H., Ogbu, C. O., Ugwuja, E. I., y Aja, P. M. (2023). Molecular docking as a tool for the discovery of molecular targets of nutraceuticals in diseases management. *Scientific Reports* 2023 13:1, 13(1), 1–18. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-40160-2>
- Amaro, R. E., Baudry, J., Chodera, J., Demir, Ö., McCammon, J. A., Miao, Y., y Smith, J. C. (2018a). Ensemble Docking in Drug Discovery. *Biophysical Journal*, 114(10), 2271–2278. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2018.02.038>
- Amaro, R. E., Baudry, J., Chodera, J., Demir, Ö., McCammon, J. A., Miao, Y., y Smith, J. C. (2018b). Ensemble Docking in Drug Discovery. *Biophysical Journal*, 114(10), 2271–2278. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2018.02.038>
- Anaconda Software Distribution. (2016). *Anaconda* (24.9.2). <https://anaconda.com>
- Armstrong, R. (2006). Compframe: Development of component frameworks for high performance computing. *Proceedings of the 2006 ACM/IEEE Conference on Supercomputing, SC'06*. <https://doi.org/10.1145/1188455.1188457>
- Baek, M., DiMaio, F., Anishchenko, I., Dauparas, J., Ovchinnikov, S., Lee, G. R., Wang, J., Cong, Q., Kinch, L. N., Dustin Schaeffer, R., Millán, C., Park, H., Adams, C., Glassman, C. R., DeGiovanni, A., Pereira, J. H., Rodrigues, A. V., Van Dijk, A. A., Ebrecht, A. C., ... Baker, D. (2021). Accurate prediction of protein structures and interactions using a three-track neural network. *Science*, 373(6557), 871–876. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.ABJ8754/SUPPL_FILE/ABJ8754_MДАР_R EPRODUCIBILITY_CHECKLIST.PDF

- Baell, J. B., y Holloway, G. A. (2010). New substructure filters for removal of pan assay interference compounds (PAINS) from screening libraries and for their exclusion in bioassays. *Journal of medicinal chemistry*, 53(7), 2719–2740. <https://doi.org/10.1021/jm901137j>
- Banerjee, P., Kemmler, E., Dunkel, M., y Preissner, R. (2024). ProTox 3.0: a webserver for the prediction of toxicity of chemicals. *Nucleic Acids Research*, 52(W1), W513. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAE303>
- Barducci, A., Bonomi, M., y Parrinello, M. (2011). Metadynamics. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, 1(5), 826–843. <https://doi.org/10.1002/WCMS.31>
- Baron, R. (Ed.). (2012). *Computational Drug Discovery and Design. Methods in Molecular Biology*, 819. <https://doi.org/10.1007/978-1-61779-465-0>
- Becerra Becerra, E. (2021). *Diseño, síntesis y evaluación de inhibidores del transportador MRP4, como inductores selectivos de apoptosis en un modelo in vitro de Leucemia Linfoblástica Aguda*. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Becerra, E., Aguilera-Durán, G., Berumen, L., Romo-Mancillas, A., y García-Alcocer, G. (2021). Study of Endogen Substrates, Drug Substrates and Inhibitors Binding Conformations on MRP4 and Its Variants by Molecular Docking and Molecular Dynamics. *Molecules* 2021, Vol. 26, Page 1051, 26(4), 1051. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26041051>
- Becerra, E., Berumen, L., Soto-Ontiveros, V., y García-Alcocer, G. (2022). Specific MRP4 Inhibitor Ceefourin-1 Enhances Apoptosis Induced by 6-Mercaptopurine in Jurkat Leukemic Cells, but Not in Normal Lymphoblast Cell Line CRL-1991. *Medicina* 2022, Vol. 58, Page 695, 58(6), 695. <https://doi.org/10.3390/MEDICINA58060695>
- Bellera, C. L., y Di Ianni, M. E. (2022). Descubrimiento y Desarrollo de Fármacos. *Introducción a la Química Medicinal*. <https://doi.org/10.35537/10915/114312>

- Bender, B. J., Gahbauer, S., Lutten, A., Lyu, J., Webb, C. M., Stein, R. M., Fink, E. A., Balius, T. E., Carlsson, J., Irwin, J. J., y Shoichet, B. K. (2021). A practical guide to large-scale docking. *Nature Protocols* 2021 16:10, 16(10), 4799–4832. <https://doi.org/10.1038/s41596-021-00597-z>
- Bickerton, G. R., Paolini, G. V., Besnard, J., Muresan, S., y Hopkins, A. L. (2012). Quantifying the chemical beauty of drugs. *Nature Chemistry* 2011 4:2, 4(2), 90–98. <https://doi.org/10.1038/nchem.1243>
- Binbay, F. A., Rathod, D. C., George, A. A. P., y Imhof, D. (2023). Quality Assessment of Selected Protein Structures Derived from Homology Modeling and AlphaFold. *Pharmaceuticals*, 16(12), 1662. <https://doi.org/10.3390/PH16121662/S1>
- Bloch, M., Raj, I., Pape, T., y Taylor, N. M. I. (2023). Structural and mechanistic basis of substrate transport by the multidrug transporter MRP4. *Structure*, 31(11), 1407-1418.e6. <https://doi.org/10.1016/J.STR.2023.08.014/ATTACHMENT/E892692A-AE2B-40C8-9404-2C53C32B1383/MMC1.PDF>
- Blow, D. M. . (2002). *Outline of crystallography for biologists*. Oxford University Press.
- Blumer, O., Reuveni, S., y Hirshberg, B. (2024). Combining stochastic resetting with Metadynamics to speed-up molecular dynamics simulations. *Nature Communications* 2024 15:1, 15(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-44528-w>
- Botella, L. M. (2022). Drug repurposing as a current strategy in medicine discovery. *Medicina de Familia. SEMERGEN*, 48(8). <https://doi.org/10.1016/J.SEMERG.2022.03.003>
- Bouysset, C., y Fiorucci, S. (2021). ProLIF: a library to encode molecular interactions as fingerprints. *Journal of Cheminformatics* 2021 13:1, 13(1), 72-. <https://doi.org/10.1186/S13321-021-00548-6>

- Brenk, R., Schipani, A., James, D., Krasowski, A., Gilbert, I. H., Frearson, J., y Wyatt, P. G. (2008). Lessons learnt from assembling screening libraries for drug discovery for neglected diseases. *ChemMedChem*, 3(3), 435–444. <https://doi.org/10.1002/cmdc.200700139>
- Bukowski, K., Kciuk, M., y Kontek, R. (2020). Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer Chemotherapy. *International Journal of Molecular Sciences* 2020, Vol. 21, Page 3233, 21(9), 3233. <https://doi.org/10.3390/IJMS21093233>
- Cabral, A., Cabral, J. E., y McNulty, R. (2022). Cryo-EM for small molecules. *Current protocols*, 2(12), e632. <https://doi.org/10.1002/cpz1.632>
- Casey Laizure, S., Herring, V., Hu, Z., Witbrodt, K., y Parker, R. B. (2013). The role of human carboxylesterases in drug metabolism: have we overlooked their importance? *Pharmacotherapy*, 33(2), 210. <https://doi.org/10.1002/PHAR.1194>
- Cereto-Massagué, A., Guasch, L., Valls, C., Mulero, M., Pujadas, G., y Garcia-Vallvé, S. (2012). DecoyFinder: an easy-to-use python GUI application for building target-specific decoy sets. *Bioinformatics*, 28(12), 1661–1662. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts249>
- Chang, J. H. C., Poppe, M. M., Hua, C. H., Marcus, K. J., y Esiashvili, N. (2021). Acute lymphoblastic leukemia. *Pediatric Blood y Cancer*, 68(S2), e28371. <https://doi.org/10.1002/PBC.28371>
- Chen, V. B., Arendall, W. B., Headd, J. J., Keedy, D. A., Immormino, R. M., Kapral, G. J., Murray, L. W., Richardson, J. S., y Richardson, D. C. (2009). MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 66(Pt 1), 12. <https://doi.org/10.1107/S0907444909042073>
- Chen, Y., y Kirchmair, J. (2020). Cheminformatics in Natural Product-based Drug Discovery. *Molecular Informatics*, 39(12), 2000171. <https://doi.org/10.1002/minf.202000171>

- Chen, Y., Yuan, X., Xiao, Z., Jin, H., Zhang, L., y Liu, Z. (2018). Discovery of novel multidrug resistance protein 4 (MRP4) inhibitors as active agents reducing resistance to anticancer drug 6-Mercaptopurine (6-MP) by structure and ligand-based virtual screening. *PLOS ONE*, 13(10), e0205175. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0205175>
- Cheung, L., Flemming, C. L., Watt, F., Masada, N., Yu, D. M. T., Huynh, T., Conseil, G., Tivnan, A., Polinsky, A., Gudkov, A. V., Munoz, M. A., Vishvanath, A., Cooper, D. M. F., Henderson, M. J., Cole, S. P. C., Fletcher, J. I., Haber, M., y Norris, M. D. (2014). High-throughput screening identifies Ceefourin 1 and Ceefourin 2 as highly selective inhibitors of multidrug resistance protein 4 (MRP4). *Biochemical Pharmacology*, 91(1), 97–108. <https://doi.org/10.1016/J.BCP.2014.05.023>
- Google. (2025). *Clasificación: ROC y AUC*. <https://developers.google.com/machine-learning/crash-course/classification/roc-and-auc?hl=es-419>
- Comoto-Santacruz, D. A., Huerta-Núñez, L. F. E., Comoto-Santacruz, D. A., y Huerta-Núñez, L. F. E. (2023). Potenciales biomarcadores moleculares de infiltración a sistema nervioso central en leucemia linfoblástica aguda. *Revista de sanidad militar*, 77(1), 1–7. <https://doi.org/10.56443/RSM.V77I1.250>
- Craig, I. R., Essex, J. W., y Spiegel, K. (2010). Ensemble Docking into Multiple Crystallographically Derived Protein Structures: An Evaluation Based on the Statistical Analysis of Enrichments. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 50(4), 511–524. <https://doi.org/10.1021/ci900407c>
- Daina, A., Michielin, O., y Zoete, V. (2017). SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific Reports* 2017 7:1, 7(1), 42717-. <https://doi.org/10.1038/srep42717>
- Dean, M., Moitra, K., y Allikmets, R. (2022). The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Human Mutation*, 43(9), 1162–1182. <https://doi.org/10.1002/HUMU.24418>

- Dhanyamraju, P. K., Schell, T. D., Amin, S., y Robertson, G. P. (2022). Drug-Tolerant Persister Cells in Cancer Therapy Resistance. *Cancer Research*, 82(14), 2503–2514. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-21-3844>
- Domínguez-Ramírez, L., Anaya-Ruiz, M., y Cortés-Hernández, P. (2025). Quality over quantity: how to get the best results when using docking for repurposing. *Frontiers in Bioinformatics*, 5, 1536504. <https://doi.org/10.3389/FBINF.2025.1536504/TEXT>
- Döring, H., Kreutzer, D., Ritter, C., y Hilgeroth, A. (2020). Discovery of Novel Symmetrical 1,4-Dihydropyridines as Inhibitors of Multidrug-Resistant Protein (MRP4) Efflux Pump for Anticancer Therapy. *Molecules* 2021, Vol. 26, Page 18, 26(1), 18. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26010018>
- Egan, W. J., Merz, K. M., y Baldwin, J. J. (2000). Prediction of drug absorption using multivariate statistics. *Journal of medicinal chemistry*, 43(21), 3867–3877. <https://doi.org/10.1021/JM000292E>
- El-Sheikh, A. A. K., Van Den Heuvel, J. J. M. W., Koenderink, J. B., y Russel, F. G. M. (2007). Interaction of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs with Multidrug Resistance Protein (MRP) 2/ABCC2- and MRP4/ABCC4-Mediated Methotrexate Transport. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 320(1), 229–235. <https://doi.org/10.1124/JPET.106.110379>
- Ertl, P., y Schuffenhauer, A. (2008). Cheminformatics analysis of natural products: Lessons from nature inspiring the design of new drugs. *Progress in Drug Research*, 66, 217–235. https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8595-8_4
- Ertl, P., y Schuffenhauer, A. (2009). Estimation of synthetic accessibility score of drug-like molecules based on molecular complexity and fragment contributions. *Journal of cheminformatics*, 1(1). <https://doi.org/10.1186/1758-2946-1-8>
- Finetti, F., Travelli, C., Ercoli, J., Colombo, G., Buoso, E., y Trabalzini, L. (2020). Prostaglandin E2 and Cancer: Insight into Tumor Progression and Immunity. *Biology* 2020, Vol. 9, Page 434, 9(12), 434. <https://doi.org/10.3390/BIOLOGY9120434>

- Ghose, A. K., Viswanadhan, V. N., y Wendoloski, J. J. (1998). A Knowledge-Based Approach in Designing Combinatorial or Medicinal Chemistry Libraries for Drug Discovery. 1. A Qualitative and Quantitative Characterization of Known Drug Databases. *Journal of Combinatorial Chemistry*, 1(1), 55–68. <https://doi.org/10.1021/CC9800071>
- Guengerich, F. P. (2001). Common and Uncommon Cytochrome P450 Reactions Related to Metabolism and Chemical Toxicity. *Chemical Research in Toxicology*, 14(6), 611–650. <https://doi.org/10.1021/TX0002583>
- Hanahan, D. (2026). Hallmarks of cancer—Then and now, and beyond. *Cell*, 189(8), 2254–2277. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2025.12.049>
- Hardwick, R. N., Snellings, M., Ferslew, B. C., Lu, Y., y Brouwer, K. L. R. (2016). Tyrosine and aurora kinase inhibitors diminish transport function of multidrug resistance-associated protein (MRP) 4 and breast cancer resistance protein (BCRP). *ADMET and DMPK*, 4(4), 302–313. <https://doi.org/10.5599/ADMET.4.4.322>
- Hayashi, H., Makimoto, A., y Yuza, Y. (2024). Treatment of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia: A Historical Perspective. *Cancers 2024, Vol. 16, Page 723*, 16(4), 723. <https://doi.org/10.3390/CANCERS16040723>
- Hendrickson, J. B. (1961). Molecular Geometry. I. Machine Computation of the Common Rings. *Journal of the American Chemical Society*, 83(22), 4537–4547. <https://doi.org/10.1021/JA01483A011>
- Hernández Castro, S. (2024). *Optimización por modelado molecular y obtención de carboxamidas como posibles inhibidores de la proteína MRP4*. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Huang, Y., Xue, C., Wang, L., Bu, R., Mu, J., Wang, Y., y Liu, Z. (2023). Structural basis for substrate and inhibitor recognition of human multidrug transporter MRP4. *Communications Biology* 2023 6:1, 6(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s42003-023-04935-7>

- Hunter, J. D. (2007). Matplotlib: A 2D graphics environment. *Computing in Science and Engineering*, 9(3), 90–95. <https://doi.org/10.1109/MCSE.2007.55>
- Iacobucci, I., y Mullighan, C. G. (2017). Genetic Basis of Acute Lymphoblastic Leukemia. *Journal of Clinical Oncology*, 35(9), 975. <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.70.7836>
- Inaba, H., y Mullighan, C. G. (2020). Pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*, 105(11), 2524–2539. <https://doi.org/10.3324/HAEMATOL.2020.247031>
- INSP. (2021). *Distribución geográfica y temporal de las tasas de mortalidad por Leucemia Linfoblástica aguda, según grupo etario, México 2000 - 2020*.
- Jabbour, E., Short, N. J., Jain, N., Haddad, F. G., Welch, M. A., Ravandi, F., y Kantarjian, H. (2023). The evolution of acute lymphoblastic leukemia research and therapy at MD Anderson over four decades. *Journal of Hematology y Oncology 2023 16:1*, 16(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/S13045-023-01409-5>
- Jaramillo, A. C., Cloos, J., Lemos, C., Stam, R. W., Kaspers, G. J. L., Jansen, G., y Peters, G. J. (2019). Ex vivo resistance in childhood acute lymphoblastic leukemia: Correlations between BCRP, MRP1, MRP4 and MRP5 ABC transporter expression and intracellular methotrexate polyglutamate accumulation. *Leukemia Research*, 79, 45–51. <https://doi.org/10.1016/J.LEUKRES.2019.02.008>
- Jung, M., Gao, J., Cheung, L., Bongers, A., Somers, K., Clifton, M., Ramsay, E. E., Russell, A. J., Valli, E., Gifford, A. J., George, J., Kennedy, C. J., Wakefield, M. J., Topp, M., Ho, G. Y., Scott, C. L., Bowtell, D. D., deFazio, A., Norris, M. D., ... Henderson, M. J. (2020). ABCC4/MRP4 contributes to the aggressiveness of Myc-associated epithelial ovarian cancer. *International Journal of Cancer*, 147(8), 2225–2238. <https://doi.org/10.1002/IJC.33005>
- Kapoor, K., Thangapandian, S., y Tajkhorshid, E. (2022). Extended-ensemble docking to probe dynamic variation of ligand binding sites during large-scale

- structural changes of proteins. *Chemical Science*, 13(14), 4150–4169. <https://doi.org/10.1039/d2sc00841f>
- Ke, Y. Y., Coumar, M. S., Shiao, H. Y., Wang, W. C., Chen, C. W., Song, J. S., Chen, C. H., Lin, W. H., Wu, S. H., Hsu, J. T. A., Chang, C. M., y Hsieh, H. P. (2014). Ligand efficiency based approach for efficient virtual screening of compound libraries. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 83, 226–235. <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2014.06.029>
- Kim, D. E., Chivian, D., y Baker, D. (2004). Protein structure prediction and analysis using the Robetta server. *Nucleic Acids Research*, 32(Web Server issue), W526. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKH468>
- Knox, C., Wilson, M., Klinger, C. M., Franklin, M., Oler, E., Wilson, A., Pon, A., Cox, J., Chin, N. E. L., Strawbridge, S. A., Garcia-Patino, M., Kruger, R., Sivakumaran, A., Sanford, S., Doshi, R., Khetarpal, N., Fatokun, O., Doucet, D., Zubkowski, A., ... Wishart, D. S. (2024). DrugBank 6.0: the DrugBank Knowledgebase for 2024. *Nucleic Acids Research*, 52(D1), D1265–D1275. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAD976>
- Landrum, G., Tosco, P., Kelley, B., Rodriguez, R., Cosgrove, D., Vianello, R., sriniker, Gedeck, P., Jones, G., NadineSchneider, Kawashima, E., Nealschneider, D., Dalke, A., Swain, M., Cole, B., Turk, S., Savelev, A., tadhurst-cdd, Vaucher, A., ... Jeremy. (2025). rdkit/rdkit: 2025_03_1 (Q1 2025) Release. *zndo*. <https://doi.org/10.5281/ZENODO.15115844>
- Landrum, G., Tosco, P., Kelley, B., Rodriguez, R., Cosgrove, D., Vianello, R., sriniker, Gedeck, P., Jones, G., NadineSchneider, Kawashima, E., Nealschneider, D., Dalke, A., Swain, M., Cole, B., Turk, S., Savelev, A., Vaucher, A., Wójcikowski, M., ... Faara, H. (2024). *RDKit*. <https://doi.org/10.5281/ZENODO.14535873>
- Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., y Feeney, P. J. (2001). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46(1–3), 3–26. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(00\)00129-0](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(00)00129-0)

- Lovell, S. C., Davis, I. W., Arendall, W. B., De Bakker, P. I. W., Word, J. M., Prisant, M. G., Richardson, J. S., y Richardson, D. C. (2003). Structure validation by Ca geometry: ϕ, ψ and $C\beta$ deviation. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, 50(3), 437–450. <https://doi.org/10.1002/PROT.10286>;REQUESTEDJOURNAL:JOURNAL:10970134;WGROU:STRING:PUBLICATION
- Markham, A. (2021). Avatrombopag: A Review in Thrombocytopenia. *Drugs* 2021 81:16, 81(16), 1905–1913. <https://doi.org/10.1007/S40265-021-01613-Y>
- McNutt, A. T., Li, Y., Meli, R., Aggarwal, R., y Koes, D. R. (2025). GNINA 1.3: the next increment in molecular docking with deep learning. *Journal of Cheminformatics* 2025 17:1, 17(1), 28-. <https://doi.org/10.1186/s13321-025-00973-x>
- Medema, M. H., y Fischbach, M. A. (2015). Computational approaches to natural product discovery. *Nature Chemical Biology* 2015 11:9, 11(9), 639–648. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1884>
- Melendez, I. M. G., Medina, E. A. M., Cabada, C. P., Vallejano, D. F. O., Meléndez, R. E. G., y Medina, D. M. C. (2023). Prevalencia de leucemia linfoblástica aguda en niños en el Hospital Pediátrico de Sinaloa en el periodo 2017-2021. *Medicina e Investigación Universidad Autónoma del Estado de México*, 11(1), 6–14. <https://doi.org/10.36677/MEDICINAINVESTIGACION.V11I1.20570>
- Mignani, S., Huber, S., Tomás, H., Rodrigues, J., y Majoral, J. P. (2016). Why and how have drug discovery strategies in pharma changed? What are the new mindsets? *Drug Discovery Today*, 21(2), 239–249. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2015.09.007>
- Morgan, R. E., van Staden, C. J., Chen, Y., Kalyanaraman, N., Kalanzi, J., Dunn, R. T., Afshari, C. A., y Hamadeh, H. K. (2013). A multifactorial approach to hepatobiliary transporter assessment enables improved therapeutic compound development. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology*, 136(1), 216–241. <https://doi.org/10.1093/TOXSCI/KFT176>

- Morris, G. M., Ruth, H., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., y Olson, A. J. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. *Journal of computational chemistry*, 30(16), 2785. <https://doi.org/10.1002/JCC.21256>
- Muegge, I., Heald, S. L., y Brittelli, D. (2001). Simple Selection Criteria for Drug-like Chemical Matter. *Journal of Medicinal Chemistry*, 44(12), 1841–1846. <https://doi.org/10.1021/JM015507E>
- Mullighan, C. G. (2012). Molecular genetics of B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(10), 3407–3415. <https://doi.org/10.1172/JCI61203>
- NIH. (2021). *¿Qué es el cáncer?* National Cancer Institute. <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es>
- NIH. (2026). *Acute Lymphocytic Leukemia*. National Cancer Institute. <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/aly1.html>
- Nissink, J. W. M. (2009). Simple Size-Independent Measure of Ligand Efficiency. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 49(6), 1617–1622. <https://doi.org/10.1021/ci900094m>
- Nobel Prize. (2024). *Press release: The Nobel Prize in Chemistry 2024 - NobelPrize.org*. https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2024/press-release/?utm_source=chatgpt.com
- O'Boyle, N. M., Banck, M., James, C. A., Morley, C., Vandermeersch, T., y Hutchison, G. R. (2011). Open Babel: An open chemical toolbox. *Journal of cheminformatics*, 3(10). <https://doi.org/10.1186/1758-2946-3-33>
- Olivas-Aguirre, M., Torres-López, L., Pottosin, I., y Dobrovinskaya, O. (2021). Overcoming Glucocorticoid Resistance in Acute Lymphoblastic Leukemia: Repurposed Drugs Can Improve the Protocol. *Frontiers in oncology*, 11. <https://doi.org/10.3389/FONC.2021.617937>

- Pajankar, A. (2022). Introduction to Data Visualization with Seaborn. *Hands-on Matplotlib*, 243–267. https://doi.org/10.1007/978-1-4842-7410-1_17
- Palacio Mejía, L. S., Alvarez Aceves, M., Morales Carmona, E., Hernández Ávila, J. E., Conacyt-Instituto Nacional de Salud Pública, y Instituto Nacional de Salud Pública. (2022). *Distribución geográfica y temporal de las tasas de mortalidad por Leucemia Linfoblástica Aguda, por municipio y grupo etario, México 2000 – 2020*. https://conahcyt.mx/wp-content/uploads/pronaces/micrositios/salud/leucemia/carteles/2022_1er_Encuentro/PDF/28_Proyecto_CD_y_Salud.pdf
- Pearce, B. C., Sofia, M. J., Good, A. C., Drexler, D. M., y Stock, D. A. (2006). An Empirical Process for the Design of High-Throughput Screening Deck Filters. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 46(3), 1060–1068. <https://doi.org/10.1021/ci050504m>
- Peng, C., Ni, W., Liu, Q., Hu, G., y Zheng, W. (2025). A comprehensive benchmarking of the AlphaFold3 for predicting biomacromolecules and their interactions. *Briefings in Bioinformatics*, 26(6). <https://doi.org/10.1093/BIB/BBAF616>
- Pérez De Marcos, J.-C., Pérez Pineda, P.-L., Méndez Morales, S.-T., Arellano Mendoza, M.-G., y Torres Espíndola, L.-M. (2021). ABC transporter superfamily. An updated overview, relevance in cancer multidrug resistance and perspectives with personalized medicine. *Molecular Biology Reports*, 48(2), 1883–1901. <https://doi.org/10.1007/S11033-021-06155-W/METRICS>
- Pinzi, L., y Rastelli, G. (2019). Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery. *International Journal of Molecular Sciences 2019, Vol. 20, Page 4331*, 20(18), 4331. <https://doi.org/10.3390/IJMS20184331>
- Pourmal, S., Green, E., Bajaj, R., Chemmama, I. E., Knudsen, G. M., Gupta, M., Sali, A., Cheng, Y., Craik, C. S., Kroetz, D. L., y Stroud, R. M. (2024). Structural basis of prostaglandin efflux by MRP4. *Nature Structural y Molecular Biology 2024 31:4*, 31(4), 621–632. <https://doi.org/10.1038/s41594-023-01176-4>

- Poynton, E. F., Van Santen, J. A., Pin, M., Contreras, M. M., McMann, E., Parra, J., Showalter, B., Zaroubi, L., Duncan, K. R., y Linington, R. G. (2025). The Natural Products Atlas 3.0: extending the database of microbially derived natural products. *Nucleic Acids Research*, 53(D1), D691–D699. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAE1093>
- Prieto-Martínez, F. D., Arciniega, M., y Medina-Franco, J. L. (2018). Acoplamiento Molecular: Avances Recientes y Retos. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 21(0), 65–87. <https://doi.org/10.22201/FESZ.23958723E.2018.0.143>
- Pushpakom, S., Iorio, F., Eyers, P. A., Escott, K. J., Hopper, S., Wells, A., Doig, A., Williams, T., Latimer, J., McNamee, C., Norris, A., Sanseau, P., Cavalla, D., y Pirmohamed, M. (2019). Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. *Nature reviews. Drug discovery*, 18(1), 41–58. <https://doi.org/10.1038/NRD.2018.168>
- Ramachandran, G. N., Ramakrishnan, C., y Sasisekharan, V. (1963). Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *Journal of Molecular Biology*, 7(1), 95–99. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(63\)80023-6](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(63)80023-6)
- Renaud, J. P., Chari, A., Ciferri, C., Liu, W. T., Rémygy, H. W., Stark, H., y Wiesmann, C. (2018). Cryo-EM in drug discovery: achievements, limitations and prospects. *Nature Reviews Drug Discovery* 2018 17:7, 17(7), 471–492. <https://doi.org/10.1038/nrd.2018.77>
- Rezayatmand, H., Razmkhah, M., y Razeghian-Jahromi, I. (2022). Drug resistance in cancer therapy: the Pandora's Box of cancer stem cells. *Stem Cell Research y Therapy* 2022 13:1, 13(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/S13287-022-02856-6>
- Riniker, S., y Landrum, G. A. (2015). Better Informed Distance Geometry: Using What We Know to Improve Conformation Generation. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 55(12), 2562–2574. https://doi.org/10.1021/ACS.JCIM.5B00654/SUPPL_FILE/CI5B00654_SI_009.ZIP

- Rodríguez-González, A., Sahores, A., Díaz-Nebreda, A., Yaneff, A., Di Siervi, N., Gómez, N., Monczor, F., Fernández, N., Davio, C., y Shayo, C. (2021). MRP4/ABCC4 expression is regulated by histamine in acute myeloid leukemia cells, determining cAMP efflux. *The FEBS Journal*, 288(1), 229–243. <https://doi.org/10.1111/FEBS.15344>
- Ross, G. A., Lu, C., Scarabelli, G., Albanese, S. K., Houang, E., Abel, R., Harder, E. D., y Wang, L. (2023). The maximal and current accuracy of rigorous protein-ligand binding free energy calculations. *Communications Chemistry* 2023 6:1, 6(1), 222-. <https://doi.org/10.1038/s42004-023-01019-9>
- Saldivar-González, F. I., Fernández-de Gortari, E., Medina-Franco, J. L., Saldivar-González, F. I., Fernández-de Gortari, E., y Medina-Franco, J. L. (2023). Inteligencia artificial en el diseño de fármacos: hacia la inteligencia aumentada. *Educación química*, 34(2), 17–25. <https://doi.org/10.22201/FQ.18708404E.2023.2.83233>
- Saldívar-González, F. I., Huerta-García, C. S., y Medina-Franco, J. L. (2020). Chemoinformatics-based enumeration of chemical libraries: a tutorial. *Journal of Cheminformatics* 2020 12:1, 12(1), 64-. <https://doi.org/10.1186/s13321-020-00466-z>
- Salentin, S., Schreiber, S., Haupt, V. J., Adasme, M. F., y Schroeder, M. (2015). PLIP: fully automated protein–ligand interaction profiler. *Nucleic Acids Research*, 43(Web Server issue), W443. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKV315>
- Salo-Ahen, O. M. H., Alanko, I., Bhadane, R., Alexandre, A. M., Honorato, R. V., Hossain, S., Juffer, A. H., Kabedev, A., Lahtela-Kakkonen, M., Larsen, A. S., Lescrinier, E., Marimuthu, P., Mirza, M. U., Mustafa, G., Nunes-Alves, A., Pantsar, T., Saadabadi, A., Singaravelu, K., y Vanmeert, M. (2020). Molecular Dynamics Simulations in Drug Discovery and Pharmaceutical Development. *Processes* 2021, Vol. 9, Page 71, 9(1), 71. <https://doi.org/10.3390/PR9010071>
- Samra, B., Jabbour, E., Ravandi, F., Kantarjian, H., y Short, N. J. (2020). Evolving therapy of adult acute lymphoblastic leukemia: state-of-the-art treatment and

- future directions. *Journal of Hematology y Oncology* 2020 13:1, 13(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/S13045-020-00905-2>
- Santos-Martins, D., Solis-Vasquez, L., Tillack, A. F., Sanner, M. F., Koch, A., y Forli, S. (2021). Accelerating AutoDock 4 with GPUs and Gradient-Based Local Search. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 17(2), 1060–1073. https://doi.org/10.1021/ACS.JCTC.0C01006/SUPPL_FILE/CT0C01006_SI_001.PDF
- Schein, C. H. (2021). Repurposing approved drugs for cancer therapy. *British Medical Bulletin*, 137(1), 13. <https://doi.org/10.1093/BMB/LDAA045>
- Schrödinger. (2025). *Maestro* (Release 2021.4). Schrödinger, LLC. <https://www.schrodinger.com/>
- Secretaría de Salud. (2023). *Hasta 60% de niñas y niños que padecen cáncer supera la enfermedad*. Gobierno de México. <https://www.gob.mx/salud/prensa/036-hasta-60-de-ninas-y-ninos-que-padecen-cancer-supera-la-enfermedad?idiom=es>
- Sobolev, O. V., Afonine, P. V., Moriarty, N. W., Hekkelman, M. L., Joosten, R. P., Perrakis, A., y Adams, P. D. (2020). A global Ramachandran score identifies protein structures with unlikely stereochemistry. *Structure (London, England : 1993)*, 28(11), 1249. <https://doi.org/10.1016/J.STR.2020.08.005>
- Stein, R. M., Yang, Y., Balias, T. E., O'Meara, M. J., Lyu, J., Young, J., Tang, K., Shoichet, B. K., y Irwin, J. J. (2021). Property-Unmatched Decoys in Docking Benchmarks. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 61(2), 699–714. <https://doi.org/10.1021/ACS.JCIM.0C00598>
- Studer, G., Tauriello, G., Bienert, S., Biasini, M., Johner, N., y Schwede, T. (2021). ProMod3—A versatile homology modelling toolbox. *PLOS Computational Biology*, 17(1), e1008667. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PCBI.1008667>
- Teachey, D. T., y Pui, C. H. (2019). Comparative features and outcomes between paediatric T-cell and B-cell acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet*

- Oncology*, 20(3), e142–e154. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(19\)30031-2/ATTACHMENT/631B4E62-88EA-4EBF-910C-1F85214D864B/MMC1.PDF](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(19)30031-2/ATTACHMENT/631B4E62-88EA-4EBF-910C-1F85214D864B/MMC1.PDF)
- Tebbi, C. K. (2021). Etiology of Acute Leukemia: A Review. *Cancers*, 13(9). <https://doi.org/10.3390/CANCERS13092256>
- The pandas development team. (2024). *Pandas* (2.2.3). <https://doi.org/10.5281/ZENODO.13819579>
- Trifonova, O. P., Lokhov, P. G., y Archakov, A. I. (2014). [Metabolic profiling of human blood]. *Biomeditsinskaia khimiia*, 60(3), 281–294. <https://doi.org/10.18097/PBMC20146003281>
- Van Rossum, G., y Drake, F. L. (2025). *Python 3.13.1 documentation*. <https://docs.python.org/3/reference/index.html>
- Van Santen, J. A., Jacob, G., Singh, A. L., Aniebok, V., Balunas, M. J., Bunsko, D., Neto, F. C., Castaño-Espriu, L., Chang, C., Clark, T. N., Cleary Little, J. L., Delgadillo, D. A., Dorrestein, P. C., Duncan, K. R., Egan, J. M., Galey, M. M., Haeckl, F. P. J., Hua, A., Hughes, A. H., ... Linington, R. G. (2019). The Natural Products Atlas: An Open Access Knowledge Base for Microbial Natural Products Discovery. *ACS Central Science*, 5(11), 1824–1833. <https://doi.org/10.1021/ACSCENTSCI.9B00806>
- Van Vlierberghe, P., y Ferrando, A. (2012). The molecular basis of T cell acute lymphoblastic leukemia. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(10), 3398–3406. <https://doi.org/10.1172/JCI61269>
- Vasan, N., Baselga, J., y Hyman, D. M. (2019). A view on drug resistance in cancer. *Nature*, 575(7782), 299. <https://doi.org/10.1038/S41586-019-1730-1>
- Veber, D. F., Johnson, S. R., Cheng, H. Y., Smith, B. R., Ward, K. W., y Kopple, K. D. (2002). Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. *Journal of Medicinal Chemistry*, 45(12), 2615–2623. <https://doi.org/10.1021/JM020017N>

- Velázquez-Sánchez, A. M., Vázquez-Valadez, V. H., Hernández-Serda, M. A., Aguirre-Vidal, P., y Ángeles-Anguiano, E. R. (2019). El diseño de fármacos asistido por computadora. ¿Mito o realidad? En A. Olazábal Fenochio (Ed.), *Memorias del congreso nacional de tecnología (CONCATEC)* (pp. 64–76). Universidad Nacional Autónoma de México.
- Wager, T. T., Hou, X., Verhoest, P. R., y Villalobos, A. (2010). Moving beyond Rules: The Development of a Central Nervous System Multiparameter Optimization (CNS MPO) Approach To Enable Alignment of Druglike Properties. *ACS Chemical Neuroscience*, 1(6), 435–449. <https://doi.org/10.1021/cn100008c>
- Wang, J. Q., Yang, Y., Cai, C. Y., Teng, Q. X., Cui, Q., Lin, J., Assaraf, Y. G., y Chen, Z. S. (2021). Multidrug resistance proteins (MRPs): Structure, function and the overcoming of cancer multidrug resistance. *Drug Resistance Updates*, 54, 100743. <https://doi.org/10.1016/J.DRUP.2021.100743>
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F. T., De Beer, T. A. P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., y Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W296–W303. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKY427>
- Webb, B., y Sali, A. (2016). Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER. *Current protocols in bioinformatics / editorial board, Andreas D. Baxevanis ... [et al.]*, 54, 5.6.1. <https://doi.org/10.1002/CPBI.3>
- Wen, J., Luo, J., Huang, W., Tang, J., Zhou, H., y Zhang, W. (2015). The Pharmacological and Physiological Role of Multidrug-Resistant Protein 4. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 354(3), 358–375. <https://doi.org/10.1124/JPET.115.225656>
- Wen, X., Si, K., Zhu, D., Zhang, A., Guo, C., Li, M., y Tian, W. (2025). Structural basis of human ABCC4 recognition of cAMP and ligand recognition flexibility. *Cell y Bioscience* 2025 15:1, 15(1), 39-. <https://doi.org/10.1186/S13578-025-01377-Y>

- Williams, C. J., Headd, J. J., Moriarty, N. W., Prisant, M. G., Videau, L. L., Deis, L. N., Verma, V., Keedy, D. A., Hintze, B. J., Chen, V. B., Jain, S., Lewis, S. M., Arendall, W. B., Snoeyink, J., Adams, P. D., Lovell, S. C., Richardson, J. S., y Richardson, D. C. (2018). MolProbity: More and better reference data for improved all-atom structure validation. *Protein Science*, 27(1), 293–315. <https://doi.org/10.1002/PRO.3330>,
- Wittgen, H. G. M., Van Den Heuvel, J. J. M. W., Krieger, E., Schaftenaar, G., Russel, F. G. M., y Koenderink, J. B. (2012). Phenylalanine 368 of multidrug resistance-associated protein 4 (MRP4/ABCC4) plays a crucial role in substrate-specific transport activity. *Biochemical Pharmacology*, 84(3), 366–373. <https://doi.org/10.1016/J.BCP.2012.04.012>
- Wlodawer, A., Li, M., y Dauter, Z. (2017). High-Resolution Cryo-EM Maps and Models: A Crystallographer's Perspective. *Structure*, 25(10), 1589-1597.e1. <https://doi.org/10.1016/j.str.2017.07.012>
- Xia, Y., Sun, M., Huang, H., y Jin, W. L. (2024). Drug repurposing for cancer therapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 9(1), 92. <https://doi.org/10.1038/S41392-024-01808-1>
- Xie, M., Rich, T. C., Scheitrum, C., Conti, M., y Richter, W. (2011). Inactivation of Multidrug Resistance Proteins Disrupts Both Cellular Extrusion and Intracellular Degradation of cAMP. *Molecular Pharmacology*, 80(2), 281–293. <https://doi.org/10.1124/MOL.111.071134>
- Xie, Z., Lv, J., Huang, W., Wu, Z., Zhu, R., Deng, Z., y Long, F. (2025). Structural basis for the reversal of human MRP4-mediated multidrug resistance by lapatinib. *Cell Reports*, 44(4), 115466. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2025.115466>
- Yang, J., y Zhang, Y. (2015). Protein Structure and Function Prediction Using I-TASSER. *Current protocols in bioinformatics / editorial board, Andreas D. Baxevanis ... [et al.]*, 52(1), 5.8.1. <https://doi.org/10.1002/0471250953.BI0508S52>

Zhu, M., Zuber, J., Tan, Z., Sharma, G., y Mathews, D. H. (2024). DecoyFinder: Identification of Contaminants in Sets of Homologous RNA Sequences. *bioRxiv*, 2024.10.12.618037. <https://doi.org/10.1101/2024.10.12.618037>

Zhu, Y., Liu, J., Qiu, F., You, Z., Liu, Z., Zeng, J., Zhong, J., Song, Z., Zhang, S., Lu, J., Jiang, Y., Liu, J., Yan, Z., y Lu, C. (2026). The tumor microenvironment in leukemia: molecular pathways of immune evasion. *Frontiers in Immunology*, 17, 1743920. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2026.1743920>

X. ANEXOS

X.1 Diagramas de Ramachandran de los modelos obtenidos.

X.1.1 AlphaFold 3

Modelo 1:

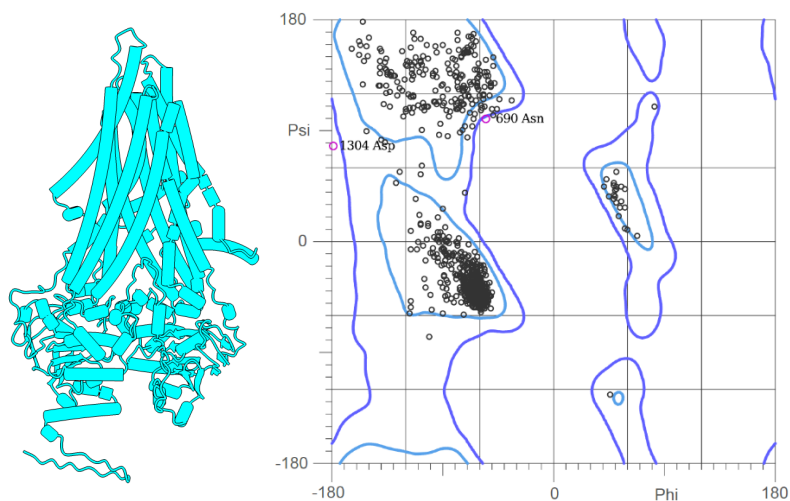


Figura A1. Modelo 1 generado por el servidor AlphaFold 3, en conjunto con su diagrama de Ramachandran

Modelo 2:

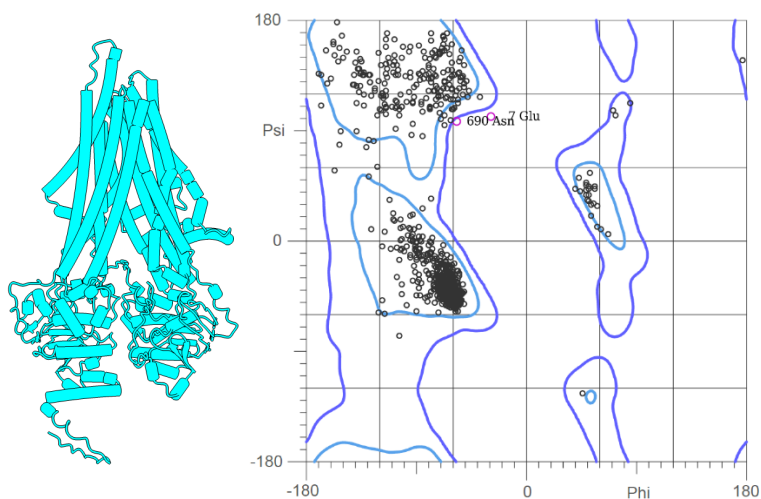


Figura A2. Modelo 2 generado por el servidor AlphaFold 3, en conjunto con su diagrama de Ramachandran

Modelo 3:

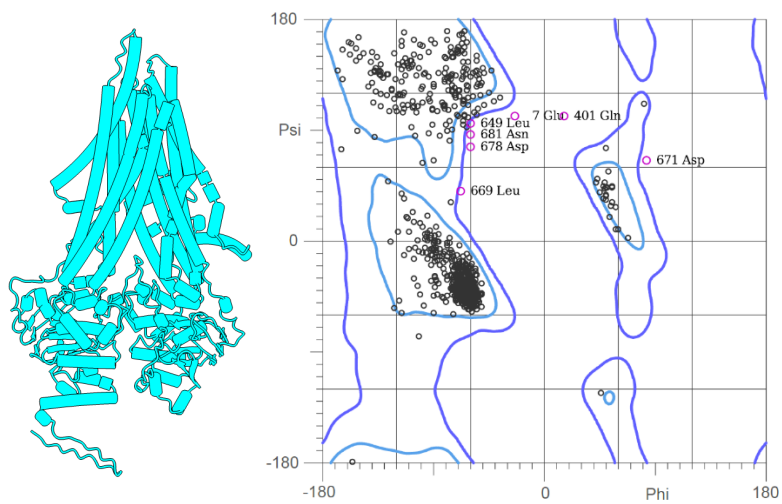


Figura A3. Modelo 3 generado por el servidor AlphaFold 3, en conjunto con su diagrama de Ramachandran

Modelo 4:

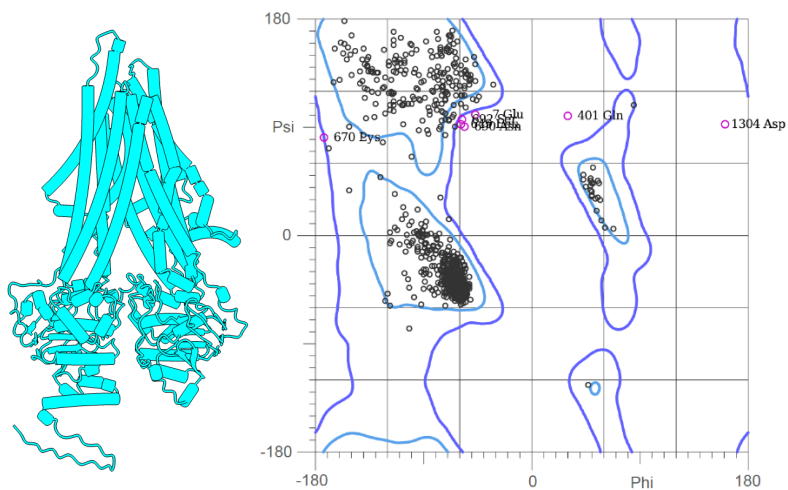


Figura A4. Modelo 4 generado por el servidor AlphaFold 3, en conjunto con su diagrama de Ramachandran

Modelo 4:

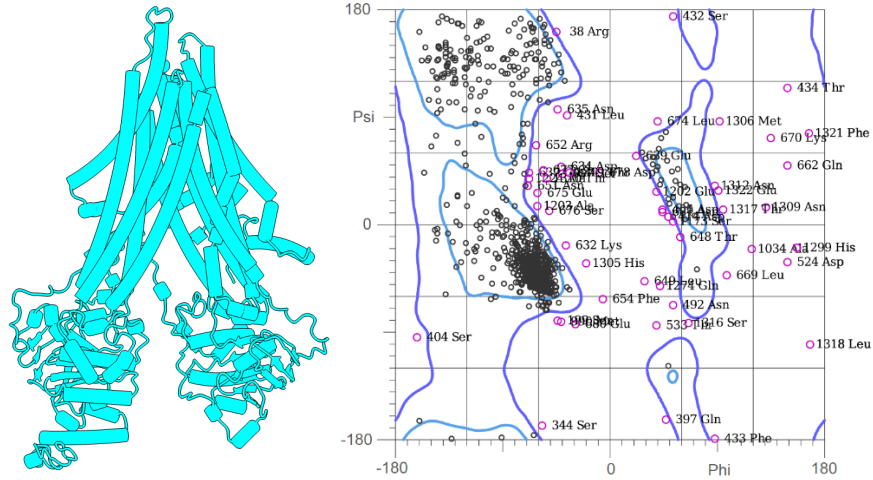


Figura A9. Modelo 4 generado por el servidor I-Tasser, en conjunto con su diagrama de Ramachandran.

Modelo 5:

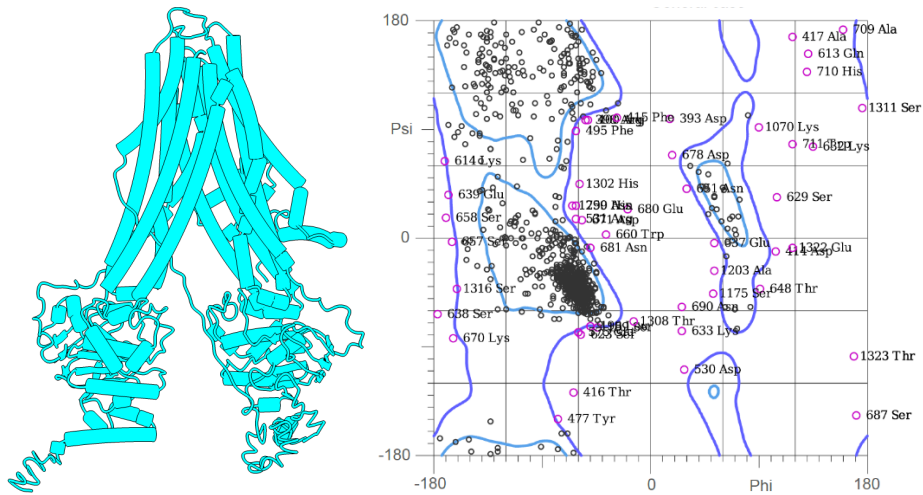


Figura A10. Modelo 5 generado por el servidor I-Tasser, en conjunto con su diagrama de Ramachandran.

X.3.1 Robetta

Modelo 1:

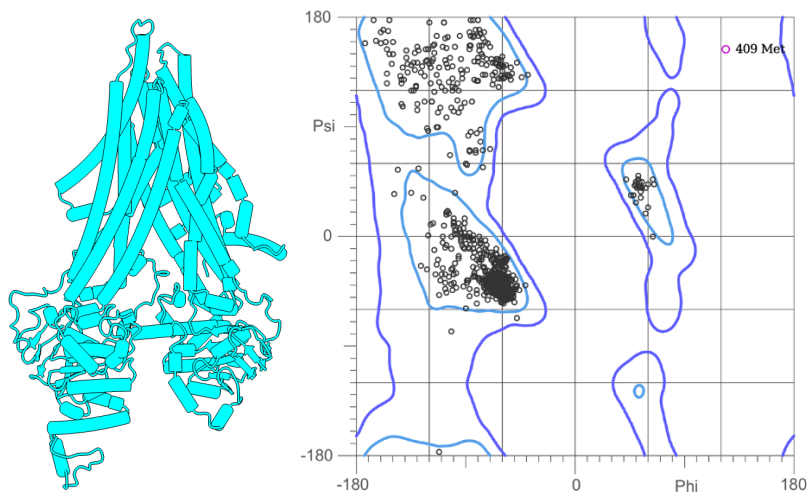


Figura A11. Modelo 1 generado por el servidor Robetta, en conjunto con su diagrama de Ramachandran.

Modelo 2:

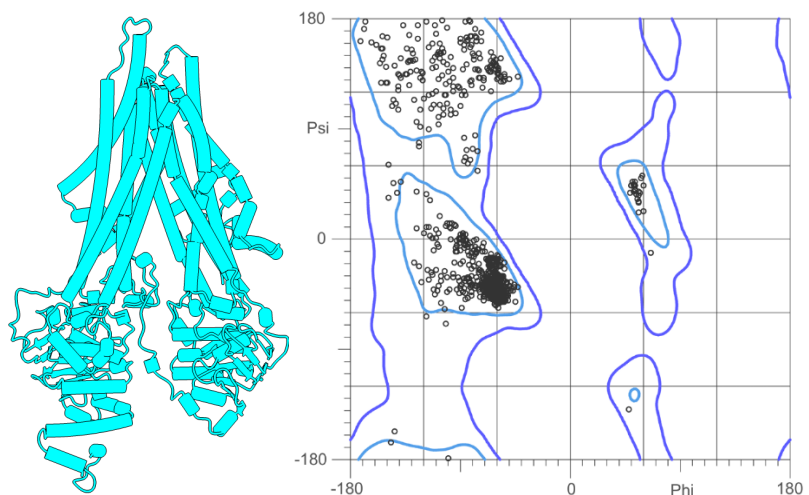


Figura A12. Modelo 2 generado por el servidor Robetta, en conjunto con su diagrama de Ramachandran.

Modelo 3:

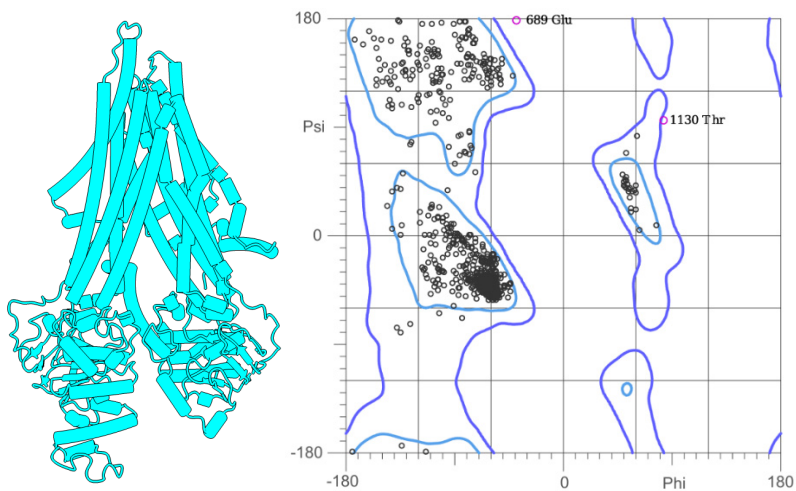


Figura A13. Modelo 3 generado por el servidor Robetta, en conjunto con su diagrama de Ramachandran.

Modelo 4:

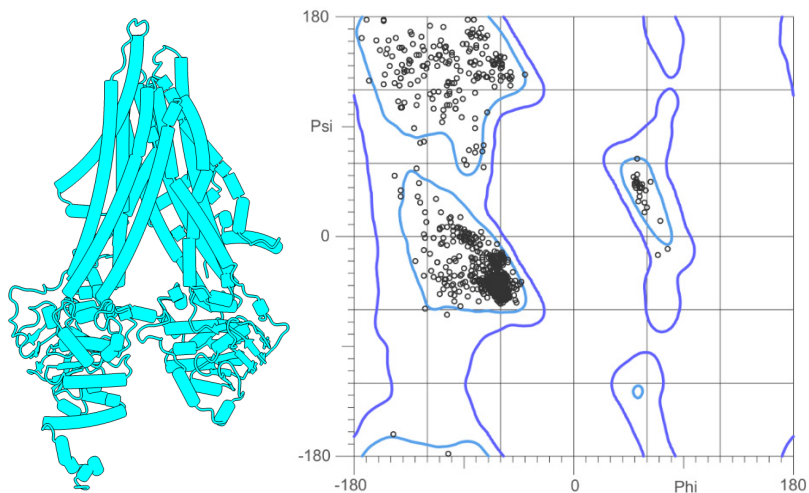


Figura A14. Modelo 4 generado por el servidor Robetta, en conjunto con su diagrama de Ramachandran.

Modelo 5:

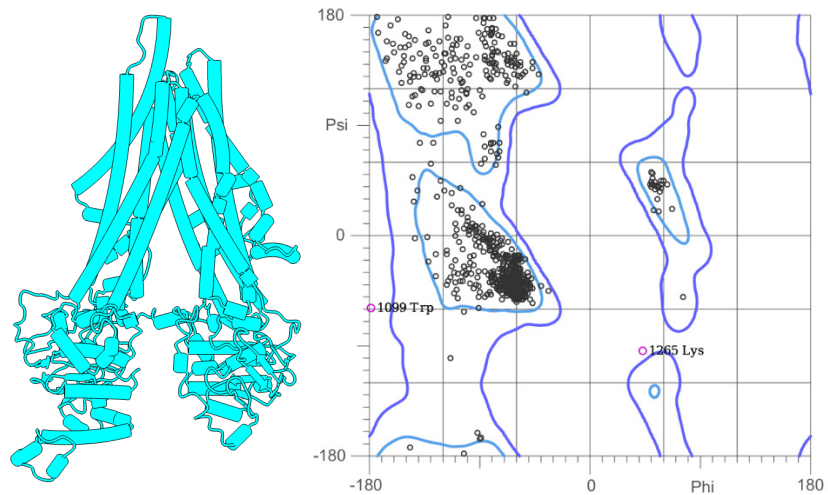


Figura A15. Modelo 5 generado por el servidor Robetta, en conjunto con su diagrama de Ramachandran.

X.2 Nombres de las moléculas e identificadores:

Tabla A1. Información de las moléculas seleccionadas en ambas metodologías.

Nombre	ID	Canonical SMILES
Ceefourin-1	704306	<chem>CN1C(=NNC1=S)CSC2=NC3=C(C=CC=C3)S2</chem>
Albendazol	2082	<chem>CCCSC1=CC2=C(C=C1)N=C(N2)NC(=O)OC</chem>
Lifitegrast	11965427	<chem>CS(=O)(=O)C1=CC(=CC=C1)C[C@@H](C(=O)O)NC(=O)C2=C(C3=C(C=C2Cl)CN(CC3)C(=O)C4=CC5=C(C=C4)C=CO5)Cl</chem>
Avatrombopag	9852519	<chem>C1CCC(CC1)N2CCN(CC2)C3=C(C4=CC(=CS4)Cl)N=C(NC(=O)C5=CN=C(C(=C5)Cl)N6CCC(CC6)C(=O)O)S3</chem>
Vemurafenib	42611257	<chem>CCCS(=O)(=O)NC1=C(C(=C(C=C1)F)C(=O)C2=CNC3=C2C=C(C=N3)C4=CC=C(C=C4)Cl)F</chem>
Montelukast	5281040	<chem>CC(C)(C1=CC=CC=C1CC[C@H](C2=CC=CC(=C2)/C=C/C3=NC4=C(C=CC(=C4)Cl)C=C3)SCC5(CC5)CC(=O)O)O</chem>
Imatinib	5291	<chem>CC1=C(C=C(C=C1)NC(=O)C2=CC=C(C=C2)CN3CCN(CC3)C)NC4=NC=CC(=N4)C5=CN=CC=C5</chem>
Sterhirsutina H	NPA018626	<chem>C=C1C(=O)C(=C2C[C@H]3C[C@@](C)(C[C@H]3[C@]12C)C(=O)O)OC(=O)[C@@]4(C)C[C@@H]5CC6=C(C(=O)C(=C)[C@@]6(C)[C@@H]5C4)OC(=O)[C@@]7(C)C[C@@H]8C[C@H]9C(=O)C(=C(CO C)[C@@]9(C)[C@@H]8C7)O</chem>
Sterhirsutina I	NPA011832	<chem>C[C@H]1C(=O)C[C@@H]2C[C@H]3C[C@@](C)(C[C@H]3[C@]12C)C(=O)OC4=C5C[C@H]6C[C@@](C)(C[C@H]6[C@]5(C)C(=C)C4=O)C(=O)OC7=C8C[C@H]9C[C@@](C)(C[C@H]9[C@]8(C)C(=C)C7=O)C(=O)O</chem>
MC-031	NPA020635	<chem>C[C@@H]1CC23[C@H](/C=C\CCCC[C@@H]4C=C[C@H]5[C@@H](CCC[C@H]5O[C@H]6C[C@H]([C@@H]([C@@H](C)O6)O[C@H]7C[C@H]([C@@H](C</chem>

		<chem>@@H](C)O7)O)OC(=O)C8=C(C)C(=CC=C8O)Cl)O)[C@]4(C)C(=O)OC(=C2O)C(=O)O3)C=C1C(=O)O</chem>
Aspergilazina A	NPA013206	<chem>C1=CC2=C(C=C1)N(C=C2C[C@H]3C(=O)N4CCC[C@H]4C(=O)N3)C5=CC6=C(C=C5)NC=C6C[C@H]7C(=O)N8CCC[C@H]8C(=O)N7</chem>
Aspergicandidusina A	NPA029076	<chem>C1=CC2=C(C=C1)N(C=C2C[C@H]3C(=O)N4CCC[C@H]4C(=O)N3)C5=CC6=C(C=C5)NC=C6C[C@H]7C(=O)N8CCC[C@H]8C(=O)N7</chem>
Enhypirazinona A	NPA026693	<chem>CC(C)C1=NC(=C(CC2=CNC3=C2C=CC=C3)NC1=O)/C=C/C4=CC=CC=C4</chem>

X.3 Ensemble docking:

X.1.1.1 Resultados del top 15% de la biblioteca NPA:

Tabla A2. Datos crudos de ensemble docking de los primeros 150 compuestos ordenados acorde a la diana 8IZ7.

ID	Energy_8IZ7	Energy_8ZBU	Energy_9KRM	Energy_8IZ9
NPA029403	-11.72	-10.93	-11.84	-12.15
NPA013175	-11.64	-11.30	-10.05	-11.44
NPA014966	-11.57	-9.34	-11.55	-13.10
NPA013206	-11.25	-11.87	-10.40	-11.47
NPA023251	-11.10	-11.25	-10.30	-7.28
NPA026564	-10.90	-9.41	-9.31	-10.37
NPA015758	-10.85	-10.61	-11.42	-9.98
NPA023862	-10.84	-10.16	-9.77	-10.41
NPA029880	-10.79	-11.16	-10.99	-11.91
NPA005062	-10.72	-11.16	-10.76	-12.32
NPA016710	-10.56	-10.14	-10.87	-11.69
NPA013325	-10.52	-10.24	-10.81	-10.77
NPA008122	-10.52	-10.53	-10.99	-11.63
NPA031750	-10.48	-10.81	-12.05	-9.46
NPA033485	-10.41	-9.70	-9.61	-10.88
NPA003424	-10.40	-10.61	-10.81	-10.83
NPA007920	-10.36	-10.53	-10.56	-12.79
NPA033162	-10.35	-11.97	-10.54	-10.08
NPA005378	-10.32	-11.35	-10.58	-11.64
NPA020793	-10.22	-9.40	-8.40	-10.58
NPA020263	-10.22	-9.86	-9.30	-11.47
NPA007481	-10.20	-11.16	-10.23	-11.26
NPA022948	-10.20	-9.80	-10.40	-9.76

NPA030223	-10.17	-11.30	-11.19	-11.94
NPA036252	-10.17	-9.59	-9.48	-9.10
NPA022088	-10.15	-10.25	-10.84	-10.49
NPA016487	-10.14	-8.65	-9.42	-10.44
NPA030741	-10.13	-12.88	-11.31	-10.12
NPA030740	-10.11	-10.08	-10.03	-10.59
NPA015376	-10.10	-5.11	-12.80	-13.21
NPA025623	-10.10	-9.34	-8.41	-10.06
NPA024929	-10.09	-9.74	-9.47	-9.69
NPA036138	-10.04	-11.41	-8.40	-11.12
NPA023096	-10.03	-10.49	-10.10	-11.37
NPA015462	-10.02	-9.49	-8.91	-10.88
NPA036400	-10.00	-9.95	-10.75	-10.58
NPA020869	-9.96	-10.95	-9.72	-10.43
NPA006244	-9.96	-9.21	-10.73	-11.12
NPA009152	-9.91	-8.30	-8.98	-9.48
NPA020779	-9.87	-9.56	-8.22	-10.13
NPA008421	-9.84	-10.68	-9.82	-9.57
NPA025253	-9.84	-10.62	-10.29	-11.23
NPA002832	-9.81	-10.44	-9.17	-10.95
NPA022087	-9.78	-9.65	-8.99	-9.19
NPA003569	-9.78	-10.61	-10.73	-11.00
NPA004299	-9.75	-10.59	-11.20	-10.55
NPA015871	-9.74	-9.27	-12.16	-10.10
NPA031032	-9.72	-10.03	-10.03	-10.24
NPA031831	-9.72	-10.35	-9.90	-10.49
NPA007252	-9.71	-8.31	-9.22	-9.48
NPA011863	-9.71	-10.90	-9.04	-9.17
NPA005162	-9.66	-9.18	-8.24	-9.19

NPA013177	-9.63	-8.51	-7.87	-9.34
NPA020777	-9.62	-10.57	-9.39	-10.40
NPA009578	-9.62	-10.07	-9.29	-10.46
NPA030788	-9.62	-10.45	-10.01	-11.72
NPA029632	-9.59	-9.69	-8.81	-9.17
NPA005468	-9.55	-9.97	-10.16	-9.40
NPA032185	-9.54	-9.52	-9.25	-10.47
NPA004328	-9.54	-9.58	-9.28	-9.82
NPA028569	-9.52	-10.63	-9.53	-9.57
NPA001761	-9.52	-10.73	-8.95	-9.66
NPA011058	-9.52	-9.07	-8.51	-9.34
NPA011913	-9.51	-10.44	-9.35	-10.01
NPA026792	-9.46	-10.26	-9.73	-11.42
NPA033163	-9.45	-10.95	-9.48	-9.95
NPA003457	-9.44	-9.61	-9.29	-9.93
NPA008347	-9.44	-11.14	-10.04	-10.44
NPA027967	-9.42	-8.33	-7.58	-9.78
NPA002139	-9.41	-9.67	-9.49	-10.30
NPA031096	-9.38	-9.58	-9.26	-10.13
NPA030712	-9.36	-10.24	-9.19	-10.76
NPA010897	-9.34	-10.45	-9.18	-10.65
NPA004773	-9.33	-9.73	-9.42	-9.47
NPA009630	-9.33	-12.22	-10.75	-10.92
NPA030572	-9.33	-10.40	-8.91	-9.57
NPA014086	-9.32	-8.58	-8.44	-10.44
NPA027673	-9.31	-10.03	-8.80	-9.52
NPA035919	-9.31	-9.23	-8.97	-9.22
NPA026185	-9.30	-9.67	-8.68	-10.63
NPA013664	-9.29	-11.22	-10.02	-10.39

NPA035563	-9.28	-10.56	-9.78	-9.55
NPA015958	-9.28	-8.90	-7.06	-9.72
NPA029076	-9.27	-9.55	-8.96	-9.62
NPA014668	-9.27	-8.45	-9.33	-9.78
NPA007098	-9.26	-9.86	-8.92	-9.72
NPA022086	-9.26	-9.51	-8.88	-9.82
NPA028573	-9.26	-10.17	-8.81	-9.88
NPA018919	-9.25	-10.33	-9.22	-9.07
NPA022091	-9.25	-8.09	-8.63	-10.17
NPA026840	-9.25	-9.00	-8.97	-9.43
NPA030984	-9.25	-8.21	-8.16	-8.29
NPA005072	-9.24	-8.87	-7.99	-9.88
NPA030714	-9.23	-9.65	-9.30	-10.00
NPA024251	-9.23	-9.66	-9.57	-9.92
NPA028426	-9.22	-9.49	-10.57	-9.96
NPA011744	-9.22	-8.65	-8.94	-10.12
NPA000441	-9.22	-8.12	-9.49	-9.15
NPA035370	-9.22	-8.92	-9.52	-9.57
NPA002503	-9.20	-7.88	-9.40	-9.56
NPA007557	-9.19	-7.98	-9.23	-10.19
NPA027042	-9.19	-9.62	-8.61	-9.45
NPA028493	-9.18	-9.17	-8.19	-9.54
NPA006541	-9.17	-8.80	-8.64	-10.20
NPA034419	-9.16	-9.87	-8.38	-9.72
NPA000840	-9.16	-10.14	-9.11	-10.33
NPA026562	-9.15	-9.21	-9.67	-10.64
NPA017170	-9.15	-9.05	-8.85	-9.77
NPA018563	-9.15	-9.13	-8.61	-9.75
NPA020778	-9.14	-9.32	-8.55	-9.78

NPA001985	-9.14	-8.57	-7.62	-8.68
NPA016821	-9.14	-10.26	-9.96	-10.35
NPA032735	-9.12	-8.64	-8.48	-8.85
NPA009163	-9.12	-10.19	-10.12	-10.06
NPA015043	-9.09	-9.30	-9.23	-10.31
NPA017656	-9.09	-9.35	-8.80	-10.63
NPA016780	-9.09	-9.57	-9.38	-10.11
NPA029878	-9.09	-9.38	-9.53	-9.33
NPA024460	-9.08	-9.37	-9.54	-9.19
NPA030289	-9.07	-8.56	-9.07	-9.72
NPA021839	-9.06	-10.25	-9.03	-10.80
NPA009504	-9.06	-9.34	-9.28	-9.64
NPA009357	-9.06	-9.72	-8.22	-9.32
NPA032454	-9.05	-9.78	-8.21	-9.56
NPA026841	-9.04	-9.52	-8.70	-9.51
NPA020780	-9.04	-11.13	-9.32	-11.55
NPA009228	-9.03	-9.47	-9.04	-9.91
NPA026693	-9.03	-7.88	-9.88	-9.21
NPA012008	-9.03	-10.11	-8.15	-9.96
NPA004685	-9.02	-7.77	-7.23	-8.26
NPA002265	-9.02	-10.09	-9.33	-9.73
NPA026444	-9.02	-9.48	-9.68	-10.11
NPA030441	-9.02	-8.18	-7.68	-8.05
NPA000875	-9.02	-9.39	-8.64	-10.19
NPA000724	-9.01	-10.00	-11.02	-9.74
NPA019559	-9.01	-7.11	-8.23	-9.53
NPA023861	-9.00	-9.66	-8.93	-10.08
NPA014065	-9.00	-8.56	-8.11	-10.01
NPA021837	-9.00	-9.64	-9.38	-9.82

NPA019086	-8.99	-8.63	-9.65	-9.97
NPA028574	-8.98	-8.19	-9.88	-10.36
NPA004618	-8.98	-8.41	-7.91	-8.12
NPA025622	-8.98	-9.40	-8.13	-9.76
NPA034031	-8.97	-9.12	-8.18	-9.09
NPA018427	-8.97	-8.73	-8.83	-9.55
NPA009935	-8.97	-9.14	-8.99	-10.57
NPA033118	-8.96	-9.57	-9.06	-10.12
NPA003228	-8.96	-9.32	-9.46	-10.29
NPA032530	-8.96	-9.14	-8.31	-8.90

X.2.1 Resultados del top 15% finalistas de la biblioteca DB:

Tabla A3. Datos crudos de ensemble docking de los primeros 150 compuestos ordenados acorde a la diana 8IZ7.

ID	Energy_8IZ7	Energy_8ZBU	Energy_9KRM	Energy_8IZ9
60838	-11.72	-10.71	-10.64	-11.20
10531	-11.01	-10.62	-9.99	-10.95
53472683	-10.54	-11.64	-10.87	-10.88
58486178	-10.49	-10.17	-9.71	-10.67
11950726	-10.45	-10.58	-10.78	-11.20
8223	-10.36	-10.98	-9.79	-10.02
138497449	-10.13	-9.51	-9.91	-10.37
11527495	-10.10	-10.11	-8.76	-10.19
46202416	-10.09	-9.39	-8.94	-10.78
107715	-10.09	-11.30	-10.28	-10.56
25141092	-10.07	-10.49	-10.21	-10.64
134168328	-10.05	-9.22	-10.25	-9.58
51049968	-9.97	-10.77	-10.44	-11.10
56649297	-9.97	-9.71	-10.12	-10.29
86567195	-9.94	-10.18	-10.29	-11.27
135390808	-9.90	-10.99	-9.63	-11.06
11387605	-9.85	-9.22	-10.34	-9.75
24771824	-9.82	-9.66	-8.58	-9.09
25019940	-9.79	-10.04	-10.19	-10.58
129202507	-9.78	-9.88	-10.52	-10.11
135390910	-9.75	-10.18	-9.53	-10.25
25262792	-9.73	-9.84	-9.56	-9.90
118374999	-9.68	-9.84	-9.15	-10.31
54771494	-9.66	-10.34	-10.09	-9.94

23646577	-9.66	-9.10	-8.21	-9.02
24812717	-9.66	-10.13	-9.51	-10.60
23725625	-9.65	-9.45	-9.77	-10.24
5288329	-9.62	-10.17	-8.96	-8.58
49848070	-9.62	-9.69	-9.26	-10.29
11527774	-9.62	-9.33	-9.45	-10.53
11215055	-9.61	-9.79	-9.63	-10.68
15991573	-9.58	-9.74	-9.95	-10.75
5281040	-9.58	-9.60	-9.38	-10.41
54732242	-9.56	-10.59	-8.93	-9.85
25049750	-9.54	-10.01	-9.98	-10.59
60956	-9.53	-9.58	-9.74	-9.68
25203955	-9.52	-9.67	-7.68	-9.95
151115	-9.51	-9.57	-10.16	-10.40
44516953	-9.50	-9.78	-9.65	-11.05
10050566	-9.49	-9.56	-9.38	-9.29
11753673	-9.49	-10.09	-9.54	-10.68
68389008	-9.46	-9.95	-9.05	-10.82
58212050	-9.44	-9.00	-9.11	-10.93
447524	-9.40	-9.55	-9.46	-9.79
10113978	-9.39	-9.15	-8.31	-10.33
24737629	-9.39	-9.45	-9.77	-9.74
46213929	-9.38	-9.20	-8.72	-9.83
24812719	-9.37	-9.43	-9.29	-10.28
9939865	-9.37	-9.10	-8.28	-8.81
90456533	-9.37	-8.88	-9.28	-10.26
11485656	-9.37	-9.30	-9.81	-9.31
42611257	-9.37	-8.94	-8.88	-9.05
5405	-9.37	-9.12	-8.88	-9.74

3378093	-9.36	-10.67	-10.45	-10.38
25262965	-9.34	-8.80	-8.71	-8.93
46215462	-9.33	-10.72	-9.67	-10.34
11678534	-9.33	-9.39	-9.07	-9.03
10182969	-9.32	-9.23	-9.07	-10.11
44631903	-9.30	-8.49	-8.18	-8.89
134393443	-9.29	-9.52	-9.94	-9.86
16040281	-9.29	-9.44	-9.05	-10.56
2605	-9.27	-9.77	-8.98	-10.23
137434175	-9.25	-9.26	-8.95	-10.00
445754	-9.25	-9.31	-8.52	-10.22
132271862	-9.25	-9.50	-9.32	-9.25
5326914	-9.25	-9.83	-9.49	-10.02
121301049	-9.23	-10.34	-9.49	-11.22
5717	-9.22	-10.08	-9.73	-10.30
53359074	-9.21	-10.76	-9.85	-10.53
24941249	-9.20	-8.47	-8.97	-9.57
124123797	-9.19	-9.27	-9.48	-9.92
25171648	-9.16	-8.94	-9.63	-9.24
71113742	-9.16	-9.53	-9.56	-9.83
146421275	-9.16	-9.51	-9.41	-9.53
11987832	-9.16	-9.55	-7.96	-8.97
118513932	-9.15	-8.31	-8.83	-8.92
24941254	-9.15	-9.10	-8.96	-9.83
44129648	-9.15	-9.17	-9.58	-9.70
51001932	-9.14	-9.12	-9.03	-8.84
445575	-9.14	-10.05	-8.95	-10.99
53497429	-9.13	-10.38	-9.90	-10.23
16124208	-9.12	-9.62	-9.44	-10.57

66558664	-9.12	-10.00	-9.30	-10.74
5291	-9.10	-9.22	-9.69	-10.08
78210288	-9.10	-10.21	-8.75	-9.79
447725	-9.10	-9.82	-8.74	-9.95
54682461	-9.10	-9.65	-8.51	-9.79
137528262	-9.10	-9.39	-8.84	-9.79
86279927	-9.08	-8.64	-8.89	-9.63
11397521	-9.07	-8.06	-8.15	-9.71
24905144	-9.07	-7.71	-7.91	-8.18
89670174	-9.07	-10.05	-10.38	-10.08
56931136	-9.07	-8.94	-9.63	-9.70
60919	-9.06	-9.94	-8.48	-9.21
219077	-9.05	-9.63	-9.29	-10.54
89992620	-9.05	-9.80	-9.89	-11.47
208951	-9.05	-9.71	-9.41	-9.59
447767	-9.04	-9.20	-9.97	-9.60
5287994	-9.04	-10.29	-9.99	-10.50
54682555	-9.03	-9.50	-8.77	-10.16
4988454	-9.02	-9.82	-9.87	-10.26
91754520	-9.02	-9.25	-9.12	-10.30
23658582	-9.02	-9.20	-8.19	-9.83
10298385	-9.02	-9.16	-9.27	-9.58
135564985	-9.01	-9.08	-8.49	-9.62
16678941	-9.01	-9.81	-9.90	-10.58
97226	-9.01	-9.16	-8.23	-9.50
448408	-9.01	-9.56	-9.96	-9.96
9827968	-9.00	-9.02	-9.33	-9.92
24941253	-9.00	-9.49	-9.59	-10.42
56934415	-9.00	-10.37	-9.28	-11.25

984170	-8.99	-8.90	-8.59	-9.18
139399801	-8.99	-9.56	-10.76	-9.89
446399	-8.99	-9.31	-8.69	-9.72
156422	-8.98	-9.31	-9.01	-9.69
76958276	-8.97	-8.97	-9.05	-10.16
9852519	-8.96	-8.86	-9.89	-9.84
11965427	-8.95	-10.68	-9.73	-11.24
124147085	-8.94	-8.72	-8.56	-9.16
68488178	-8.92	-9.38	-8.92	-10.60
5074	-8.92	-9.48	-9.22	-10.22
11527519	-8.91	-8.59	-8.89	-9.18
23626877	-8.91	-9.13	-9.69	-9.91
444031	-8.90	-8.82	-8.41	-10.03
657077	-8.90	-9.30	-8.50	-8.96
5311501	-8.89	-8.85	-9.49	-10.09
68026984	-8.88	-8.95	-9.06	-9.72
6456014	-8.88	-8.42	-8.91	-9.54
118063735	-8.88	-9.21	-9.22	-10.72
154257	-8.88	-9.44	-8.46	-9.91
11567682	-8.88	-8.94	-8.66	-9.06
57379345	-8.88	-9.36	-8.59	-8.97
25155578	-8.87	-9.08	-9.04	-9.41
9872780	-8.87	-9.39	-8.43	-9.81
16007088	-8.86	-9.62	-9.21	-9.81
44623998	-8.86	-9.60	-9.18	-9.89
5288018	-8.85	-8.12	-8.01	-9.03
49836093	-8.85	-8.44	-8.99	-8.28
122262	-8.85	-8.95	-9.07	-8.98
3396	-8.84	-9.42	-8.74	-9.51

122678117	-8.84	-9.53	-8.74	-9.98
10343641	-8.84	-10.27	-9.99	-10.63
11634458	-8.83	-8.14	-8.20	-9.85
46207957	-8.83	-9.78	-9.39	-10.49
9851116	-8.83	-8.85	-9.21	-9.45
73051434	-8.83	-9.48	-9.36	-10.00
132056570	-8.83	-8.57	-8.45	-9.10
24832041	-8.83	-9.13	-9.27	-9.47
68748835	-8.83	-9.55	-9.63	-10.56

X.3.1 Tablas de interacción de los compuestos de NPA

X.3.1.1 Compuesto NPA029076 (aspergicandidusina A)

Tabla A4. Frecuencia de contacto de los residuos relevantes de MRP4 con aspergicandidusina A, a lo largo del ensemble docking, sintetizada a partir del mapa de interacciones de ProLIF.

Conformación	8IZ7			8ZBU			9KRM			8IZ9			Total	
	Pose	0	1	2	0	1	2	0	1	2	0	1		2
TRP995.A	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	12
LEU367.A	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	-	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	11
PHE324.A	<input checked="" type="checkbox"/>	-	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	11
PHE368.A	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	-	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	-	-	-	8
MET992.A	-	-	-	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	-	-	-	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	-	-	5
HIS152.A	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	-	-	-	-	-	-	<input checked="" type="checkbox"/>	-	-	-	4
ARG998.A	-	-	-	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	-	-	-	-	-	-	-	3
LEU363.A	-	-	<input checked="" type="checkbox"/>	-	-	<input checked="" type="checkbox"/>	-	-	-	-	-	-	-	2

X.3.2.1 Compuesto NPA026693 (enhypirazinona A)

Tabla A5. Frecuencia de contacto de los residuos relevantes de MRP4 con enhypirazinona A, a lo largo del ensemble docking, sintetizada a partir del mapa de interacciones de ProLIF.

Conformación	8IZ7			8ZBU			9KRM			8IZ9			Total	
	Pose	0	1	2	0	1	2	0	1	2	0	1		2
TRP995.A	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	12
LEU367.A	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	-	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	11
PHE324.A	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	-	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	11
PHE368.A	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	-	-	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	-	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	9
MET992.A	-	-	-	<input checked="" type="checkbox"/>	-	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	-	-	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	6
LEU363.A	-	-	-	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	-	-	<input checked="" type="checkbox"/>	-	<input checked="" type="checkbox"/>	-	<input checked="" type="checkbox"/>	5
ARG998.A	-	-	-	-	-	<input checked="" type="checkbox"/>	-	-	-	-	-	-	-	1
GLN994.A	-	-	-	-	<input checked="" type="checkbox"/>	-	-	-	-	-	-	-	-	1

X.3.3.1 Compuesto NPA013206 (aspergilazina A)

Tabla A6. Frecuencia de contacto de los residuos relevantes de MRP4 con aspergilazina A, a lo largo del ensemble docking, sintetizada a partir del mapa de interacciones de ProLIF.

Conformación	8IZ7			8ZBU			9KRM			8IZ9			Total	
	Pose	0	1	2	0	1	2	0	1	2	0	1		2
TRP995.A	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	12
MET992.A	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	-	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	11
PHE368.A	-	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	11
PHE324.A	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	-	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	-	10
LEU367.A	<input checked="" type="checkbox"/>	-	-	-	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	-	-	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	7
ARG998.A	-	-	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	-	<input checked="" type="checkbox"/>	-	-	-	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	-	-	5
LEU363.A	-	-	-	-	-	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	-	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	-	-	5
HIS152.A	-	<input checked="" type="checkbox"/>	-	-	<input checked="" type="checkbox"/>	-	-	-	-	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	-	-	4
GLN994.A	-	-	-	<input checked="" type="checkbox"/>	-	-	-	-	-	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	-	-	3
ARG946.A	-	-	-	-	-	<input checked="" type="checkbox"/>	-	-	-	-	-	-	-	1

X.4.1 Tablas de interacción de los compuestos de DB

X.4.1.1 Compuesto 42611257 (vemurafenib)

Tabla A7. Frecuencia de contacto de los residuos relevantes de MRP4 con vemurafenib, a lo largo del ensemble docking, sintetizada a partir del mapa de interacciones de ProLIF.

Conformación	8IZ7			8ZBU			9KRM			8IZ9			Total	
	Pose	0	1	2	0	1	2	0	1	2	0	1		2
TRP995.A	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	12
PHE368.A	<input checked="" type="checkbox"/>	-	-	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	-	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	9
LEU363.A	<input checked="" type="checkbox"/>	-	-	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	-	9
PHE324.A	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	-	<input checked="" type="checkbox"/>	-	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	-	-	<input checked="" type="checkbox"/>	8
LEU367.A	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	-	-	-	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	-	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	8
MET992.A	<input checked="" type="checkbox"/>	-	-	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	-	-	<input checked="" type="checkbox"/>	-	7
ARG998.A	-	-	-	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	-	-	-	<input checked="" type="checkbox"/>	-	<input checked="" type="checkbox"/>	-	5
GLN994.A	-	-	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	-	<input checked="" type="checkbox"/>	-	-	-	-	-	-	-	3
HIS152.A	-	-	<input checked="" type="checkbox"/>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1

X.4.2.1 Compuesto 5291 (imatinib)

Tabla A8. Frecuencia de contacto de los residuos relevantes de MRP4 con imatinib, a lo largo del ensemble docking, sintetizada a partir del mapa de interacciones de ProLIF.

Conformación	8IZ7			8ZBU			9KRM			8IZ9			Total	
	Pose	0	1	2	0	1	2	0	1	2	0	1		2
TRP995.A	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	12
LEU367.A	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	-	11
PHE368.A	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	-	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	11
PHE324.A	-	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	-	10
MET992.A	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	-	<input checked="" type="checkbox"/>	-	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	10
HIS152.A	-	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	-	-	-	<input checked="" type="checkbox"/>	-	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	-	6
LEU363.A	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	-	-	<input checked="" type="checkbox"/>	-	-	-	-	-	-	<input checked="" type="checkbox"/>	-	4
ARG998.A	-	-	-	-	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	-	-	-	-	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	-	4
ARG946.A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	-	-	2
GLN994.A	-	-	-	-	-	-	-	<input checked="" type="checkbox"/>	-	<input checked="" type="checkbox"/>	-	-	-	2

X.4.3.1 Compuesto 5281040 (montelukast)

Tabla A9. Frecuencia de contacto de los residuos relevantes de MRP4 con montelukast, a lo largo del ensemble docking, sintetizada a partir del mapa de interacciones de ProLIF.

Conformación	8IZ7			8ZBU			9KRM			8IZ9			Total
Pose	0	1	2	0	1	2	0	1	2	0	1	2	
TRP995.A	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	12
PHE368.A	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	-	<input checked="" type="checkbox"/>	11
LEU367.A	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	-	-	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	10
PHE324.A	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	-	-	<input checked="" type="checkbox"/>	10
HIS152.A	-	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	-	-	-	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	8
ARG946.A	-	-	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	-	-	-	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	7
MET992.A	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	-	<input checked="" type="checkbox"/>	-	-	-	-	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	7
LEU363.A	-	-	-	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	-	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	-	<input checked="" type="checkbox"/>	-	<input checked="" type="checkbox"/>	6
ARG998.A	-	-	-	<input checked="" type="checkbox"/>	-	<input checked="" type="checkbox"/>	-	-	-	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	5
GLN994.A	-	-	-	-	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	-	-	-	-	-	<input checked="" type="checkbox"/>	3

X.4 Propiedades fisicoquímicas

Tabla A10. Parámetros, límites y codificación de las reglas utilizadas en el servidor SwissADME para la evaluación de propiedades *DrugLikeness* (Egan y col., 2000; Ghose y col., 1998; Lipinski y col., 2001; Muegge y col., 2001; Veber y col., 2002)

Reglas	No.	Parámetros y Límites Permitidos
Lipinski (LPK)	L1	Peso molecular ≤ 500
	L2	Lipofilicidad ≤ 4.15
	L3	Aceptores de enlaces de hidrógeno ≤ 10
	L4	Donadores de enlaces de hidrógeno ≤ 5
Ghose (GHS)	G1	Peso molecular $\geq 160, \leq 480$
	G2	Lipofilicidad $\geq -0.4, \leq 5.6$
	G3	Refractividad molar $\geq 40, \leq 130$
	G4	Número total de átomos $\geq 20, \leq 70$
Veber (VBR)	V1	Enlaces rotables ≤ 10
	V2	Área de superficie polar topológica ≤ 140
Egan (EGN)	E1	Lipofilicidad ≤ 5.88
	E2	Área de superficie polar topológica ≤ 131.6
Muegge (MGE)	M1	Peso molecular $\geq 200, \leq 600$
	M2	Lipofilicidad $\geq -2, \leq 5$
	M3	Área de superficie polar topológica ≤ 150
	M4	Número de anillos ≤ 7
	M5	Número de carbonos > 4
	M6	Número de heteroátomos > 1
	M7	Enlaces rotables ≤ 15
	M8	Aceptores de enlaces de hidrógeno ≤ 10
	M9	Donadores de enlaces de hidrógeno ≤ 5

Tabla A11. Matriz de alertas de propiedades *DrugLikeness* de las moléculas evaluadas en SwissADME. Para leer la codificación, consulte la Tabla A10 (N/A = Ninguna alerta).

Molécula	LPK	GHS	VBR	EGN	MGE	PAINS	Brenk
Sterhirsutina H	L1, L3	G1, G2, G3, G4	V2	E1, E2	M1, M2, M3, M4, M8	N/A	Aceptor de Michael, > 2 ésteres
Sterhirsutina I	L1, L2	G1, G2, G3, G4	V2	E1, E2	M1, M2, M4	N/A	Aceptor de Michael, > 2 ésteres
MC-031	L1, L3	G1, G2, G3, G4	V2	E1, E2	M1, M2, M3, M4, M8	N/A	Alqueno aislado, > 2 ésteres
Albendazol	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Lifitegrast	L1	G1, G3	V2	E2	M1	N/A	N/A
Avatrombopag	L1	G1, G3, G4	V2	E2	M1, M3	N/A	N/A
Aspergilazina A	L1	G1, G3, G4	N/A	N/A	M4	N/A	N/A
Aspergicandidusina A	N/A	G2	N/A	E1	M2	N/A	N/A
Enhypirazinona A	N/A	N/A	N/A	N/A	M2	N/A	N/A
Vemurafenib	N/A	G1, G2	N/A	E1	N/A	N/A	N/A
Montelukast	L1, L2	G1, G2, G3, G4	V1	E1	M2	N/A	N/A
Imatinib	N/A	G1, G3	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Ceefourin-1	N/A	N/A	N/A	E2	N/A	N/A	Grupo tio-carbonilo