



Universidad Autónoma De Querétaro
Facultad de Química

Estudio computacional de las mutaciones no sinónimas
F368W y R375S sobre la conformación del transportador
MRP4 en células leucémicas y su efecto en la unión a
sustratos

Tesis

Que como parte de los requisitos para
obtener el Grado de

Maestra en Ciencias Químico Biológicas

Presenta

IBT. VALERIA JACQUELINE SOTO ONTIVEROS

Dirigido por:

Dra. Laura Cristina Berumen Segura

Querétaro, Qro. a febrero de 2025

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
Maestría en Ciencias Químico Biológicas

Estudio computacional de las mutaciones no sinónimas
F368W y R375S sobre la conformación del transportador
MRP4 en células leucémicas y su efecto en la unión a
sustratos

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de

Maestra en Ciencias Químico Biológicas

Presenta

IBT. Valeria Jacqueline Soto Ontiveros

Dirigida por:

Dra. Laura Cristina Berumen Segura

Dra. Laura Cristina Berumen Segura
Presidente

Dr. Edgardo Becerra Becerra
Secretario

Dr. Rubén Antonio Romo Mancillas
Vocal

Dra. Alicia Irasema Mendieta Trejo
Suplente

Dra. Guadalupe García Alcocer
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
Fecha de aprobación por el Consejo Universitario marzo 2024
México

DEDICATORIA

A Gohan, mi querido panzón; mi gato, quien me acompañó al inicio de este viaje de maestría y que, aunque no pudo ver su final, siempre estará presente en mi corazón.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT), por la beca de maestría (CVU: 1234703) otorgada, la cual me permitió dedicarme de tiempo completo a la realización de mis estudios de posgrado.

A la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro, por el apoyo recibido a través del programa “Química Somos Todos 2023”, en su modalidad Fondo para Proyectos Estudiantiles.

Al Dr. Giovanni Aguilera Durán, por compartir su conocimiento, por su paciencia y por la amistad brindada durante el desarrollo de este proyecto. Su guía y apoyo fueron fundamentales para el exitoso término de esta maestría. Muchas gracias.

Al Dr. Antonio Romo Mancillas, por brindarme la oportunidad de formar parte del Laboratorio de Diseño Asistido por Computadora y Síntesis de Fármacos, por su compromiso con mi formación y por ser un ejemplo inspirador tanto en el ámbito profesional como en el personal.

A mi directora de tesis, la Dra. Laura Cristina Berumen Segura, por acompañarme en este intrincado proceso de convertirme en Maestra. Su disposición constante para guiarme, su apoyo incondicional y su experiencia han sido fundamentales para alcanzar este logro.

Al Dr. Edgardo Becerra, por ser quien me acercó a este fascinante tema de investigación, por brindarme siempre observaciones constructivas y por su disposición para apoyar mi trabajo de investigación. Su experiencia y consejos han enriquecido este proceso.

A la Dra. Guadalupe García Alcocer, por confiar en mis habilidades como investigadora y por impulsarme a ingresar al posgrado. Su motivación constante y sus palabras de aliento fueron un pilar importante durante este proceso.

A la Dra. Alicia Irasema Mendieta, por su paciencia y apoyo tanto técnico en el laboratorio como académico durante la redacción de esta tesis. Su disposición para guiarme en los momentos clave fue esencial para que este proyecto se concretara exitosamente.

A Tite Grandini, mi “chico de servicio”, por su invaluable apoyo técnico, su valiosa amistad y el respaldo brindado a lo largo de este proyecto. Gracias por estar siempre dispuesto a ayudar y compartir este camino conmigo.

A L. Sofía Aponte Pineda, por haber sido una compañera incondicional durante este importante capítulo de mi vida. Gracias por tu apoyo, escucha y por inspirarme a ser una mejor persona. Te amo, chinitos.

A mis compañeros de maestría: Maricarmen, Hiram, Citlali y Laura, con quienes tuve el privilegio de construir una linda amistad. Gracias por el apoyo mutuo durante las clases y por las memorias inolvidables que compartimos a lo largo de este camino.

A mis compañeros de handball, quienes me enseñaron el valor del trabajo en equipo y me permitieron descubrir una etapa nueva a través del deporte. Gracias por su disposición para escucharme en momentos de estrés y por sus palabras de aliento. Atesoraré siempre su amistad y los campeonatos que logramos juntos, bien merecidos.

A mi mamá, mi gran apoyo en la vida. Te estoy profundamente agradecida por tu amor incondicional, por ser una roca para mí, por siempre creer en mí, por apoyarme en cada una de mis decisiones, por darme tus palabras de aliento y esos empujoncitos, a veces rudos, que me impulsaron a seguir adelante. Te amo y gracias por ser una madre maravillosa.

A todos los compañeros que he conocido a lo largo de mi desarrollo académico. Cada uno de ustedes me ayudó de diferentes formas, ya sea con su apoyo, amistad o enseñanzas, y siempre estuvieron allí cuando más lo necesité. Este logro también es reflejo de la red de personas increíbles que me rodearon y me impulsaron a dar lo mejor de mí. ¡Gracias a todos!

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE GENERAL.....	i
ÍNDICE DE TABLAS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	v
ABREVIATURAS Y SIGLAS.....	vii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Leucemia linfoblástica aguda.....	3
2.1.1. Leucemia linfoblástica aguda de células T.....	3
2.1.2. Tratamiento de primera línea	6
2.1.2.1. Fases del tratamiento	6
2.1.3. Tratamiento para pacientes recidivantes con LLA	7
2.2. Quimiorresistencia	9
2.2.1. Metotrexato	10
2.2.2. 6-Mercaptopurina	12
2.3. Transportadores ABC	13
2.3.1. Proteína 4 de resistencia a múltiples fármacos.....	15
2.3.2. Polimorfismos de un solo nucleótido en MRP4.....	17
2.3.3. Estudios mutacionales en MRP4	19
2.4. Química computacional	21
2.4.1. Modelado por homología.....	22
2.4.2. Acoplamiento molecular	24
2.4.3. Simulaciones de dinámica molecular	25
2.4.3.1. <i>Umbrella Sampling</i>	28
2.5. CRISPR-Cas.....	28
3. HIPÓTESIS	31
4. OBJETIVOS	32
4.1. Objetivo general.....	32
4.2. Objetivos específicos.....	32

5. METODOLOGÍA.....	33
5.1. Obtención de la secuencia de aminoácidos del transportador MRP4.....	33
5.2. Modelado por homología de MRP4 WT, F368W y R375S.....	33
5.3. Simulaciones de dinámica molecular.....	34
5.3.1. Generación de sistemas.....	34
5.3.2. Dinámicas de relajación	34
5.4. Acoplamiento molecular.....	35
5.5. <i>Umbrella Sampling</i>	35
5.6. Generación de imágenes y análisis gráfico	36
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	37
6.1. Modelos por homología y dinámicas de relajación	37
6.2. Acoplamiento molecular.....	41
6.3. Diferencias en el patrón de interacción de las estructuras de MRP4.....	44
6.4. Ensayos <i>Umbrella Sampling</i>	48
6.4.1. Dinámicas de relajación ligandos selectos.....	48
6.4.1.1. Complejos MRP4-cAMP	49
6.4.1.2. Complejos MRP4-cGMP	50
6.4.1.3. Complejos MRP4-FA	50
6.4.1.4. Complejos MRP4-6-MP	51
6.4.1.5. Complejos MRP4-MTX	54
6.4.2. Simulaciones de dinámica molecular tipo <i>Umbrella Sampling</i>	55
7. CONCLUSIONES.....	57
8. REFERENCIAS	58
9. ANEXOS.....	69
Anexo I. Tamaño sistemas para dinámicas moleculares <i>all-atom</i>	69
Anexo II. Diagramas de Ramachandran de los modelos de MRP4.....	73
Anexo III. <i>Docking score</i> expresados en kcal/mol de la conformación BC de los sustratos endógenos (a) y fármacos (b) en los modelos MRP4 WT, F368W y R375S.....	73

Anexo IV. Estructuras cAMP, cGMP y FA en complejo con MRP4 WT, F368W y R375S antes y después de la simulación AA-DM de 25 ns.....	74
Anexo V. Diagramas RMSD de los ligandos cAMP, cGMP, FA, MTX y MP en complejo con MRP4 WT y sus variantes durante la simulación AA-DM de 25 ns.	77
Anexo VI. Histogramas de <i>Umbrella Sampling</i> para los ligandos seleccionados.	78

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1. Aberraciones moleculares comunes en LLA-T.	5
2. Sustratos de MRP4.	17
3. Composición de la membrana lipídica de células Jurkat.	33
4. Ligandos a evaluar en las simulaciones de acoplamiento molecular.	35
5. Residuos relevantes en las interacciones ligando-MRP4.	36
6. Parámetros de calidad en los modelos por homología.	37
7. <i>Docking score</i> expresados en kcal/mol de la conformación LE de los sustratos endógenos en los modelos MRP4 WT, F368W y R375S.	42
8. <i>Docking score</i> expresados en kcal/mol de la conformación LE de los sustratos fármacos en los modelos MRP4 WT, F368W y R375S.	43
9. Aminoácidos clave para las interacciones ligando-MRP4.	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Mecanismo de acción del metotrexato.....	11
2. Mecanismo de acción y activación de la 6-mercaptopurina.....	13
3. Clasificación de los transportadores ABC y sus dominios conservados.	14
4. Modelo estructural de MRP4.....	16
5. Efecto de polimorfismos de un solo nucleótido en la función del transportador MRP4.....	18
6. Pasos para el modelado por homología.	23
7. Proceso de edición genética dirigida con CRISPR-Cas9.....	30
8. Diagrama RMSD de los modelos de MRP4: WT, F368W y R375S a lo largo de 200 ns AA-DM.....	38
9. Estructura 3D de los modelos de MRP4 construidos por modelado por homología (MH) y sus conformaciones representativas (C1) obtenido de las AA-DM	39
10. Diagrama RMSD de los dominios transmembrana de los modelos de MRP4: WT, F368W y R375S a lo largo de 200 ns AA-DM.	40
11. Diagramas RMSD de los dominios transmembrana 1 y 2 de MRP4 WT y sus variantes lo largo de 200 ns de AA-DM.	40
12. Diagrama RMSD de los sitios de unión a nucleótidos 1 y 2 MRP4 WT y sus variantes lo largo de 200 ns de AA-DM.	41
13. Acoplamiento molecular de PEG2 en MRP4 WT, F368W y R375S.....	46
14. Acoplamiento molecular de LV en MRP4 WT, F368W y R375S.....	47
15. Diagramas de interacción cAMP con MRP4 WT, F368W y R375S.	49
16. Diagramas de interacción cGMP con MRP4 WT, F368W y R375S.....	50
17. Diagramas de interacción FA con MRP4 WT, F368W y R375S.	51

18. Estructuras 6-MP en complejo con MRP4 WT, F368W y R375S: antes (a) y después de la simulación AA-DM de 25 ns (b).	52
19. Diagramas de interacción 6-MP con MRP4 WT, F368W y R375S.	53
20. Estructuras MTX en complejo con MRP4 WT, F368W y R375S: antes (a) y después de la simulación AA-DM de 25 ns (b).	53
21. Diagramas de interacción MTX con MRP4 WT, F368W y R375S.	54
22. Energía libre de Gibbs y potenciales <i>Umbrella</i> de los ligandos seleccionados.	55

ABREVIATURAS Y SIGLAS

3D: tridimensional	
5,10-MTHF: metilentetrahidrofolato	N ₅ ,N ₁₀ -
6-MP, MP: 6-mercaptopurina	
AA-DM: DM <i>all-atom</i>	
ABC: casetes de unión a ATP, por sus siglas en inglés	
ABCC: subfamilia C de casetes de unión a ATP, por sus siglas en inglés	
ADN: ácido desoxirribonucleico	
ADV: adefovir	
AINE: antiinflamatorios no esteroideos	
AM: acoplamiento molecular	
AMP: monofosfato de adenosina	
ARN: ácido ribonucleico	
ATP: trifosfato de adenosina	
AZA: azatioprina	
AZT: azidotimidina	
BC: <i>best cluster</i>	
BCRP/ABCG2: proteína de resistencia al cáncer de mama	
BFM: Berlín-Frankfurt-Münster	
C1: clúster 1	
CA: ácido cólico	
cAMP: monofosfato cíclico de adenosina	
Cas: proteínas asociadas a CRISPR	
CFZ: cefazolina	
CG-DM: DM <i>coarse-grained</i>	
cGMP: monofosfato cíclico de guanosina	
crARN: ARN específico para CRISPR	
crio-EM: microscopía electrónica criogénica	
CRISPR: repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas	
CTX: cefotaxima	
DHEA: prasterona	
DHF: dihydrofolato	
DHFR: dihidrofolato reductasa	
DM: dinámica molecular	
DMD: dinámica molecular dirigida	
DS: <i>docking score</i>	
DSB: rotura de doble cadena, por sus siglas en inglés	
dTMP: timidilato	
dUMP: desoxiuridilato	
DXP: dexametasona	
E17bG: estradiol 17 beta glucurónido	
EMR: enfermedad mínima residual	
F368W: Phe368Trp	
FA: ácido fólico	
FDA: Administración de alimentos y medicamentos de EUA, por sus siglas en inglés	
FPGH: folilpoliglutamato hidrolasa	
FPGS: folilpoliglutamato sintetasa	
FR: residuos favorecidos de Ramachandran	
FS: furosemida	
GA: ácido glicólico	
gARN: ARN guía	
GMP: monofosfato de guanosina	
GMPS: guanina monofosfato sintasa	
HCTZ: hidroclorotiazida	
HDR: reparación dirigida por homología, por sus siglas en inglés	
HGPRT: hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa	
ICD: dominio intra-citoplasmático	

IDH2: isocitrato deshidrogenasa 2
IMP: monofosfato de inosina
IMPDH: inosina 5'-monofosfato deshidrogenasa
Indel: inserciones o deleciones
L₀/L₁: puentes
LCK: proteína tirosina cinasa específica de linfocitos, por sus siglas en inglés
LE: *lowest energy*
LID: diagrama de interacción
LLA: leucemia linfoblástica aguda
LLA-T: leucemia linfoblástica aguda de células T
LMA: leucemia mieloblástica aguda
LMA: leucemia mieloide aguda
LTB4: leucotrieno B4
LV: leucovorina
mARN: ARN mensajero
MDR: resistencia a múltiples fármacos, por sus siglas en inglés
MetaD: metadinámica
MH: modelos por homología
MR: modelos relajados
MRP: proteína de resistencia a múltiples fármacos, por sus siglas en inglés
MTX: metotrexato
N: número de partículas
NBD: dominio de unión a nucleótidos, por sus siglas en inglés
NHEJ: unión de extremos no homólogos, por sus siglas en inglés
nsSNP: SNPs no sinónimos
OM: olmesartán
P: presión
pb: pares de bases
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
PEG1: prostaglandina E1
PEG2: prostaglandina E2
P-gp/ABCB1: glicoproteína P
PMEA: adefovir
PRPP: pirofosfato de fosforribosilo
R375S: Arg375Ser
RC: remisión completa
RFC: transportador de folato reducido, por sus siglas en inglés
r_i: posiciones
RMN: resonancia magnética nuclear
RMSD: desviación cuadrática media de la raíz, por sus siglas en inglés
RsC: recuperación semicompleta
SG: supervivencia global
SH2D2A: proteína adaptadora específica de célula
SNC: sistema nervioso central
SNPs: polimorfismos de un solo nucleótido, por sus siglas en inglés
T: temperatura
TA: ácido úrico
TALEN: nucleasas efectoras similares a activadores de la transcripción, por sus siglas en inglés
TCMH: trasplante alogénico de células hematopoyéticas
TCR: receptor de células T, por sus siglas en inglés
TdGTP: trifosfato de tioguanina
TFV: tenofovir
TGMP: monofosfato de tioguanina
THF: tetrahidrofolato
TIMP: monofosfato de tioinosina
TMD: dominio transmembrana, por sus siglas en inglés
TMH: hélice transmembrana, por sus siglas en inglés
TOP: topotecán

trARN: ARN transactivador
TS: timidilato sintasa
TXMP: monofosfato de tioxantosina
UA: ácido taurocólico
US: *Umbrella Sampling*
V: volumen
VC: variables colectivas
vi: velocidades
VIH-1: virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1
WT: tipo salvaje
XMP: monofosfato de xantosina
ZFN: nucleasas de dedos de zinc, por sus siglas inglés

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DE ESTUDIANTE

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras. Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.

A handwritten signature in black ink, consisting of a stylized 'V' followed by 'al' and 'Soto' written in a cursive script. The signature is enclosed within a hand-drawn oval border.

IBT. Valeria Jacqueline Soto Ontiveros

RESUMEN

La proteína de resistencia a múltiples fármacos (MRP4) es un transportador de membrana clave en la expulsión de una amplia gama de sustratos, incluyendo varios agentes quimioterapéuticos. Alteraciones en MRP4 están asociadas con diversas patologías, particularmente en el cáncer, y su sobreexpresión se vincula con un pronóstico desfavorable. Mutaciones no sinónimas en MRP4 producen patrones de transporte alterado, contribuyendo a la resistencia a fármacos como el metotrexato. Esto resalta la importancia de investigar los mecanismos de reconocimiento de sustratos y los efectos de las modificaciones estructurales de MRP4 sobre su capacidad de transporte. El objetivo de este proyecto fue comparar los efectos de dos variantes mutantes de MRP4 (F368W y R375S) con el modelo de tipo salvaje (WT) para evaluar los efectos de las mutaciones en la estructura de la proteína y su afinidad por ligandos, tanto endógenos como farmacológicos. Se utilizaron herramientas de química computacional, incluyendo modelado por homología, simulaciones de dinámica molecular y acoplamiento molecular. Los resultados *in silico* revelaron diferencias conformacionales significativas entre las variantes F368W y R375S en comparación con el modelo WT. El modelo F368W mostró una estructura similar a WT, pero con movimientos reducidos en los dominios transmembranales 6 y 12. En cambio, R375S adoptó una conformación más comprimida con pasos transmembranales 6 y 12 estáticos. A pesar de las diferencias estructurales, los puntajes de acoplamiento molecular para los sustratos endógenos no mostraron cambios significativos, excepto para los sustratos PEG2 y LTB4, este último solo en F368W. Sin embargo, F368W sí mostró diferencias significativas en más de la mitad de los sustratos fármacos, mientras que R375S solo presentó cambios en la leucovorina, hidroclorotiazida y furosemida. Estos resultados indican que la mutante F368W altera el transporte de sustratos farmacológicos, subrayando la relevancia mecanística de este aminoácido en el transporte diferencial de fármacos. Este hallazgo destaca el potencial de la fenilalanina 368 en el desarrollo de inhibidores específicos para MRP4 con aplicaciones terapéuticas, especialmente en el contexto de la leucemia.

Palabras clave: MRP4; resistencia a fármacos; mutaciones no sinónimas; química computacional; cáncer.

ABSTRACT

Multidrug resistance protein (MRP4) is a key membrane transporter involved in the efflux of a wide range of substrates, including several chemotherapeutic agents. Alterations in MRP4 are associated with various pathologies, particularly cancer, and its overexpression is associated with an unfavorable prognosis. Non-synonymous mutations in MRP4 result in altered transport patterns and contribute to resistance to drugs such as methotrexate. This highlights the importance of investigating the mechanisms of substrate recognition and the effects of structural changes in MRP4 on its transport capacity. The aim of this project was to compare the effects of two mutant variants of MRP4 (F368W and R375S) with the wild type (WT) model to assess the effects of mutations on the protein structure and its affinity for both endogenous and pharmacological ligands. Computational chemistry tools were used, including homology modelling, molecular dynamics simulations and molecular docking. *In silico* results revealed significant conformational differences between the F368W and R375S variants compared to the WT model. The F368W model showed a similar structure to WT, but with reduced motions in transmembrane domains 6 and 12. In contrast, R375S adopted a more compressed conformation with static transmembrane segments 6 and 12. Despite the structural differences, the molecular docking scores for the endogenous substrates showed no significant changes, except for the substrates PEG2 and LTB4, the latter only for F368W. However, F368W showed significant differences for more than half of the drug substrates, while R375S showed changes only for leucovorin, hydrochlorothiazide and furosemide. These results indicate that the F368W mutant alters the transport of drug substrates, underscoring the mechanistic relevance of this amino acid in differential drug transport. This finding highlights the potential of phenylalanine 368 in the development of specific inhibitors of MRP4 with therapeutic applications, particularly in the context of leukemia.

Keywords: MRP4; drug resistance; nonsynonymous mutations; computational chemistry; cancer.

1. INTRODUCCIÓN

La leucemia linfoblástica aguda de células T (LLA-T) es un cáncer hematológico agresivo caracterizado por la proliferación descontrolada de linfocitos T inmaduros debido a alteraciones genómicas en oncogenes y genes supresores de tumores. Representa aproximadamente el 25 % de los casos de LLA en adultos jóvenes y el 15 % en niños, con afectaciones frecuentes en áreas extramedulares y el sistema nervioso central.

El tratamiento actual se basa en una quimioterapia combinada de alta intensidad que, aunque eficaz en niños, adolescentes y adultos jóvenes, presenta limitaciones significativas en adultos y adultos mayores, donde la toxicidad y la mortalidad asociadas son elevadas. Además, un porcentaje considerable de pacientes experimenta recaídas, principalmente debido a la quimiorresistencia adquirida por las células leucémicas.

Entre los mecanismos que explican esta quimiorresistencia se encuentra la sobreexpresión de transportadores de la familia ABC, entre los cuales destaca la proteína 4 de resistencia a múltiples fármacos (MRP4), codificada por el gen ABCC4. MRP4, una proteína ampliamente distribuida en tejidos humanos, transporta activamente moléculas endógenas y xenobióticos. Entre las moléculas endógenas se incluyen eicosanoides, ácidos biliares, esteroides, ácido fólico, y los segundos mensajeros cAMP y cGMP. En cuanto a los xenobióticos, se encuentran anticancerígenos como la 6-mercaptopurina y el metotrexato (ampliamente utilizados durante el tratamiento), antivirales basados en nucleósidos, antibióticos y fármacos cardiovasculares. Las anomalías en la función de MRP4 se han asociado a diversos trastornos patológicos, particularmente en cánceres como el de próstata, neuroblastoma, cáncer de pulmón de células no pequeñas y LLA-T.

Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en el gen MRP4 pueden afectar significativamente la función del transportador, especialmente aquellos no sinónimos (nsSNPs) que alteran los aminoácidos codificados. Estudios previos han destacado el impacto diferencial de los nsSNPs en la expresión y función de MRP4 según el tipo de sustrato. En particular, las mutantes no sinónimas Phe368Trp (F368W) y Arg375Ser (R375S) disminuyen el transporte de metotrexato. Sin embargo, no está claro si estas mutaciones afectan el transporte de otros fármacos ni cómo podrían alterar el funcionamiento endógeno del transportador.

Dado que el tratamiento actual para la LLA-T conlleva alta toxicidad y mortalidad, especialmente en pacientes mayores, además de un elevado porcentaje de recaídas, se requiere desarrollar estrategias terapéuticas más seguras y eficaces. La quimiorresistencia asociada a MRP4 representa una oportunidad para diseñar inhibidores específicos que reduzcan su actividad. En este contexto, se planteó evaluar *in silico* las mutantes no sinónimas F368W y R375S de MRP4, con el objetivo de disminuir su afinidad por quimioterapéuticos e inhibir su transporte extracelular, minimizando el impacto en el transporte de sustratos endógenos.

Esta aproximación podría mejorar la efectividad de la quimioterapia al permitir el uso de dosis más bajas, reduciendo la toxicidad asociada y mejorando la calidad de vida de los pacientes con LLA-T. Además, los resultados de este estudio contribuirán al entendimiento de los mecanismos moleculares de la quimiorresistencia en LLA-T y establecerían las bases para desarrollar terapias más específicas y efectivas basadas en la inhibición de MRP4.

2. ANTECEDENTES

2.1. Leucemia linfoblástica aguda

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es una enfermedad hematológica heterogénea que se caracteriza por la proliferación de células linfoides inmaduras en la médula ósea, la sangre periférica y otros órganos. Aproximadamente el 70 % de los casos de LLA ocurren en niños, adolescentes y adultos jóvenes, además es la forma más común de leucemia infantil. En contraste, la LLA representa alrededor del 20 % de todas las leucemias en adultos (Brown et al., 2021; Shiraz et al., 2021).

A nivel mundial, la tasa de incidencia ajustada por edad para LLA es de 0.85 casos por cada 100,000 individuos por año. Sin embargo, en México, esta tasa es más alta, alcanzando los 6 casos por cada 100,000 individuos (Colunga-Pedraza et al., 2018; Dong et al., 2020).

Según datos del programa de vigilancia, epidemiología y resultados finales, las tasas de supervivencia global (SG) a 5 años son del 89 % y 61 % en adolescentes y adultos jóvenes, respectivamente, mientras que en adultos la tasa desciende al 40 %, y en adultos mayores se reduce aún más al 20 % (Brown et al., 2021; Shiraz et al., 2021).

2.1.1. Leucemia linfoblástica aguda de células T

La leucemia linfoblástica aguda de células T (LLA-T) resulta de la acumulación de lesiones genómicas en células progenitoras de linfocitos T, y se caracteriza por la proliferación descontrolada de linfocitos T inmaduros (leucocitosis). Además, afecta áreas extramedulares, incluyendo grandes masas en el mediastino o el timo, así como el sistema nervioso central (SNC). En adultos jóvenes, la LLA-T representa aproximadamente el 25 % de los casos de LLA, mientras que en niños corresponde al 15 % (Patel et al., 2020; Shiraz et al., 2021).

La LLA-T es una enfermedad compleja que presenta alteraciones genéticas en oncogenes y genes supresores de tumores. Las aberraciones genómicas más comunes incluyen translocaciones cromosómicas, reordenamientos intracromosómicos, mutaciones activadoras e inactivadoras, deleciones, duplicaciones, y anomalías epigenéticas (descritas en la Tabla 1). Esta inestabilidad genómica, junto con las mutaciones, puede promover la progresión del cáncer al afectar genes esenciales para el crecimiento, la supervivencia y la diferenciación celular durante el desarrollo normal de las células (Patel et al., 2020; Tan et al., 2017).

La deleción de los genes CDKN2A y CDK2NB, que codifican las proteínas inhibidoras de la cinasa dependiente de ciclina p14(ARF), p15(INK4A) y p16(INK4A), conduce a una desregulación del ciclo celular. Además, se han reportado anormalidades citogenéticas comunes, como translocaciones del receptor de células T (TCR, por sus siglas en inglés) y del gen MLL, así como los genes de fusión SIL-TAL1, CALM-AF10 y NUP214-ABL1, junto con la deleción del brazo largo del cromosoma 6 (del(6q)) (Patel et al., 2020).

La mutación activadora de NOTCH1 es una de las más frecuentes en la LLA-T. NOTCH1 actúa es un factor de transcripción que se activa mediante ligando, influyendo directamente en la expresión génica en el núcleo. Su correcta señalización es crucial para dirigir las células madre hematopoyéticas hacia un destino de células T. Sin embargo, su activación constitutiva conduce a un excesivo desarrollo de células T, con un fallo en la producción de linfocitos B. Otras aberraciones moleculares comúnmente encontradas incluyen mutaciones activadoras en las vías de señalización JAK/STAT, PI3K-AKT y RAS-MAPK (Patel et al., 2020; B. Zhou et al., 2022).

Tabla 1. Aberraciones moleculares comunes en LLA-T.

Gen	Tipo de aberración genética	Frecuencia (%)
<i>Vía de señalización NOTCH1</i>		
NOTCH1	Mutaciones activadoras	57
FBXWY	Mutaciones inactivadoras	14
<i>Ciclo celular</i>		
CDKN2A	Delección 9p21	55
CDKN2B	Delección 9p21	46
<i>Factores de transcripción</i>		
TAL1	Reordenamientos cromosómicos / expresión / mutaciones <i>super-enhancer</i> /deleciones	34
LMO2	Reordenamientos cromosómicos / expresión / deleciones	21
TLX1	Reordenamientos cromosómicos / expresión / deleciones	20
MYB	Reordenamientos cromosómicos / duplicaciones	17
ETV6	Mutaciones inactivadoras / deleciones	14
WT1	Mutaciones inactivadoras / deleciones	11
RUNX1	Mutaciones inactivadoras / deleciones	10
<i>Señalización</i>		
DNM2	Mutaciones inactivadoras	13
JAK3	Mutaciones activadoras	12
IL7R	Mutaciones activadoras	12
<i>Factores epigenéticos</i>		
PHF6	Mutaciones inactivadoras / deleciones	30
DNMT3A	Mutaciones inactivadoras / deleciones	14
EZH2	Mutaciones inactivadoras / deleciones	12

Modificado de Patel et al., 2020.

2.1.2. Tratamiento de primera línea

El tratamiento de la LLA representa uno de los enfoques más complejos e intensivos en la terapia oncológica. Los regímenes más comunes son modificaciones o variaciones de los protocolos de quimioterapia multi-agente desarrollados originalmente por el grupo Berlín-Frankfurt-Münster (BFM) para pacientes pediátricos, y el régimen hiper-CVAD, que fue desarrollado en el Centro Oncológico MD Anderson. En general, las fases del tratamiento pueden agruparse en inducción, consolidación y mantenimiento. Todos los regímenes de tratamiento para la LLA incluyen profilaxis y/o tratamiento del SNC (Malard & Mohty, 2020; Patel et al., 2020).

2.1.2.1. Fases del tratamiento

Inducción. La fase de inducción, que generalmente dura un mes, tiene como objetivo alcanzar la remisión completa (RC), definida por la ausencia de células leucémicas en biopsias de médula ósea y recuentos sanguíneos normales. Esta etapa se enfoca en reducir la carga tumoral mediante la eliminación del mayor número posible de células leucémicas. Los regímenes de inducción comúnmente incluyen vincristina, antraciclinas (daunorrubicina o doxorubicina) y corticosteroides (prednisona o dexametasona), con o sin L-asparaginasa (Hoelzer et al., 2016; Malard & Mohty, 2020; National Comprehensive Cancer Network, 2023).

Consolidación. Una vez lograda la remisión, la fase de consolidación busca erradicar las células leucémicas remanentes, eliminando cualquier posible enfermedad residual. Los esquemas de consolidación varían según los estudios y las poblaciones de pacientes, pero suelen incluir combinaciones de fármacos similares a los utilizados en la fase de inducción. Entre los medicamentos más frecuentemente utilizados están el metotrexato, citarabina, 6-mercaptopurina, ciclofosfamida, vincristina, corticosteroides y L-asparaginasa. Esta fase también puede denominarse terapia de intensificación (Hoelzer et al., 2016; Malard & Mohty, 2020; National Comprehensive Cancer Network, 2023).

Mantenimiento. Esta fase dura de dos a tres años tras alcanzar la RC y su propósito es prevenir la recaída de la enfermedad después de la consolidación. El tratamiento estándar incluye la administración semanal de metotrexato y la toma diaria de 6-mercaptopurina, con la adición periódica de vincristina y corticosteroides (Hoelzer et al., 2016; Malard & Mohty, 2020; National Comprehensive Cancer Network, 2023).

2.1.3. Tratamiento para pacientes recidivantes con LLA

Después del tratamiento de primera línea, aproximadamente el 20 % de los niños y el 40 % de los adultos experimentarán una recaída. Los pacientes con recaídas en la LLA tienen opciones terapéuticas limitadas y un pronóstico desfavorable. Las respuestas a los tratamientos suelen ser de corta duración y presentan una alta mortalidad. En varios estudios a gran escala que utilizan quimioterapia convencional en adultos con enfermedad recidivante, se ha reportado una supervivencia global (SG) de entre 4.5 y 6 meses, y una tasa de SG a 5 años que oscila entre el 3 % y el 10 % (National Comprehensive Cancer Network, 2023).

Uno de los factores más importantes asociados con peores resultados de supervivencia en pacientes recidivantes es la duración de la respuesta al tratamiento inicial. Aquellos que recaen después de más de dos años del tratamiento inicial, muestran tasas de SG a 5 años significativamente más altas en comparación con aquellos cuya enfermedad recurre dentro de los 1-2 años, o menos de 1 año (~ 35 % frente a ~ 15 % y menos del 10 %) (National Comprehensive Cancer Network, 2023).

El objetivo del tratamiento en la recaída es inducir una remisión completa (RC), idealmente con enfermedad mínima residual (EMR¹) indetectable, para proceder de forma rápida y segura a un trasplante alogénico de células hematopoyéticas (TCMH) (Follini et al., 2019; Malard & Mohty, 2020; Patel et al., 2020).

¹ EMR: es el indicador pronóstico más importante en la LLA-T. La ERM se mide por citometría de flujo multicolor o PCR (reacción en cadena de la polimerasa) de reordenamientos clonales del gen del TCR con una sensibilidad de 10⁻⁴ para ambas metodologías (Shiraz et al., 2021).

Los tratamientos aprobados por la FDA (administración de alimentos y medicamentos de EUA, por sus siglas en inglés) para el tratamiento de la LLA-T recidivantes/refractaria incluyen la nelarabina y la vincristina liposomal (National Comprehensive Cancer Network, 2023).

La nelarabina, un análogo de nucleósido, está aprobada para pacientes con LLA-T que no han respondido o han recaído tras al menos dos regímenes de quimioterapia. Varios estudios han demostrado su eficacia con tasas de RC del 29 % al 36 %, con tasas de SG a 1 año del 24 % al 28 % y de solo el 12 % a tres años. Sin embargo, su uso está asociado con riesgos significativos de neurotoxicidad grave (Malard & Mohty, 2020; McMahon & Luger, 2019; National Comprehensive Cancer Network, 2023).

La vincristina liposomal es una formulación de nanopartículas encapsuladas en liposomas de esfingomielina y colesterol, indicada para pacientes que han recaído dos o más veces o cuya enfermedad ha progresado después de al menos dos líneas de tratamiento. En el ensayo que respalda su aprobación, se observó una tasa de RC del 11 % y de recuperación semicompleta (RsC) en un 9 %. La mediana de duración de la RC fue de 5.75 meses, y la SG media para todos los pacientes fue de 5 meses. Entre los 10 pacientes con LLA-T incluidos en el ensayo, 2 (20 %) alcanzaron RC o RsC. Las toxicidades más frecuentes asociadas al tratamiento fueron neuropatía (23 %), neutropenia (15 %) y trombocitopenia (6 %) (McMahon & Luger, 2019; National Comprehensive Cancer Network, 2023).

El régimen terapéutico actual, que combina enfoques simultáneos y secuenciales, promueve la selección y supervivencia de células leucémicas quimiorresistentes, siendo este uno de los factores que impulsan la recaída y el bajo pronóstico de supervivencia (Follini et al., 2019; Mansoori et al., 2017; Oshima et al., 2020).

2.2. Quimiorresistencia

La quimiorresistencia es un fenómeno en el que las células cancerosas desarrollan tolerancia a los tratamientos farmacológicos. Este proceso está impulsado por diversos mecanismos, que pueden afectar tanto al fármaco como a su diana terapéutica (Mansoori et al., 2017; X. Wang et al., 2019; Ward et al., 2021).

Los mecanismos más comunes de resistencia en pacientes con cáncer incluyen:

- Aumento del eflujo de fármacos: Se produce a través del aumento en la expresión de proteínas de la familia de transportadores de casetes de unión ATP (ABC, por sus siglas en inglés) como las MDR y las MRP, incrementando la expulsión de los fármacos fuera de las células cancerosas, lo que reduce la concentración intracelular y, por ende, la efectividad del tratamiento.
- Disminución en la absorción de fármacos: Las células cancerosas pueden reducir la absorción de fármacos mediante la reducción en el número de transportadores o la afinidad por estos.
- Inactivación de los fármacos: La interacción entre fármacos y distintos tipos de proteínas (*in vivo*) puede alterar las características moleculares de los fármacos. Las células cancerosas se hacen resistentes reduciendo la actividad de los fármacos a través de diversos mecanismos de acción.
- Alteraciones en las vías de señalización: Promovidas por alteraciones genéticas, estas permiten a las células cancerosas desarrollar resistencia al tratamiento al reactivar la vía de señalización atacada o activar una vía alternativa que elude la inhibición de la diana.
- Defectos apoptóticos: Están asociados a varios mecanismos moleculares, como la sobreexpresión de proteínas anti-apoptóticas (por ejemplo, BCL-2) y la regulación a la baja o mutación de proteínas pro-apoptóticas (como BAX), que las células cancerosas utilizan para suprimir la apoptosis, permitiendo su supervivencia.

- Alteración de la diana del fármaco: Existen diversas formas en que una diana farmacológica puede desarrollar resistencia a un fármaco, siendo las mutaciones uno de los mecanismos más comunes. Las mutaciones genéticas pueden alterar tanto las características como el comportamiento de una proteína, modificando su conformación o afinidad por los sustratos. Muchas de estas mutaciones son activadoras y pueden mantener a la proteína en un estado permanentemente activado en comparación con la proteína de tipo salvaje (WT).
- Mejora de la reparación del ADN: Las células cancerosas pueden incrementar la expresión de genes involucrados en la reparación del ADN, en respuesta al daño por quimioterapéuticos, disminuyendo la eficacia de los fármacos (Mansoori et al., 2017; X. Wang et al., 2019; Ward et al., 2021).

La quimiorresistencia en la LLA-T implica una serie de mecanismos que dificultan el éxito de la quimioterapia, incluyendo la resistencia a fármacos como el metotrexato y la mercaptopurina, comúnmente utilizados en la terapia de mantenimiento. A continuación, se analizan los mecanismos de acción y los factores de quimiorresistencia conocidos para ambos fármacos, que son esenciales en el tratamiento de la LLA-T.

2.2.1. Metotrexato

El metotrexato (MTX), un antimetabolito del folato, actúa como un inhibidor de la síntesis *de novo* de purinas, lo que interrumpe la replicación del ADN y conduce a la muerte celular. El MTX ingresa a las células a través de transportadores de folatos reducidos (RFC, por sus siglas en inglés) y, una vez dentro, es poliglutamilado por la enzima folilpoliglutamato sintetasa (FPGS), lo que garantiza su retención intracelular eficiente (Oshima et al., 2020; Wojtuszkiewicz et al., 2015).

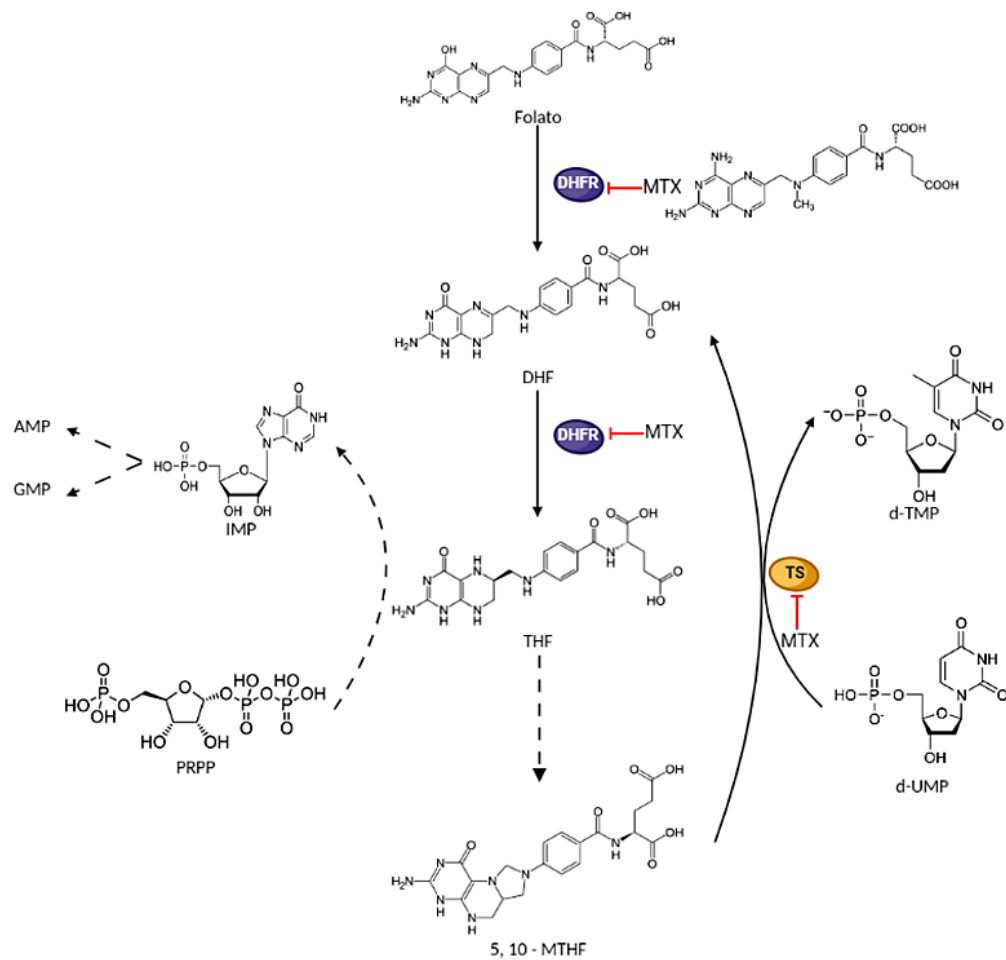


Figura 1. Mecanismo de acción del metotrexato. 5,10-MTHF: N₅,N₁₀-metilentetrahidrofolato; AMP: monofosfato de adenosina; DHF: dihidrofolato; DHFR: dihidrofolato reductasa; dTMP: timidilato; dUMP: desoxiuridilato; GMP: monofosfato de guanósina; IMP: monofosfato de inosina; PRPP: pirofosfato de fosforribosilo; THF: tetrahidrofolato; TS: timidilato sintasa. Modificado de J. Flórez et al., 2014.

El MTX inhibe dos enzimas clave involucradas en la síntesis de ADN: la dihidrofolato reductasa (DHFR) y la timidilato sintasa (TS). La DHFR es inhibida cuando el MTX se une al sitio catalítico, bloqueando la conversión de dihidrofolato (DHF) en tetrahidrofolato (THF), una coenzima esencial para la síntesis de purinas. Asimismo, el MTX inhibe a la TS, al unirse a su sitio de unión a coenzima, interrumpiendo la conversión del desoxiuridilato (dUMP) en timidilato (dTMP), reduciendo además la biodisponibilidad del THF (Figura 1) (Oshima et al., 2020; Wojtuszkiewicz et al., 2015).

Además del efecto citotóxico intrínseco, el MTX juega un papel en el metabolismo de la 6-mercaptopurina al promover la conversión de esta en su metabolito activo, la tioinosina monofosfato (Oshima et al., 2020; Wojtuszkiewicz et al., 2015).

Los mecanismos de quimiorresistencia al MTX incluyen: 1) la regulación a la baja o mutaciones inactivadoras del gen RFC1/SLC19A1, que codifica el transportador esencial para la absorción del MTX; 2) la sobreexpresión de las enzimas DHFR y TS junto con mutaciones que reducen su afinidad por los antifolatos; 3) mutaciones inactivadoras en la enzima FPGS, que disminuyen la retención intracelular del MTX; y 4) la acción de la folilpoliglutamato hidrolasa (FPGH), que reduce la poliglutamilación, incrementando el eflujo del MTX a través de los transportadores ABC (Oshima et al., 2020; Wojtuszkiewicz et al., 2015).

2.2.2. 6-Mercaptopurina

La 6-mercaptopurina (6-MP), un antimetabolito de tiopurina, actúa interfiriendo en la síntesis de ácidos nucleicos al inhibir el metabolismo de las purinas. La 6-MP ingresa a las células a través del transportador de solutos SLC43A3. Una vez dentro, es convertida en monofosfato de tioinosina (TIMP) por la enzima hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa (HGPRT), compitiendo con la hipoxantina y la guanina por esta enzima. Esto reduce la producción de monofosfato de inosina (IMP). El TIMP inhibe la transformación de IMP en monofosfato de xantosina (XMP) y monofosfato de adenosina (AMP), bloqueando la síntesis de bases púricas y, en consecuencia, el ensamblaje del ADN. Este proceso limita la capacidad de las células para dividirse (Figura 2) (Follini et al., 2019).

La quimiorresistencia a 6-MP está asociada a mutaciones activadoras en la nucleotidasa citosólica NT5C2, que incrementan la actividad de esta enzima. Este aumento conduce a la desfosforilación e inactivación de los metabolitos generados por la enzima HGPRT (TGMP y TIMP). Además, NT5C2 regula los niveles de nucleótidos intracelulares al exportar el exceso de nucleótidos de purina fuera de la célula, lo que contribuye a la resistencia a la 6-MP (Follini et al., 2019; Oshima et al., 2020).

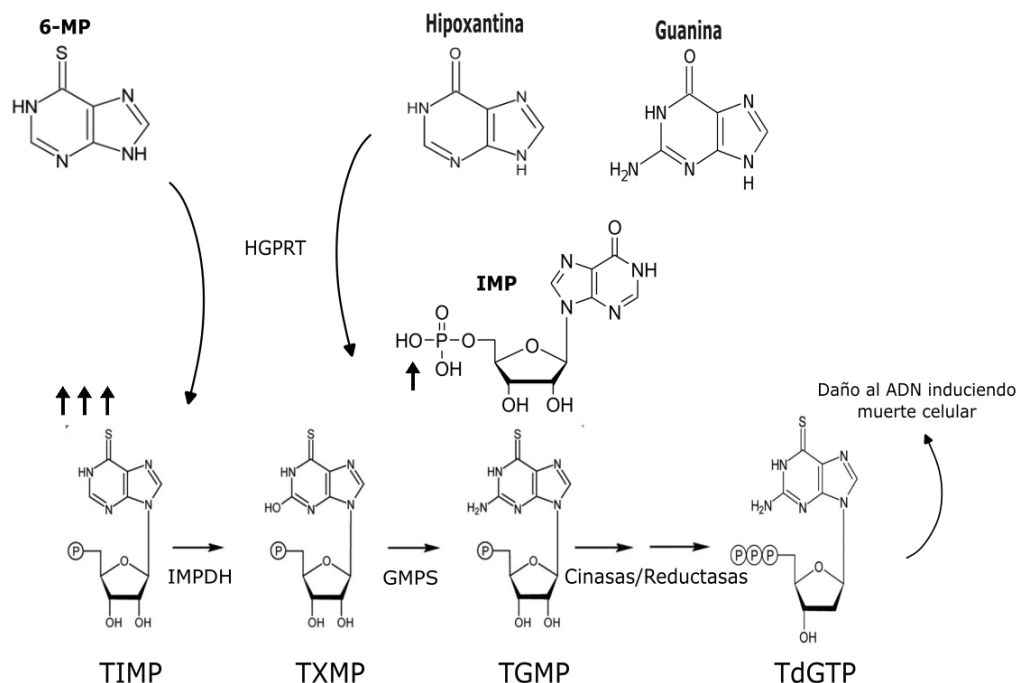


Figura 2. Mecanismo de acción y activación de la 6-mercaptopurina. ↑↑↑: concentración más alta de monofosfato de tiomosina (TIMP); ↑: concentración más baja de monofosfato de inosina (IMP); HGPRT: hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa; TGMP: monofosfato de tioguanina; TXMP: monofosfato de tioantanosina; TdGTP: trifosfato de tioguanina; IMPDH: inosina 5'-monofosfato deshidrogenasa; GMPS: guanina monofosfato sintasa. Modificado de Tzoneva et al., 2018.

2.3. Transportadores ABC

Uno de los mecanismos importantes de quimiorresistencia en la LLA-T, así como en otros tipos de cáncer, es la resistencia a múltiples fármacos (MDR, por sus siglas en inglés). Este fenómeno ocurre cuando las células cancerosas expuestas a un fármaco antineoplásico desarrollan resistencia a varios fármacos anticancerígenos sin relación estructural ni funcional entre sí (Liu, 2019; Pérez De Marcos et al., 2021).

Un componente central de la MDR son los transportadores de la familia ABC, los cuales expulsan activamente agentes quimioterapéuticos de las células, reduciendo su concentración intracelular y, por ende, su efectividad. Se ha detectado la sobreexpresión de estos transportadores en diversos tipos de cáncer resistentes a fármacos (Liu, 2019; Pérez De Marcos et al., 2021).

La superfamilia ABC es una de las más grandes en el ser humano y está compuesta por transportadores transmembrana que movilizan tanto sustratos endógenos como exógenos a través de las membranas celulares en órganos como el hígado, el intestino, los riñones y el cerebro. Además de su papel en mantener la homeostasis, estos transportadores también regulan la absorción, distribución y eliminación de fármacos, afectando así la respuesta del organismo a estos tratamientos (Liu, 2019; Pérez De Marcos et al., 2021).

Hasta la fecha, se han identificado 49 transportadores ABC en humanos, clasificados en 7 subfamilias (ABCA a ABCG) según su estructura génica, secuencia de aminoácidos, organización de sus dominios y análisis filogenético (Figura 3) (Liu, 2019; Pérez De Marcos et al., 2021).

Los transportadores ABC funcionales suelen constar de dos dominios de unión a nucleótidos (NBD) y dos dominios transmembrana (TMD). Pueden clasificarse como transportadores completos (TMD₁-NBD₁-TMD₂-NBD₂) o semi-transportadores (TMD-NBD) que deben formar dímeros (homodímeros o heterodímeros) para constituir un transportador funcional. Las subfamilias ABCE y ABCF, en cambio, carecen de dominios transmembrana, por lo que no tienen función de transporte (Figura 3) (Liu, 2019; Pérez De Marcos et al., 2021).

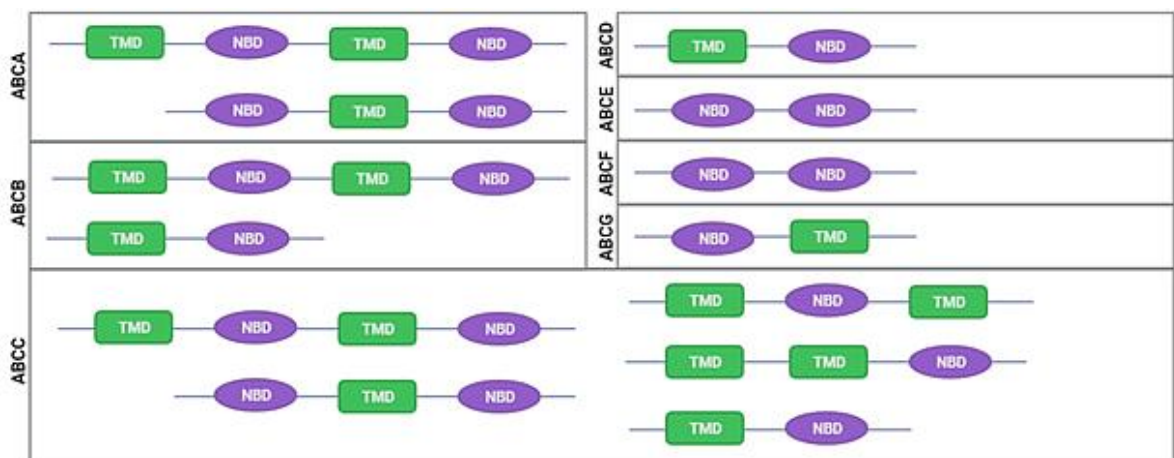


Figura 3. Clasificación de los transportadores ABC y sus dominios conservados. Las barras representan las secuencias de aminoácidos; los rectángulos indican las posiciones de los dominios transmembrana (TMD), y los óvalos las posiciones del dominio de unión a nucleótidos (NBD). Modificado de He et al., 2019.

Dependiendo del tipo de transportador, cada TMD está compuesto por entre seis y diez hélices transmembrana α (con seis hélices siendo lo más común para la mayoría de los exportadores), sumando un total de 12 a 20 segmentos transmembrana. Si bien la estructura de los NBDs es bastante conservada en todas las familias de transportadores ABC, los TMDs son más diversos, lo que permite a estas proteínas reconocer y transportar una amplia variedad de sustratos (Liu, 2019; Pérez De Marcos et al., 2021).

Entre los transportadores ABC identificados, al menos 11 se han vinculado al desarrollo de MDR, incluyendo la glicoproteína P (P-gp/ABCB1), las proteínas asociadas a la resistencia a múltiples fármacos (MRPs/ABCCs), y la proteína de resistencia al cáncer de mama (BCRP/ABCG2) (Liu, 2019; Pérez De Marcos et al., 2021).

2.3.1. Proteína 4 de resistencia a múltiples fármacos

La MRP4, el cuarto miembro de la subfamilia ABCC, está codificada por el gen ABCC4 localizado en el cromosoma 13 (13q32.1). Este gen contiene 31 exones y codifica la MRP más pequeña, con una longitud de 1325 aminoácidos y un peso aproximado de 170 kDa (Berthier et al., 2019; Chen et al., 2018; Liu, 2019; Pérez De Marcos et al., 2021).

MRP4 tiene la estructura típica de los transportadores ABC, con la disposición TMD1-NBD1-TMD2-NBD2. Cada TMD está compuesto por seis hélices transmembrana (TM) importantes para la unión de ligandos y los NBDs son responsables de la unión y la hidrólisis del ATP, lo que impulsa el transporte (Figura 4) (Berthier et al., 2019; Chen et al., 2018).

MRP4 se expresa ampliamente en numerosos tejidos humanos, incluidos el cerebro, páncreas, pulmones, riñones, hígado y el intestino delgado, además de estar presente en células sanguíneas. Una característica única de MRP4 es su localización dual en células polarizadas: puede encontrarse en la membrana apical o basolateral, dependiendo del tipo celular (Berthier et al., 2019; Chen et al., 2018; Liu, 2019; Pérez De Marcos et al., 2021).

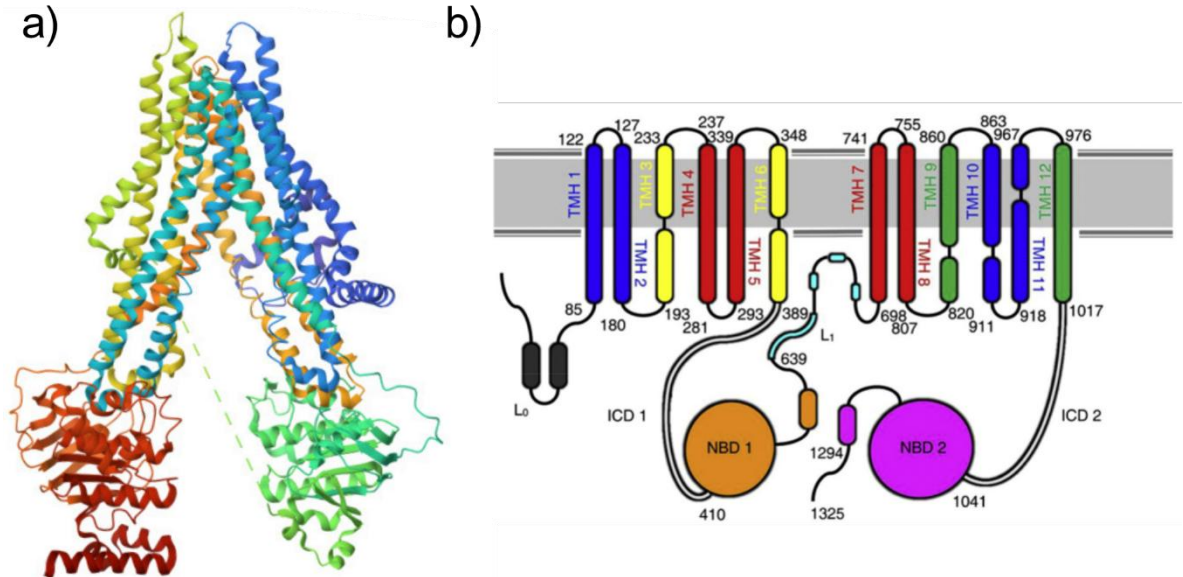


Figura 4. Modelo estructural de MRP4. Representación tridimensional (a) y organización estructural (b). TM: hélices transmembranales; L₀/L₁: puentes; NBD: dominios de unión a nucleótidos; ICD: dominio intra-citoplasmático. Los números indican la posición aproximada de los aminoácidos. Tomado de Berthier et al., 2019; PDB: 8I4B.

En 1999, Schuetz y colaboradores reportaron la sobreexpresión de MRP4 en una línea celular linfocítica T humana, vinculándola a una menor eficacia de fármacos antivirales basados en nucleósidos, lo que constituyó el primer indicio de la funcionalidad de MRP4. Desde entonces, se ha identificado un amplio espectro de sustratos para MRP4, que incluye tanto moléculas endógenas como xenobióticos (Tabla 2) (Berthier et al., 2019; Chen et al., 2018; Liu, 2019; Pérez De Marcos et al., 2021; Schuetz et al., 1999; Tsukamoto et al., 2017).

Gracias a su amplia especificidad de sustrato y a su localización en múltiples tejidos, MRP4 puede modificar la farmacocinética de diversos medicamentos y contribuir al desarrollo de resistencia a múltiples fármacos. Además, es un transportador clave de moléculas de señalización como cAMP y PGE₂, regulando procesos esenciales como la proliferación celular, la diferenciación y la apoptosis (Berthier et al., 2019; Fan et al., 2019; Liu, 2019).

Tabla 2. Sustratos de MRP4.

Sustratos endógenos	cAMP	Leucotrieno B4	Ácidos biliares
	cGMP	Tromboxano TXB2	Folatos
	DHEA	Prostaglandina E2	Glutación
	Estradiol 17 β glucurónido		Urato
Sustratos fármacos	<i>Antineoplásicos</i>	<i>Antihipertensivos</i>	<i>Antibióticos</i>
		Furosemida	Cefalosporinas
	Azatioprina	Hidroclorotiazida	Cefazolina
	Camptotecina	Irbesartán	Cefmetazol
	Leucovorina	Losartán	Cefotaxima
	Mercaptopurina	Olmesartán	Ceftizoxima
	Metotrexato	<i>Antivirales</i>	<i>Inmunosupresores AINE</i>
	SN-38	Adefovir	Ácido micofenólico
	Tioguanina	Ganciclovir	Celecoxib
	Topotecán	Tenofovir	Indometacina
			Sulindac

AINE: antiinflamatorios no esteroideos; DHEA: prasterona (Berthier et al., 2019; Chen et al., 2018; Liu, 2019; Pérez De Marcos et al., 2021; Tsukamoto et al., 2017).

2.3.2. Polimorfismos de un solo nucleótido en MRP4

La afinidad de MRP4 por sus sustratos puede verse afectada por uno o más de los 30,185 polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs, por sus siglas en inglés) identificados en este gen. De estos, especialmente relevantes son aquellos localizados en regiones exónicas (alrededor de 10,062) y, en particular, los SNPs no sinónimos, que generan cambios en los aminoácidos codificados. Los SNPs pueden tener un impacto variable en la proteína, desde ningún efecto hasta modificaciones significativas en su expresión, localización y/o función. Se ha demostrado, además, que algunos SNPs no sinónimos (nsSNPs) en ABCC4 tienen potencial como biomarcadores (Berthier et al., 2019; Singh et al., 2020; Tsukamoto et al., 2017; Yates & Sternberg, 2013).

Por ejemplo, los nsSNPs rs3765534 (E757K) y rs2274407 (K304N) han sido identificados como biomarcadores negativos en pacientes pediátricos con LLA. E757K aumenta drásticamente la sensibilidad al tratamiento con 6-MP, lo que conlleva una alta frecuencia de reducción de dosis, y los portadores del alelo de riesgo presentan mayor incidencia de leucopenia grave. En su caso K304N se ha asociado significativamente con mielotoxicidad inducida por 6-MP, manifestada en neutropenia, agranulocitosis y leucopenia (Figura 5) (Choi et al., 2019; Hareedy et al., 2015; Krishnamurthy et al., 2008; Tanaka et al., 2015, 2018).

La mala prognosis asociada a estos polimorfismos se explica por el impacto que tienen sobre la función de MRP4. La variante K304N reduce la expresión del transportador, lo que provoca una acumulación intracelular de sustratos endógenos y xenobióticos. Estudios *in silico* sugieren que esta baja expresión se debe a un *splicing* aberrante del ARN mensajero (mARN) de ABCC4, que elimina aproximadamente 300 pb. Este SNP se localiza en el sitio aceptor de empalme 3' del exón 8 en el pre-mARN. Otro SNP que también disminuye la expresión del transportador es el rs11568658 (G187W), afectando el transporte de sustratos endógenos y provocando una mayor acumulación de fármacos como azidotimidina (AZT), adefovir (PMEA) y SN-38 (Figura 5) (Abla et al., 2008; Banerjee et al., 2016; Mesrian-Tanha et al., 2017; Tsukamoto et al., 2019).

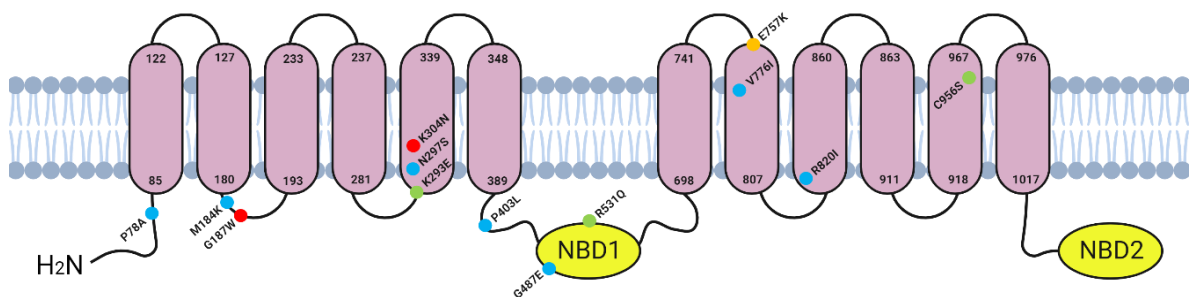


Figura 5. Efecto de polimorfismos de un solo nucleótido en la función del transportador MRP4. ● Reducción de la expresión; ● Localización deficiente; ● Aumento del transporte; ● Disminución del transporte. Creada a partir de información recopilada de Abla et al., 2008; Banerjee et al., 2016; Janke et al., 2008; Mailloux et al., 2022; Mesrian-Tanha et al., 2017; Tanaka et al., 2015, 2018; Tsukamoto et al., 2017, 2019.

Por otro lado, los efectos de la variante E757K no parecen estar relacionados principalmente con cambios en los niveles de expresión, sino con una localización deficiente de MRP4 en la membrana, lo que genera células menos resistentes al tratamiento con azatioprina, SN-38 y 6-MP (Figura 5) (Krishnamurthy et al., 2008; Tsukamoto et al., 2017).

Otras variantes reportadas que afectan la función de MRP4 incluyen aquellas que disminuyen o aumentan su capacidad de transporte. Entre los nsSNPs que reducen el transporte de fármacos se encuentran las variantes P78A, M184K, N297S, P403L, G487E, V776I y R820I, mientras que las variantes K293E, R531Q y C956S se asocian con un aumento en la capacidad de transporte (Figura 5) (Abla et al., 2008; Janke et al., 2008; Mailloux et al., 2022; Tsukamoto et al., 2017).

Estos hallazgos destacan cómo las mutaciones no sinónimas en MRP4 pueden influir tanto en la expresión de la proteína como en su capacidad de transporte. Incluso cuando los SNPs se localizan en regiones similares, sus efectos sobre el transporte mediado por MRP4 dependen del sustrato. Aún no se comprende completamente cómo cada variante de SNP impacta de manera diferencial el transporte de múltiples sustratos.

2.3.3. Estudios mutacionales en MRP4

Los estudios mutacionales de aminoácidos son fundamentales para comprender las bases moleculares del transporte de MRP4. El-Sheikh y colaboradores (2008) realizaron mutaciones no sinónimas en aminoácidos de MRP4 que se consideran importantes para el reconocimiento y unión de sustratos; analizaron el papel de los residuos Phe368, Phe369, Glu374, Arg375, y Glu378, ubicados en la hélice transmembrana 6, en el transporte de cGMP y MTX. La selección de estos aminoácidos se basó en que están altamente conservados en MRP4 entre diferentes especies, así como en sus variaciones dentro de la subfamilia MRP, lo que sugiere una importancia mecánica específica de estos residuos (El-Sheikh et al., 2008).

Al sustituir estos aminoácidos por sus análogos en MRP1/MRP2 (F368L, F369-, E374S, R375S y E378Q), se observó que la mayoría de las mutaciones eliminaban la actividad de transporte, excepto R375S, que mantenía el transporte de cGMP pero reducía el de MTX. Los autores atribuyeron este efecto a la posible influencia de la serina polar introducida o a la eliminación de la arginina cargada positivamente. Para estudiar más a fondo el rol de Arg375, generaron tres mutantes adicionales: R375A (positivo a hidrofóbico), R375E (positivo a negativo) y R375K (positivo a positivo). Los mutantes R375A y R375E redujeron significativamente la actividad de transporte, mientras que R375K mantuvo la actividad sin cambios. Esto llevó a la conclusión de que Phe368, Phe369, Glu374, Arg375 y Glu378 podrían constituir una parte crucial del sitio de unión a sustratos en MRP4. Además, se observó que los cambios no conservativos en estos residuos reducen la actividad del transportador, mientras que los cambios conservativos la mantienen, e, interesantemente, un cambio semi-conservativo modifica la especificidad del transportador de manera dependiente del sustrato (El-Sheikh et al., 2008).

En otro estudio, Wittgen y colaboradores (2012) investigaron el impacto de las sustituciones de los aminoácidos Phe368 (TM6), Trp995 y Arg998 (TM12) en la actividad de transporte de MRP4. Trp995 y Arg998 fueron seleccionados debido a su alta conservación en la familia MRP, y Phe368 fue incluido por su ubicación frente a Trp995 en el sitio de unión a sustrato. Las sustituciones F368A y W995A, junto con todas las mutaciones en Arg998 (Lys, Ser, Tyr y Leu), prácticamente anularon la actividad de transporte para todos los sustratos probados (E17bG, cGMP, ácido fólico y MTX). Las mutaciones conservativas W995F y W995Y también disminuyeron considerablemente el transporte de todos los sustratos (Wittgen et al., 2012).

Las mutaciones en Phe368 mostraron efectos duales según el sustrato y la modificación. Por ejemplo, el transporte de cGMP mediado por F368Y aumentó un 160 %, mientras que el de los demás sustratos se redujo de un 20 % a un 50 %. En el caso de F368W, el transporte de E17bG aumentó hasta un 250 %, pero el de cGMP, MTX y ácido fólico disminuyó un 24 %, 55 % y 88 %, respectivamente (Wittgen et al., 2012).

El modelo por homología, realizado por Wittgen y colaboradores, sugiere que Trp995 y Arg998 están localizados en la interfaz citosólica de TM12, orientados hacia el poro. Esto, respaldado por los resultados de la mutagénesis, indica que estos aminoácidos podrían desempeñar un papel fundamental en la entrada de sustratos al sitio de unión. Por su parte, Phe368 se localiza fuera del sitio de unión en el estado orientado hacia el citoplasma, pero se desplaza hacia dentro del poro en el estado orientado extracelularmente, lo que sugiere que podría ser importante para los cambios conformacionales que ocurren tras la unión inicial del sustrato. Este comportamiento podría explicar los efectos diferenciales en la actividad de transporte de la mutante F368W, ya que los cambios conformacionales podrían afectar la liberación disminuida o aumentada de los sustratos (Wittgen et al., 2012).

En conclusión, la Arg998 parece ser esencial para el transporte de los sustratos analizados, mientras que Phe368 y Trp995 podrían ser importantes para dirigir los sustratos hacia el espacio extracelular. Además, los cambios semi-conservativos en Phe368 modifican la actividad del transportador dependiendo del sustrato (Wittgen et al., 2012).

El estudio de estos residuos, especialmente Phe368 y Arg375, mediante técnicas de química computacional podría ayudar a determinar si ciertas mutaciones permiten un transporte diferencial que reduzca el transporte de fármacos sin afectar el de sustratos endógenos, o en su defecto, que impacte en menor medida. Este conocimiento podría contribuir al desarrollo de inhibidores específicos de MRP4, con aplicaciones en investigaciones futuras sobre la función de MRP4 *in vitro* e *in vivo*, y potenciales aplicaciones terapéuticas.

2.4. Química computacional

Los ensayos de mutagénesis *in vitro* aportan información valiosa sobre el papel de un determinado aminoácido en una proteína. Sin embargo, estos estudios suelen implicar un considerable gasto de tiempo y recursos, los cuales a menudo son limitados. Una alternativa eficiente es el uso de herramientas de química computacional *in silico*, las cuales han adquirido un papel fundamental en la biología estructural.

La química computacional no solo representa un ahorro de tiempo y recursos, sino que proporciona información valiosa que sería difícil obtener experimentalmente. Entre sus aplicaciones destacan el modelado por homología de proteínas sin estructura tridimensional determinada experimentalmente y la generación de modelos con cambios en secuencias de aminoácidos.

Estos modelos permiten estudiar la función de una proteína a nivel molecular, facilitando el análisis de mutaciones, la comprensión de mecanismos de unión, la identificación de sitios activos y la modelación de especificidad de sustratos. También posibilitan simulaciones de acoplamiento y orientan el diseño de experimentos futuros con la información obtenida (Muhammed & Aki-Yalcin, 2019).

De esta manera, la química computacional actúa como una guía en la identificación de posibles sitios de unión de quimioterapéuticos a MRP4 y a sus variantes no sinónimas, mediante acoplamiento molecular y análisis de diferencias en energías de unión, a través de dinámica molecular. Esta información permite identificar cuál aminoácido es el más adecuado para estudios de mutación experimental (Muhammed & Aki-Yalcin, 2019).

2.4.1. Modelado por homología

La estructura tridimensional de una proteína es esencial para su estudio detallado. Sin embargo, obtener dicha estructura mediante métodos experimentales es una tarea compleja y costosa, y aunque el número de estructuras conocidas sigue creciendo, aún es limitado. La escasez de estructuras tridimensionales (3D) es especialmente alta para las proteínas de membrana, como lo es MRP4, para las cuales la cristalización representa un reto significativo. Estas dificultades subrayan la necesidad de métodos computacionales confiables para la predicción de estructuras (Nikolaev et al., 2018).

El modelado por homología es considerado el método más preciso para la predicción estructural de proteínas, basado en dos observaciones clave: (1) la estructura tridimensional de una proteína está determinada principalmente por su secuencia de aminoácidos y (2) la estructura tiende a ser más conservada que la secuencia, cambiando a un ritmo evolutivo más lento. Como resultado, secuencias similares se pliegan en estructuras idénticas, y aun secuencias poco relacionadas pueden adoptar estructuras semejantes (Muhammed & Aki-Yalcin, 2019).

En el modelado por homología, la estructura de una proteína se genera a partir de la estructura 3D de una proteína plantilla que presenta una similitud significativa con la secuencia primaria. Este proceso suele incluir varios pasos estándar: selección de la mejor plantilla, alineación entre la secuencia de la plantilla y la secuencia objetivo, construcción de la estructura y, finalmente, evaluación del modelo generado (véase Figura 6) (Muhammed & Aki-Yalcin, 2019; Nikolaev et al., 2018).

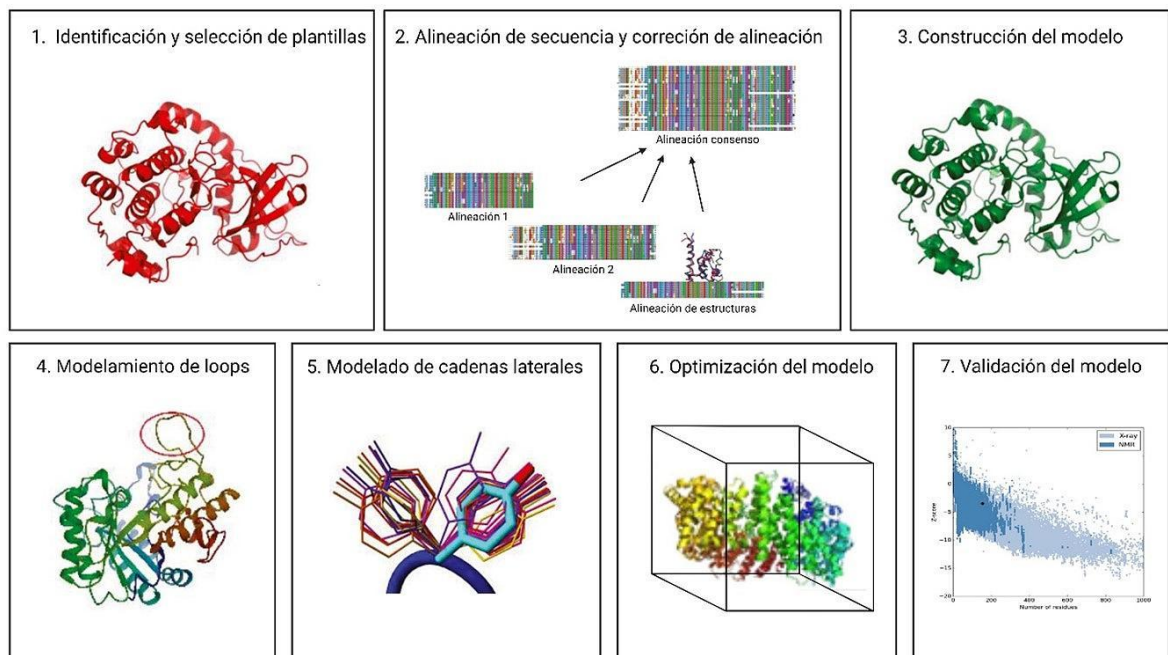


Figura 6. Pasos para el modelado por homología. Modificado de Muhammed & Aki-Yalcin, 2019.

2.4.2. Acoplamiento molecular

El acoplamiento molecular (AM) es una técnica utilizada para predecir tanto el modo como la afinidad de unión de un ligando (por ejemplo, un fármaco) a un receptor (como una proteína). Los métodos de AM requieren las estructuras 3D de los ligandos y de la proteína diana, las cuales pueden obtenerse a partir de estructuras cristalinas por rayos X, resonancia magnética nuclear (RMN), microscopía electrónica criogénica (crio-EM) o a través de modelos de homología (Grinter & Zou, 2014; X. Xu et al., 2018).

Los programas de AM constan de dos componentes principales: el algoritmo de búsqueda y la función de puntuación. El algoritmo de búsqueda identifica los sitios de unión, y las conformaciones y orientaciones del ligando en este sitio, generando así modos de unión potenciales. La función de puntuación, por otro lado, evalúa y clasifica estas conformaciones de unión, asignando puntajes en función de las energías de unión calculadas (Xu et al., 2018).

Así, el objetivo del AM es comprender y predecir el reconocimiento molecular, tanto desde un enfoque estructural (identificando posibles modos de unión), como energético (prediciendo la afinidad de unión). Esta técnica tiene diversas aplicaciones, tales como la identificación de dianas farmacológicas en productos naturales, la evaluación de efectos secundarios y toxicidad en el diseño de nuevos fármacos, el estudio de mecanismos químicos, la búsqueda de moléculas con potencial farmacológico mediante cribado virtual, la optimización de fármacos, el análisis de relaciones estructura-actividad, y la generación de hipótesis de unión para estudios de mutagénesis dirigida. Además, el AM permite profundizar en los mecanismos de unión entre proteínas y ligandos y ha sido útil para investigar cómo las mutaciones proteicas afectan la unión de ligandos, ofreciendo pistas sobre las adaptaciones de patógenos o células resistentes a fármacos (Grinter & Zou, 2014; Morris & Lim-Wilby, 2008; Xu et al., 2018).

No obstante, el AM enfrenta varios retos antes de consolidarse como una herramienta robusta. Uno de los desafíos principales es la flexibilidad de las proteínas: aunque los programas actuales pueden considerar la flexibilidad de moléculas pequeñas, el modelado de la flexibilidad completa de una proteína sigue siendo un reto significativo. Además, la función de puntuación tiene limitaciones que afectan la precisión de los resultados (X. Xu et al., 2018).

Una estrategia para abordar estos retos es emplear funciones de puntuación más avanzadas o realizar un muestreo más exhaustivo de los modos de unión y de la flexibilidad, aunque esto incrementa el costo computacional. Para mejorar la puntuación, es posible incorporar efectos del solvente y la entropía conformacional. En cuanto al muestreo, la flexibilidad de la proteína puede abordarse parcialmente mediante estrategias de acoplamiento conjunto o acoplamiento inducido (Grinter & Zou, 2014; Xu et al., 2018).

Finalmente, los resultados del AM deben validarse mediante experimentos biológicos *in vitro*, sólo entonces podrán confirmarse los efectos de los ligandos sobre sus dianas (X. Xu et al., 2018).

2.4.3. Simulaciones de dinámica molecular

Las simulaciones de dinámica molecular (DM) son una técnica utilizada para examinar sistemas moleculares a escala atómica, especialmente aquellos que, debido a la complejidad de los procesos biomoleculares y su entorno, están fuera del alcance de las herramientas experimentales actuales. Esta metodología permite estudiar en a nivel atómico sistemas biomoleculares como proteínas de membrana y sus interacciones con ligandos, complementando datos experimentales y proporcionando un modelo más completo. Además, las simulaciones de DM se pueden emplear para calcular la energía libre de transiciones conformacionales (Dämgen & Biggin, 2019; Liao, 2020).

En las simulaciones de DM clásicas, los átomos se modelan como partículas cuyo movimiento se obtiene mediante la resolución numérica de las ecuaciones de movimiento de Newton. Los modelos matemáticos que describen las interacciones entre partículas se denominan campos de fuerza, e incluyen términos que representan la vibración y flexión de enlaces, el comportamiento torsional y las interacciones no enlazadas (como las electrostáticas y de Van der Waals). Durante las simulaciones, se calculan de forma iterativa las coordenadas, velocidades, fuerzas y energías potenciales en cada paso de tiempo, cuyo espacio temporal entre uno y otro se denomina *timestep*. Cuanto más pequeño es el *timestep*, mayor es la precisión de la simulación, aunque a un costo computacional mayor. Las escalas de tiempo accesibles actualmente en estas simulaciones varían entre varios cientos de nanosegundos y unos pocos microsegundos, con escalas de longitud de hasta cientos de angstroms (Dämgen & Biggin, 2019; Zheng et al., 2019).

En las simulaciones de DM, los componentes del sistema se dejan interactuar durante un período de tiempo predeterminado, mientras se controlan sus propiedades físicas del sistema. Estas propiedades pueden ser macroscópicas (como el volumen [V], la presión [P], la temperatura [T] y el número de partículas [N]) o microscópicas (como las velocidades [v_i] y posiciones [r_i] de las partículas) (Zheng et al., 2019).

Para obtener una simulación precisa de biomoléculas en solución, es crucial lograr el máximo nivel de detalle posible en la representación interna del sistema. Por ello, la DM *all-atom* (AA-DM), en la que se considera explícitamente cada átomo, incluidos los hidrógenos, es el enfoque más realista. Este tipo de simulaciones permite alcanzar una resolución atómica en el análisis del comportamiento dinámico de proteínas, tanto en equilibrio como en eventos fuera de equilibrio, tales como el plegamiento y el desdoblamiento de proteínas (Beck, 2004).

Por otro lado, existe la DM *coarse-grained* (CG-DM), en la cual cada residuo de una proteína se representa mediante 2-3 esferas o “superátomos”. Este enfoque reduce el costo computacional y permite simular a mayores escalas de tiempo y longitud, aunque se pierde información detallada sobre el comportamiento estructural (Zheng et al., 2019).

Actualmente, las simulaciones de dinámica molecular (DM) están limitadas a escalas temporales de hasta decenas de microsegundos, y sus resultados solo son fiables si estas son lo suficientemente largas para que los sistemas exploren todas las configuraciones relevantes. Sin embargo, en las trayectorias de DM, varias regiones importantes del espacio configuracional quedan sin explorar. Esto ocurre, en gran medida, porque las configuraciones relevantes suelen estar separadas por barreras de energía libre altas, lo que hace que las transiciones configuracionales a través de estas barreras requieran más tiempo del que es posible simular en la actualidad. Esta limitación genera un muestreo insuficiente y, en consecuencia, simulaciones no convergentes para sistemas biomoleculares, lo cual también afecta la precisión de los cálculos de energía libre (Liao, 2020).

Para abordar el problema del muestreo insuficiente, se han desarrollado métodos de muestreo mejorado, que se dividen en dos categorías: métodos basados en variables colectivas (VC) y métodos libres de VC. Los métodos basados en VC añaden potenciales de sesgo a lo largo de variables predefinidas del sistema, mejorando significativamente la convergencia de los cálculos de energía libre cuando las VC están bien seleccionadas. Ejemplos de métodos populares en esta categoría incluyen el *Umbrella Sampling* (US), la metadinámica (MetaD) y la dinámica molecular dirigida (DMD). No obstante, seleccionar las VC adecuadas puede ser un desafío para muchos sistemas. En estos casos, los métodos de muestreo libres de VC ofrecen una ventaja, ya que permiten explorar configuraciones biomoleculares, sin necesidad de un conocimiento previo detallado del sistema. Estos métodos son especialmente útiles para investigar posibles vías de transición estructural biomolecular y descubrir estados intermedios desconocidos (Liao, 2020).

2.4.3.1. *Umbrella Sampling*

Las simulaciones US son uno de los enfoques más utilizados para superar las barreras de energía libre en el cálculo de energía libre. En bioquímica computacional, este método se emplea para determinar la energía de unión de una molécula a una proteína (Kästner, 2011; Liao, 2020).

El US utiliza potenciales de polarización (*bias potential*) en una coordenada de reacción para modelar una transición conformacional, como la unión de una proteína a un ligando, mediante el cambio de una variable colectiva, como la distancia entre dos moléculas o ciertos ángulos diedros. Este enfoque divide el proceso en una serie de ventanas independientes, cada una de las cuales cubre un paso intermedio de la coordenada de reacción, y en cada ventana se realiza una simulación de DM. Al finalizar las simulaciones, las ventanas se combinan mediante métodos como el análisis del histograma ponderado o la integración *Umbrella*, para calcular el cambio en la energía libre (Kästner, 2011; Liao, 2020).

Con la información obtenida mediante estas técnicas de química computacional, podemos evaluar cuál de las dos mutaciones no sinónimas propuestas, F368W o R375S, tiene mayor potencial para reducir la quimiorresistencia en células leucémicas. La mutación seleccionada se podría implementar experimentalmente mediante la herramienta de edición genética CRISPR-Cas9, con el objetivo de obtener resultados más prometedores en la lucha contra la resistencia a los fármacos.

2.5. CRISPR-Cas

La tecnología CRISPR-Cas (Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Interespaciadas y proteínas asociadas a CRISPR, Cas, por sus siglas en inglés) ha revolucionado la ingeniería genética en los últimos años. Este sistema se descubrió originalmente en bacterias, donde funciona como un mecanismo inmunológico adaptativo contra ácidos nucleicos invasores (Yao et al., 2018; Zhan et al., 2019).

A diferencia de otras tecnologías de edición genética, como las nucleasas de dedos de zinc (ZFN) y las nucleasas TALEN, que dependen de la unión de proteínas de diseño específico al ADN para inducir roturas de doble cadena (DSB, por sus siglas en inglés), el sistema CRISPR-Cas utiliza un ARN guía, el cual dirige a la proteína Cas hacia la secuencia objetivo mediante el emparejamiento de bases. Este enfoque es mucho más fácil de diseñar, altamente específico y eficiente, adecuado para la edición génica en diversos tipos celulares y organismos (Ran et al., 2013).

Para la edición genética con CRISPR-Cas, se utiliza un ARN guía (gARN) compuesto por un ARN específico para CRISPR (crARN) y un ARN transactivador (trARN), que activa y dirige a las proteínas Cas hacia su secuencia objetivo en el ADN. Al unirse a la secuencia objetivo y desenrollar el ADN, la nucleasa Cas induce una rotura de doble cadena (Figura 7) (Jiang & Doudna, 2017; Yao et al., 2018; Zhan et al., 2019). La célula puede reparar esta rotura mediante dos mecanismos:

1. Unión de extremos no homólogos (NHEJ): Este proceso de reparación es propenso a errores y genera inserciones o deleciones (*indels*) que pueden desactivar el gen al causar mutaciones de cambio de marco, codones de parada prematuros o desintegración sin sentido del gen diana, lo que provoca una pérdida de función (Figura 7) (Jiang & Doudna, 2017; Yao et al., 2018; Zhan et al., 2019).
2. Reparación dirigida por homología (HDR): Este mecanismo utiliza recombinación asistida por una plantilla de ADN donante para reconstruir el ADN escindido, aprovechándose para introducir mutaciones específicas en la secuencia genética objetivo (Figura 7) (Jiang & Doudna, 2017; Yao et al., 2018; Zhan et al., 2019).

El sistema CRISPR de tipo II, en particular, es atractivo para la edición génica debido a su simplicidad, ya que utiliza una sola proteína Cas para dirigirse a secuencias de ADN definidas, lo que facilita su aplicación en investigación y terapia génica (Jiang & Doudna, 2017; Yao et al., 2018; Zhan et al., 2019).

En 2013, la proteína Cas9 del tipo II de *Streptococcus pyogenes* (SpCas9) se empleó por primera vez para escindir ADN guiado por ARN en células de mamíferos. Desde entonces, el sistema CRISPR-Cas9 y sus versiones modificadas han sido ampliamente utilizados no solo en la edición de genomas, sino también para realizar modificaciones transcripcionales y epigenéticas (Cong et al., 2013; Mali et al., 2013; Yao et al., 2018).

Además, CRISPR-Cas9 ha abierto una nueva vía para la investigación del cáncer, al proporcionar una herramienta para dilucidar los mecanismos de tumorigénesis, identificar posibles dianas terapéuticas y, potencialmente, equipar células para tratamientos basados en terapia celular (Zhan et al., 2019).

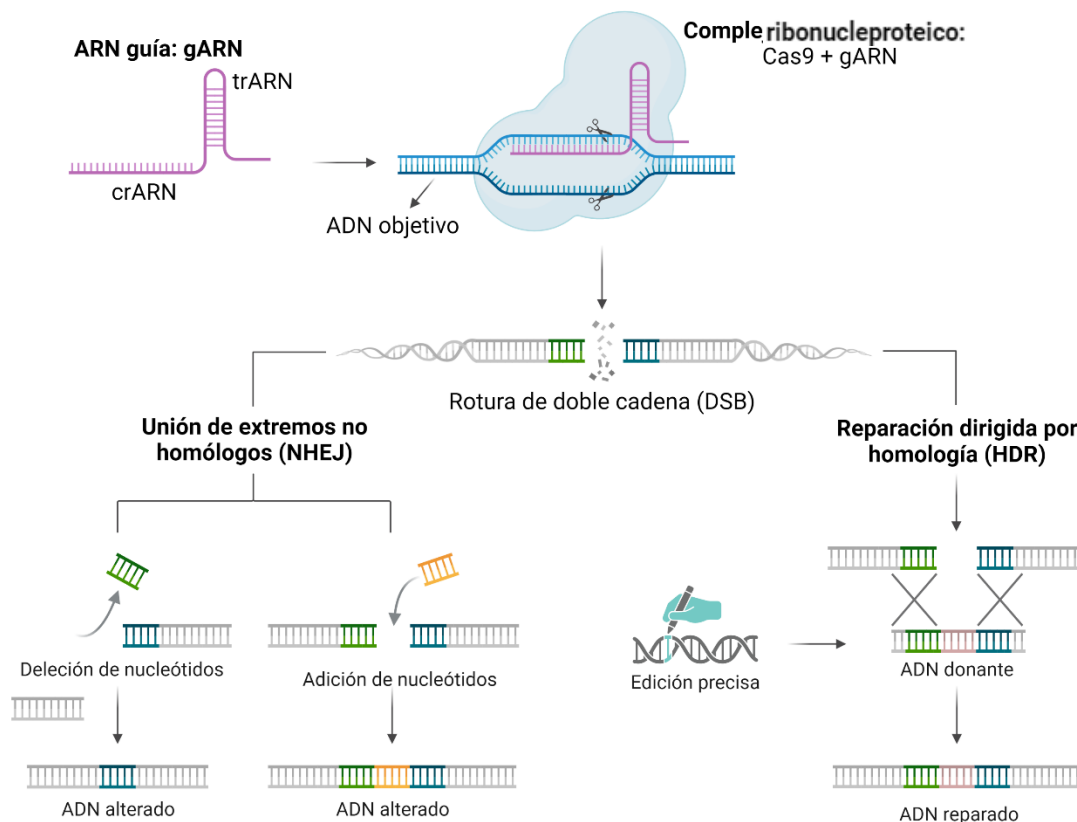


Figura 7. Proceso de edición genética dirigida con CRISPR-Cas9. Modificado de Zhan et al., 2019.

3. HIPÓTESIS

La mutación no sinónima F368W o R375S en el transportador MRP4 generará alteraciones conformacionales en el sitio de unión a sustratos, observables mediante simulaciones moleculares, que modificarán el patrón de transporte de MRP4, afectando principalmente la unión de fármacos y potencialmente sensibilizando a las células leucémicas al tratamiento con metotrexato y/o mercaptopurina.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Comparar el efecto de las mutaciones F368W y R375S en el transportador MRP4 sobre su estructura conformacional y su afinidad teórica por ligandos en relación con la proteína de tipo salvaje de células leucémicas Jurkat (WT).

4.2. Objetivos específicos

- Construir modelos tridimensionales del transportador MRP4 WT y las mutantes F368W y R375S, empleando técnicas de modelado por homología y simulaciones de dinámica molecular.
- Realizar simulaciones de acoplamiento molecular y dinámica molecular para analizar las conformaciones de los modelos de MRP4 WT y sus variantes, y su interacción con sustratos endógenos y fármacos.
- Calcular la afinidad teórica de unión de sustratos endógenos y fármacos a los modelos de MRP4 WT y sus mutantes mediante la técnica de *Umbrella Sampling*, para identificar cambios significativos.

5. METODOLOGÍA

5.1. Obtención de la secuencia de aminoácidos del transportador MRP4

La secuencia de aminoácidos del transportador MRP4 humano en células sanas se obtuvo de la base de datos UniProt (O15439). Para las células leucémicas Jurkat, la secuencia se obtuvo a partir del genoma completo de estas células, reportado por Gioia y colaboradores (2018). Los datos de esta secuenciación están disponibles en el archivo de lectura de secuencias (SRA, por sus siglas en inglés) del NCBI, con el número de corrida SRR5349450 (Gioia et al., 2018; UniProt Consortium, 2014).

5.2. Modelado por homología de MRP4 WT, F368W y R375S

Los modelos por homología se generaron a partir de la secuencia de aminoácidos de MRP4 obtenida de UniProt, y para los modelos de las mutantes, los cambios de aminoácidos correspondientes se realizaron manualmente. Las secuencias se cargaron en el servidor web I-TASSER para construir las estructuras 3D de MRP4, utilizando como plantilla la estructura Cryo-EM de la apo-forma de ABCC4 (PDB: 8I4B). Una vez obtenidos, los modelos por homología fueron sometidos a una evaluación de calidad en el servidor web MolProbity (Chen et al., 2023; Yang et al., 2015).

Tabla 3. Composición de la membrana lipídica de células Jurkat.

Lípido	[mol %]
Fosfatidilcolina	40.00
Colesterol	23.00
Fosfatidiletanolamina	14.00
Fosfatidilinositol	12.50
Fosfatidilserina	7.50
Esfingomielina	4.00
Fosfatidilcolina éter	3.40
Fosfatidiletanolamina éter	3.00
Diacilglicerol	0.50
Ácido fosfatídico	0.30
Fosfatidilglicerol	0.30
Hexosilceramidas	0.10
Di-hexosilceramidas	0.01

Modificado de Szlasa et al., 2020.

5.3. Simulaciones de dinámica molecular

5.3.1. Generación de sistemas

Los sistemas para las simulaciones de DM se construyeron en el servidor web CHARMM-GUI. La membrana lipídica se construyó de acuerdo con la composición descrita para las células Jurkat (Tabla 3). Para el modelo de agua se utilizó TIP3, se añadieron iones NaCl a una concentración de 0.15 M y se utilizó el campo de fuerza CHARMM36 (Brooks et al., 2009; Huang & MacKerell, 2013; Jo et al., 2008; Lee et al., 2016; Szlasa et al., 2020).

5.3.2. Dinámicas de relajación

Para optimizar las estructuras y determinar la conformación representativa (clúster 1), se realizaron simulaciones de dinámica molecular iniciales de 100 ns, extendidas posteriormente a 200 ns. Estas simulaciones se realizaron en Gromacs 2018.7 utilizando un ensamble isotérmico-isobárico (NPT) a una presión de 1 atm y temperatura de 310.15 K, empleando acoplamiento de temperatura y reescalado de velocidad con un término estocástico, así como un barostato de Parrinello-Rahman. Los sistemas se sometieron a 5,000 pasos de minimización *steepest-descent*, seguidos de seis pasos de equilibrio para reducir las constantes de fuerza, siguiendo las recomendaciones de CHARMM-GUI (Bussi et al., 2007; Parrinello & Rahman, 1981; Van Der Spoel et al., 2005).

La simulación de producción se llevó a cabo con un paso de tiempo de 0.02 fs hasta alcanzar los 200 ns. Para identificar las conformaciones relevantes de la simulación (clúster1), se utilizó el módulo de "cluster" de Gromacs 2018.7, utilizando el algoritmo gromos. Los tamaños de los sistemas se describen en el Anexo I (Van Der Spoel et al., 2005).

Tabla 4. Ligandos a evaluar en las simulaciones de acoplamiento molecular.

Sustratos endógenos	Ácido cólico	Ácido fólico	Ácido glicólico
	Ácido taurocólico	Ácido úrico	Leucotrieno B4
	cAMP	cGMP	E17bG
	PEG1	PEG2	
Sustratos fármacos	Adefovir	Azatioprina	Cefazolina
	Cefotaxima	Dexametasona	Doxorrubicina
	Furosemida	Hidroclorotiazida	Leucovorina
	6-MP	Metotrexato	Olmesartán
	SN-38	Prasterona	
	Tenofovir	Topotecán	

5.4. Acoplamiento molecular

Para realizar las simulaciones de AM, se obtuvieron las estructuras 3D de los ligandos desde la base de datos PubChem (Tabla 4). Los *grids* para los modelos se generaron con Autogrid 4.2.6, enfocándose en los residuos relevantes para la interacción de ligandos y fármacos (Tabla 5). Cada *grid box* tuvo dimensiones de 80 x 80 x 80 puntos y un espaciado de 0.375 Å. Los AM se llevaron a cabo utilizando Autodock optimizado para GPU versión 1.5.3, con un total de 100 corridas y 100 millones de evaluaciones, empleando un algoritmo genético Lamarckiano combinado con búsqueda local mediante el algoritmo Solis-Wets.(Becerra et al., 2021; Chen et al., 2018; Kim et al., 2019; Morris et al., 2009; Santos-Martins et al., 2021).

5.5. Umbrella Sampling

Se obtuvieron los complejos proteína-ligando para los sustratos seleccionados (cAMP, cGMP, ácido fólico, 6-MP y MTX) a partir del AM. Luego, se realizaron simulaciones AA-DM de 5 nanosegundos para permitir la relajación del sistema. Los sistemas fueron construidos empleando las condiciones previamente mencionadas, y así como su implementación (Sección 5.3.2).

Posteriormente, con base en el clúster 1 (C1) de la trayectoria obtenida en la simulación AA-DM de 5 ns, se generó otro sistema bajo las mismas condiciones iniciales (Sección 5.3.2). Este sistema se utilizó para realizar una simulación US de 25 ns, y se calculó la energía de unión empleando el histograma de la mediana de la fuerza de tracción, estimada mediante el algoritmo WHAM. La simulación utilizó como variable colectiva la distancia entre el centro de masa de MRP4 y el ligando a lo largo del eje z, con una velocidad de 0.06 nm/ns y una constante de fuerza de 1000 kJ/mol-nm² (Liu, 2019; W.-X. Xu et al., 2012).

Tabla 5. Residuos relevantes en las interacciones ligando-MRP4.

Sustratos endógenos	Lys106, Gln251, Thr839, Glu374 Trp947, Gly991, Glu1002
Sustratos fármacos	Ser306, Arg312, Phe939, Ser945 Arg946, Leu987, Thr994

5.6. Generación de imágenes y análisis gráfico

Todas las figuras de proteínas presentadas en este documento fueron generadas en PyMOL. La manipulación de los complejos proteicos se realizó utilizando la versión académica del programa Schrödinger-Maestro. Los gráficos de RMSD se construyeron en R utilizando la biblioteca ggplot2 (Maestro; Schrödinger Inc., 2019; PyMOL; Schrödinger Inc., 2015; Villanueva & Chen, 2019; Wallach et al., 2014).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Modelos por homología y dinámicas de relajación

La selección de los mejores modelos entre los cinco generados por el servidor web I-TASSER para cada proteína se realizó considerando el *C-score* y el *TM-score*. El *C-score* es una medida de confianza que estima la calidad de los modelos predichos por I-TASSER, y suele estar en el rango de -5 a 2, donde valores más altos indican mayor confianza en el modelo. Por su parte, el *TM-score* mide la similitud estructural entre dos estructuras, valores superiores a 0.5 indican una topología correcta del modelo, mientras que valores inferiores a 0.17 sugieren una similitud aleatoria. Los valores obtenidos para el *C-score* y el *TM-score* en cada modelo construido se presentan en la Tabla 6 (Yang et al., 2015).

Además, la calidad de los modelos por homología fue evaluada mediante el servidor web MolProbity, que proporcionó los diagramas de Ramachandran (Anexo II) y el *Z-score*. El diagrama de Ramachandran muestra, teóricamente, las conformaciones posibles de los ángulos ψ y ϕ para un residuo de aminoácido en una proteína, clasificando los residuos en tres categorías: favorecidos, permitidos y atípicos. Este diagrama se utiliza para validar estructuras, ya que un mayor porcentaje de residuos en regiones favorecidas indica una mejor calidad estereoquímica de los modelos. En este caso, el porcentaje de residuos favorecidos en los diagramas de Ramachandran (FR) para los tres modelos por homología (MH) fue superior al 80 % (Tabla 6) (Jha et al., 2018; Lovell et al., 2003; X. Zhou et al., 2022).

Tabla 6. Parámetros de calidad en los modelos por homología.

ID	C-score	TM-score	MH		MR	
			FR (%)	Z-score	FR (%)	Z-score
WT	0.07	0.72 ± 0.11	83.45	-3.20 ± 0.20	91.78	-2.37 ± 0.20
F368W	-0.16	0.69 ± 0.12	85.19	-3.31 ± 0.19	92.26	-2.07 ± 0.20
R375S	0.05	0.72 ± 0.11	84.35	-3.26 ± 0.20	91.86	-1.96 ± 0.20

FR: residuos favorecidos de Ramachandran; MH: modelos por homología; MR: modelos relajados.

El Z-score de Ramachandran caracteriza la forma de la distribución angular (ψ , ϕ) en el diagrama de Ramachandran y describe lo "normal" que es un modelo comparado con un conjunto de referencia de estructuras de alta resolución. Un valor de $|Z\text{-score}| > 3$ indica una geometría improbable, mientras que un valor entre 2 y 3 sugiere una geometría improbable pero posible, y un valor menor a 2 se considera normal. De los tres modelos evaluados, ninguno alcanzó un Z-score aceptable, ya que todos presentaron valores superiores a 3 (Tabla 6, MH). Por lo tanto, los modelos fueron sometidos a simulaciones AA-DM para relajar las estructuras y mejorar los Z-scores (Sobolev et al., 2020).

Inicialmente, el tiempo de simulación AA-DM se fijó en 100 ns; sin embargo, este tiempo no fue suficiente para que el modelo WT mantuviera un comportamiento estable. Se considera que un modelo es estable cuando la variación del RMSD (desviación cuadrática media de la raíz) entre pasos de tiempo consecutivos es inferior a 2.0 Å (Chothia & Lesk, 1986; Xiang, 2006).

Por esta razón, las simulaciones se extendieron hasta 200 ns. En la Figura 8 se muestra el gráfico de RMSD. Durante la simulación, se observó que el modelo WT se estabilizó a partir de los 100 ns, aunque mostró un ligero aumento alrededor de los 185 ns, sin ser significativo. Por su parte, los modelos F368W y R375S alcanzaron la estabilidad a los 75 ns y 55 ns, respectivamente.

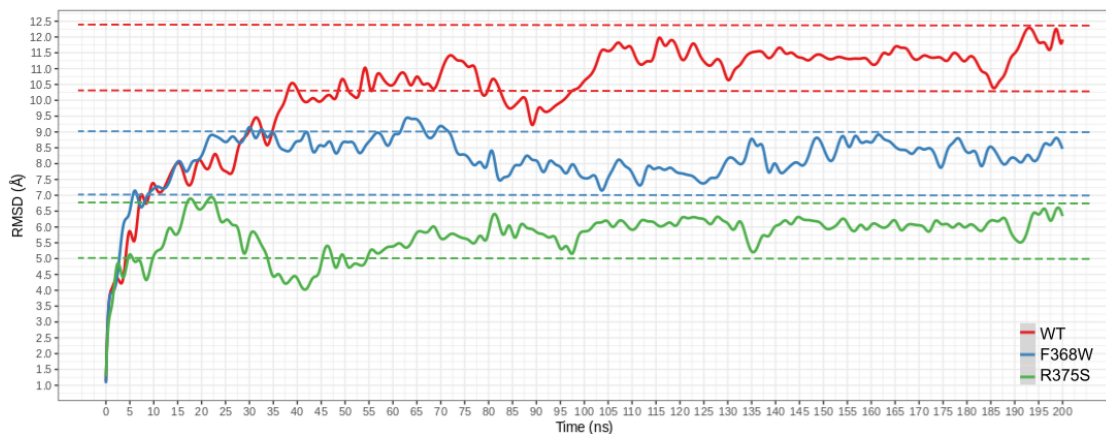


Figura 8. Diagrama RMSD de los modelos de MRP4: WT, F368W y R375S a lo largo de 200 ns AA-DM.

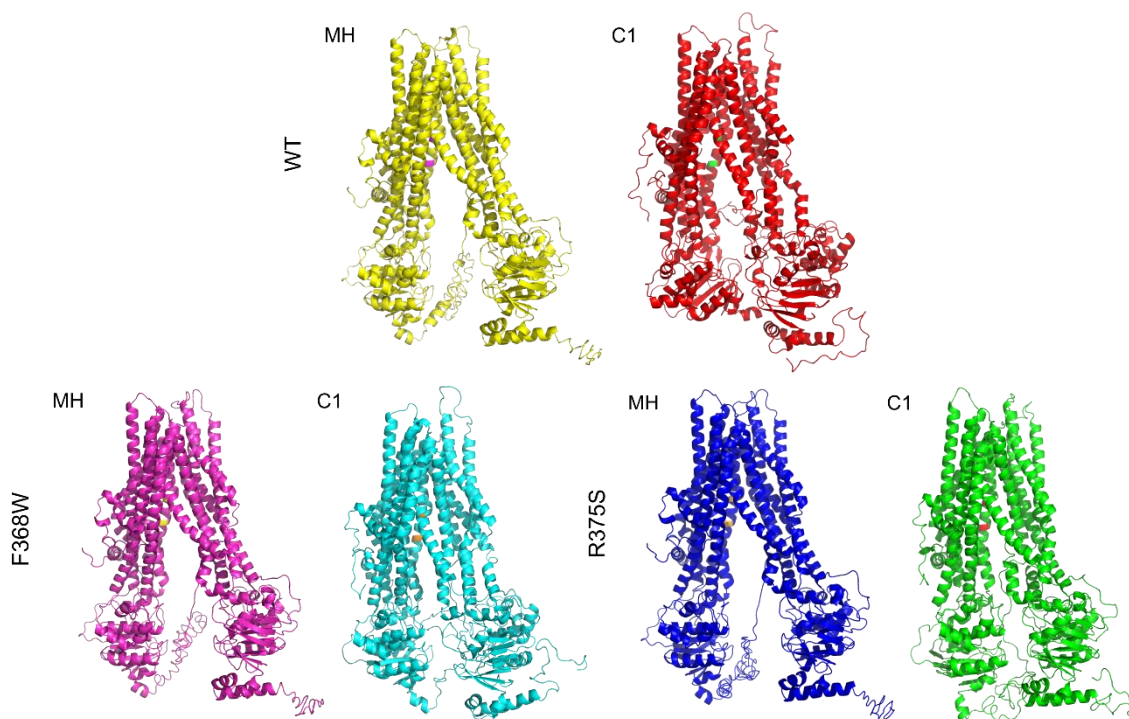


Figura 9. Estructura 3D de los modelos de MRP4 construidos por modelado por homología (MH) y sus conformaciones representativas (C1) obtenido de las AA-DM, con los aminoácidos 368 y 375 resaltados en color distinto.

Los clústeres 1 de cada simulación fueron evaluadas en MolProbity. En todos los casos, más del 90 % de los residuos fueron FR, y el Z-score también mejoró considerablemente en los tres modelos relajados (MR) (Tabla 6).

Finalmente, los modelos de MRP4 correspondientes a clúster 1 presentaron parámetros de calidad adecuados para continuar con los estudios posteriores. La Figura 9 muestra las estructuras 3D de los tres modelos de MRP4 construidos mediante modelado por homología y los clústeres 1 obtenidos de las simulaciones AA-DM; los aminoácidos 368 y 375 están resaltados en un color distinto.

La Figura 10 muestra los valores de RMSD para los TMDs del modelo MRP4 WT y sus variantes, revelando que los cambios conformacionales de las variantes, siguen un patrón similar al de la estructura completa. Los TMDs más estables corresponden a la variante R375S, seguida por la variante F368W. En contraste, los TMDs de MRP4 WT no logran estabilizarse a lo largo de los 200 ns de simulación, con un aumento abrupto en el RMSD cerca de los 185 ns.

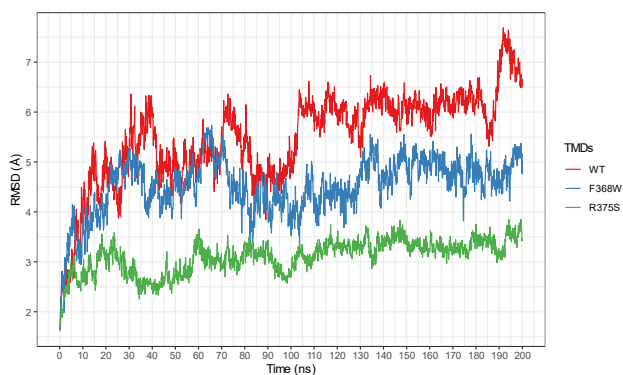


Figura 10. Diagrama RMSD de los dominios transmembrana de los modelos de MRP4: WT, F368W y R375S a lo largo de 200 ns AA-DM.

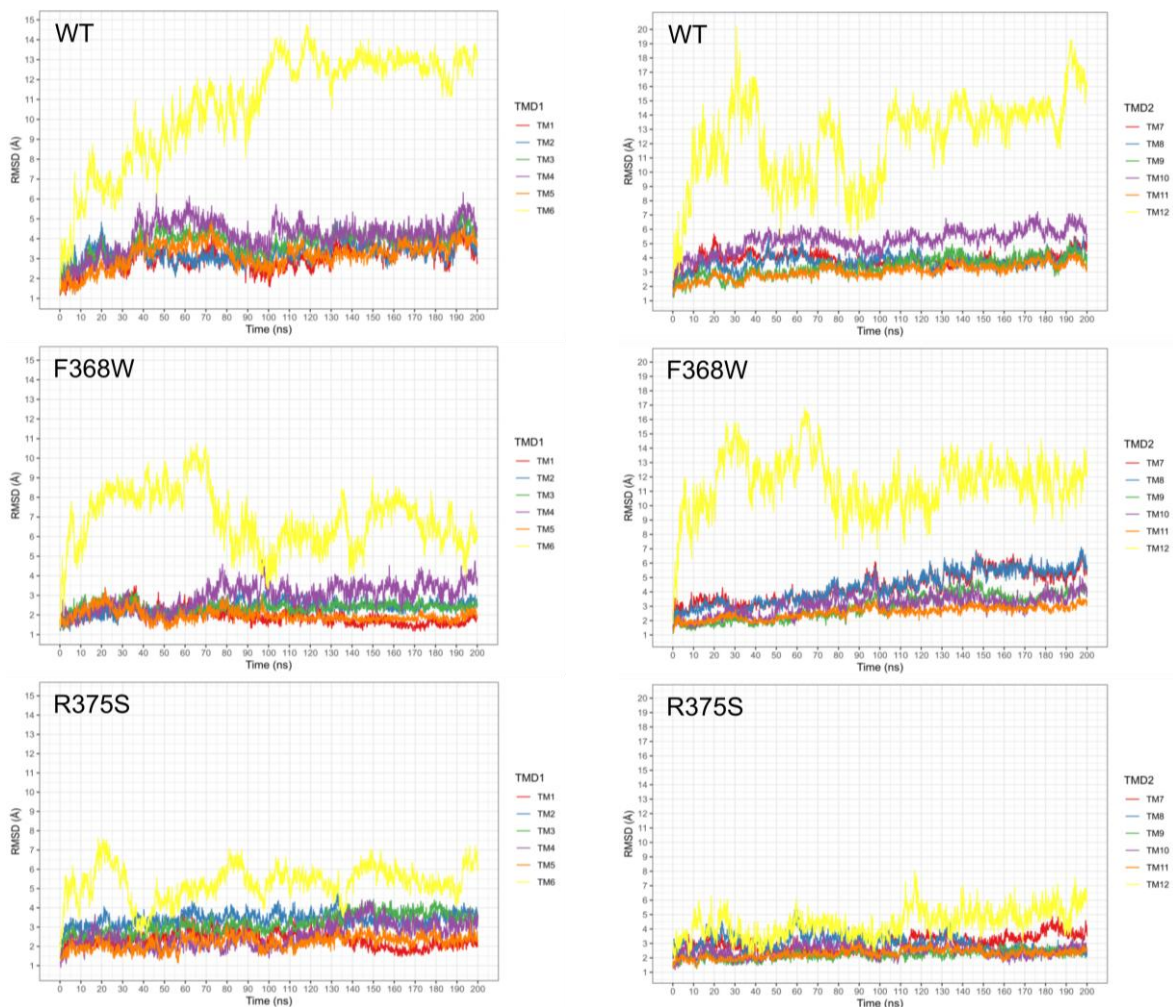


Figura 11. Diagramas RMSD de los dominios transmembrana 1 y 2 de MRP4 WT y sus variantes lo largo de 200 ns de AA-DM. TMD: dominio transmembrana; hélices transmembrana.

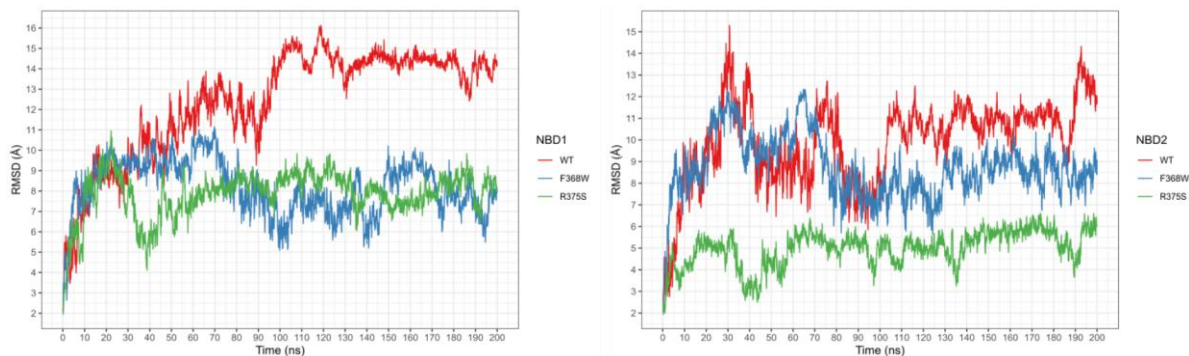


Figura 12. Diagrama RMSD de los sitios de unión a nucleótidos 1 y 2 MRP4 WT y sus variantes lo largo de 200 ns de AA-DM. NBD: dominio de unión a nucleótidos.

Un análisis detallado de los valores de RMSD para cada TM en TMD1 y TMD2 de MRP4 WT y sus variantes indica que en todos los modelos los TM 1 a 5 y 7 a 11 se mantienen estables durante los 200 ns de simulación AA-DM. En cambio, los TM 6 y 12 no muestran este mismo comportamiento; sin embargo, en la variante R375S, aunque estos dos segmentos tampoco alcanzan la estabilización completa, los cambios en los valores de RMSD son menos abruptos (Figura 11).

En última instancia, los diagramas de RMSD de los sitios de unión a nucleótidos muestran que en ninguno de los modelos estudiados se estabilizó durante el tiempo de simulación (Figura 12). Este comportamiento podría explicarse por la ausencia de ATP unido a los NBDs; estudios previos de AA-DM en este transportador han demostrado que el acoplamiento de ATP en los NBDs contribuye a su estabilización (Hernández-Castro, 2024).

6.2. Acoplamiento molecular

Se realizó un análisis de acoplamiento molecular utilizando el clúster 1 de las simulaciones de AA-DM para cada uno de los modelos de MRP4, con el objetivo de analizar cómo las mutaciones afectan la afinidad por sustratos endógenos y fármacos. Se obtuvieron dos tipos de resultados de acoplamiento: el mejor acoplamiento global, denominado *best cluster* (BC), y la conformación con menor energía o *lowest energy* (LE), que reflejó la mejor puntuación de acoplamiento.

Para el análisis, se seleccionó la conformación LE, dado que la mayoría de los ligandos no mostraron diferencias significativas en el sitio de interacción ni en los residuos implicados, en comparación con el BC. Además, la conformación LE presentó mejores valores de *docking score* (DS). Los valores de la conformación BC se encuentran en el Anexo III. Los DS para los sustratos endógenos en las conformaciones LE se presentan en la Tabla 7, mientras que los correspondientes a los fármacos se encuentran en la Tabla 8. Se consideró que un cambio en el valor de DS era significativo cuando excedía ± 1 kcal/mol.

En la variante R375S, los valores de DS para los sustratos endógenos no mostraron cambios significativos en comparación con MRP4 WT, excepto para PEG2. En la variante F368W, los ligandos endógenos que experimentaron cambios significativos fueron la prostaglandina PEG2, LTB4 y ácido cólico (CA) en la conformación LE (Tabla 7). A pesar de estas variaciones con respecto a MRP4 WT, solo se observaron cambios significativos en 4 de los 11 ligandos estudiados.

Tabla 7. *Docking score* expresados en kcal/mol de la conformación LE de los sustratos endógenos en los modelos MRP4 WT, F368W y R375S.

	WT	F368W	R375S
GA	-2.90	-3.45	-3.55
UA	-5.52	-6.13	-5.06
cAMP	-6.37	-7.04	-6.60
PEG2	-7.21	-8.34*	-9.10*
LTB4	-7.32	-8.65*	-7.64
cGMP	-7.46	-6.77	-7.03
CA	-7.88	-9.25*	-8.67
PEG1	-8.64	-9.54	-8.89
FA	-8.92	-9.16	-8.71
E17bG	-9.39	-9.40	-8.75
TA	-10.44	-10.28	-10.20

CA: ácido cólico; cAMP: monofosfato cíclico de adenosina; cGMP: monofosfato cíclico de guanosina; DS: *docking score*; E17bG: estradiol 17 beta glucurónido; FA: ácido fólico; GA: ácido glicólico; LTB4: leucotrieno B4; PEG1: prostaglandina E1; PEG2: prostaglandina E2; TA: ácido taurocólico; UA: ácido úrico. *Representa más de -1 kcal/mol de diferencia en el DS comparado con el modelo WT.

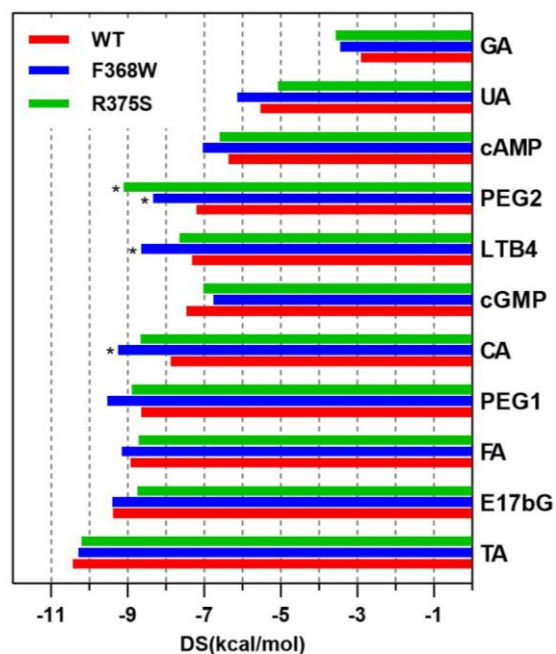
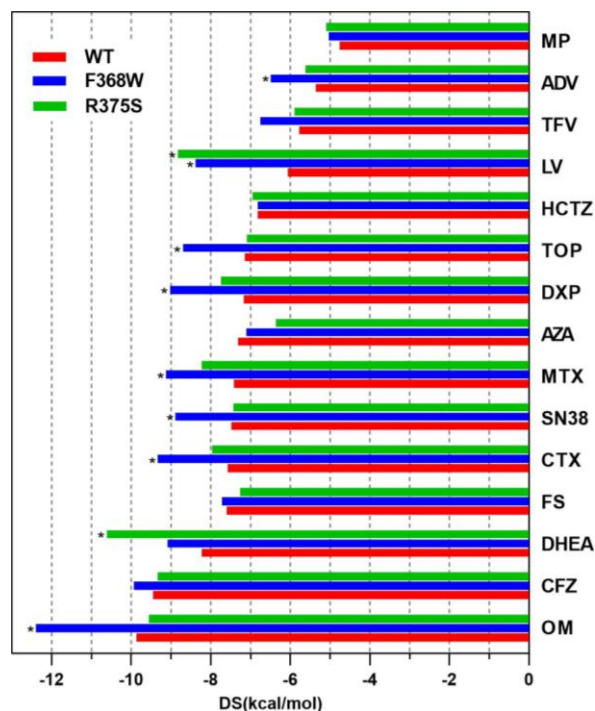


Tabla 8. *Docking score* expresados en kcal/mol de la conformación LE de los sustratos fármacos en los modelos MRP4 WT, F368W y R375S.

	WT	F368W	R375S
MP	-4.76	-5.03	-5.1
ADV	-5.36	-6.49*	-5.62
TFV	-5.78	-6.75	-5.90
LV	-6.06	-8.38*	-8.82*
HCTZ	-6.82	-6.82	-6.95
TOP	-7.15	-8.70*	-7.09
DXP	-7.17	-9.02*	-7.74
AZA	-7.31	-7.10	-6.36
MTX	-7.42	-9.13*	-8.23
SN38	-7.48	-8.89*	-7.43
CTX	-7.58	-9.33*	-7.96
FS	-7.60	-7.72	-7.26
DHEA	-8.23	-9.09	-10.61*
CFZ	-9.45	-9.93	-9.33
OM	-9.87	-12.39*	-9.56



ADV: adefovir; AZA: azatioprina; CFZ: cefazolina; CTX: cefotaxima; DHEA: prasterona; DS: *docking score*; DXP: dexametasona; FS: furosemida; HCTZ: hidroclorotiazida; LV: leucovorina; MP: mercaptopurina; MTX: metotrexato; OM: olmesartán medoxomilo; TFV: tenofovir; TOP: topotecán.

*Representa más de -1 kcal/mol de diferencia en el DS comparado con el modelo WT.

De forma similar a los sustratos endógenos, la mayoría de los sustratos fármacos en la variante R375S no mostraron diferencias significativas en comparación MRP4 WT, con excepción de leucovorina (LV) y el esteroide DHEA (Tabla 8). En contraste, en la variante F368W, aproximadamente la mitad de los fármacos evaluados presentaron cambios significativos en el DS. La Tabla 8 indica los ligandos específicos con variaciones en el DS.

En la sección de Metodología se explicó la generación de dos *grid boxes*: una enfocada en los aminoácidos relevantes para las interacciones con sustratos endógenos, y otra en aquellos para la interacción con fármacos. Sin embargo, independientemente de la *grid box* utilizada, la mayoría de los ligandos mostró dos sitios de unión. Los valores de DS en las tablas anteriores corresponden al sitio de unión en la vecindad de los aminoácidos de interés (368 y 375).

6.3. Diferencias en el patrón de interacción de las estructuras de MRP4

Los acoplamientos moleculares no solo permitieron obtener los valores de DS, sino también generar los diagramas de interacción (LIDs), que representan gráficamente cómo un ligando interactúa con los aminoácidos en el sitio de unión de la proteína. Estos diagramas facilitan la visualización de los tipos de interacciones que se forman entre el ligando y los residuos de aminoácidos circundantes.

A partir de los LIDs se extrajo información detallada sobre los aminoácidos específicos implicados en las interacciones y la naturaleza de cada una. Además, se evaluaron posibles variaciones en los sitios de unión entre los diferentes modelos. Los análisis revelaron que los aminoácidos esenciales para el reconocimiento de ligandos, independientemente del modelo, son Leu363, Phe368/Trp368, Trp995 (hidrofóbicos) y Gly991.

La Tabla 9 destaca los residuos clave en las interacciones ligando-MRP4, señalando los aminoácidos importantes tanto para el reconocimiento general, como para los sustratos endógenos. Cabe señalar que no se identificaron residuos específicos para la interacción exclusiva con sustratos fármacos durante este análisis.

En términos de composición, el sitio de unión en el modelo MRP4 WT es el más grande, mientras que en la variante R375S es más pequeño, aunque compuesto exclusivamente por residuos presentes en MRP4 WT, residuos resaltados en azul, lo que sugiere una mayor similitud en las interacciones con ligandos entre estos dos modelos. En contraste, el sitio de unión de F368W mostró las mayores diferencias, compartiendo solo dos aminoácidos con MRP4 WT, Phe211 y Arg998, lo que explica la mayor variabilidad observada en los valores de DS de F368W frente a distintos ligandos en comparación con los otros modelos.

Es probable que los residuos resaltados en azul desempeñen un papel importante en el reconocimiento de una variedad de ligandos, contribuyendo a la estabilización de la unión mediante interacciones de diferentes tipos, como las hidrofóbicas, hidrofílicas y de carga negativa.

Tabla 9. Aminoácidos clave para las interacciones ligando-MRP4.

	WT	F368W	R375S
Generales	Phe211, Phe324, Phe325, Arg362, Leu367, Tyr728, Asp842, Gln845, Thr846, Gln849, Met992, Arg998	His152, Phe156, Phe211, Phe214, Gln994, Arg998	Phe325, Arg362, Arg367, Asp842, Thr846, Gln849, Met992
Endógenos	His 152, His 153, Gln 994	Glu102, Lys106, His213, Gly359, Ala360, Arg362, Thr364, Met990, Met992	

En el modelo F368W, los residuos Arg362 y Met992, que en MRP4 WT participan en interacciones generales, aparecen asociados específicamente con interacciones para sustratos endógenos. Curiosamente, el caso inverso ocurre con His152 y Gln994, que en F368W se relacionan con interacciones generales en lugar de endógenas. Esta variación en los patrones de interacción refuerza la hipótesis de por qué los valores de DS muestran más diferencias significativas en F368W.

En cuanto a las interacciones con sustratos endógenos, no se detectaron en R375S, y solo se observaron pocas en MRP4 WT. Sin embargo, en F368W se identificó una mayor cantidad de residuos implicados en este tipo de interacciones, superando incluso a los asociados con interacciones generales. Esto sugiere que, en F368W, el sitio de unión está constituido de manera más uniforme para sustratos endógenos, mostrando mayor homogeneidad en los aminoácidos involucrados. En contraste, las interacciones con sustratos fármacos parecen ser más diversas, como lo evidencia la escasez de residuos adicionales en el modelo general, lo cual indica una mayor heterogeneidad en los residuos relevantes para su reconocimiento.

En los tres modelos de MRP4, las interacciones predominantes son de tipo hidrofóbico e hidrofílico. Al analizar las interacciones por grupo de moléculas, se observa que en el modelo MRP4 WT hay más interacciones positivas con los sustratos endógenos, mientras que en las variantes mutantes F368W y R375S se presentan más interacciones negativas con los sustratos fármacos. Además, en los tres modelos, los principales tipos de interacciones intermoleculares identificados fueron los puentes de hidrógeno y las interacciones π - π , con una mayor frecuencia de estas en los sustratos fármacos.

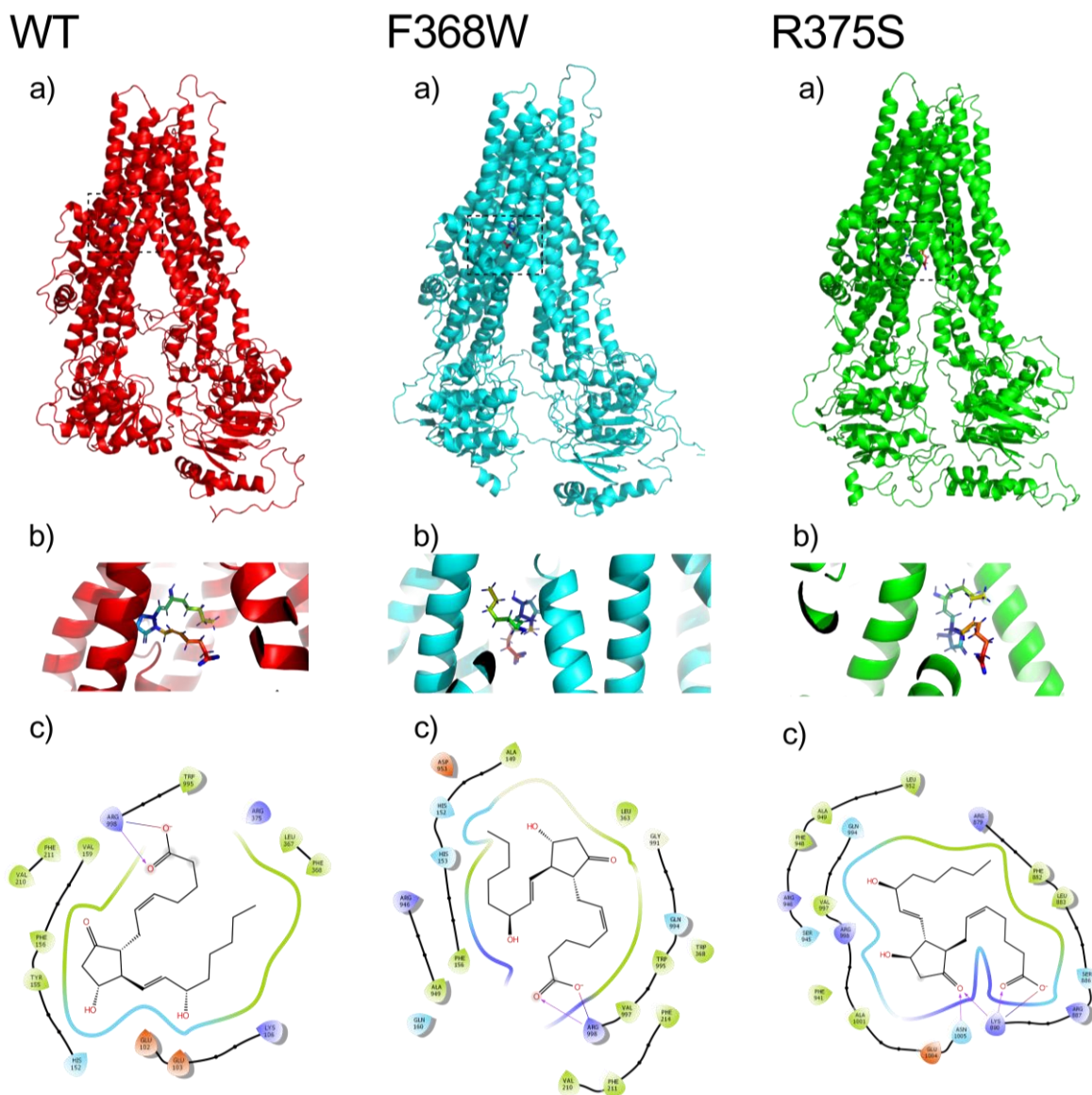


Figura 13. Acoplamiento molecular de PEG2 en MRP4 WT, F368W y R375S: Representación del sitio de unión con su ampliación (a-b) y diagrama de interacciones (c). PEG2 se muestra en color arcoíris. Línea verde: región hidrofóbica, línea azul: región hidrofílica, línea morada: región positiva, flecha rosa: puente de hidrogeno, línea roja con morado: puente salino.

Se presentan a continuación los resultados de acoplamiento molecular y los LIDs para PEG2 y LV, los únicos ligandos que mostraron cambios significativos en su DS en ambas variantes.

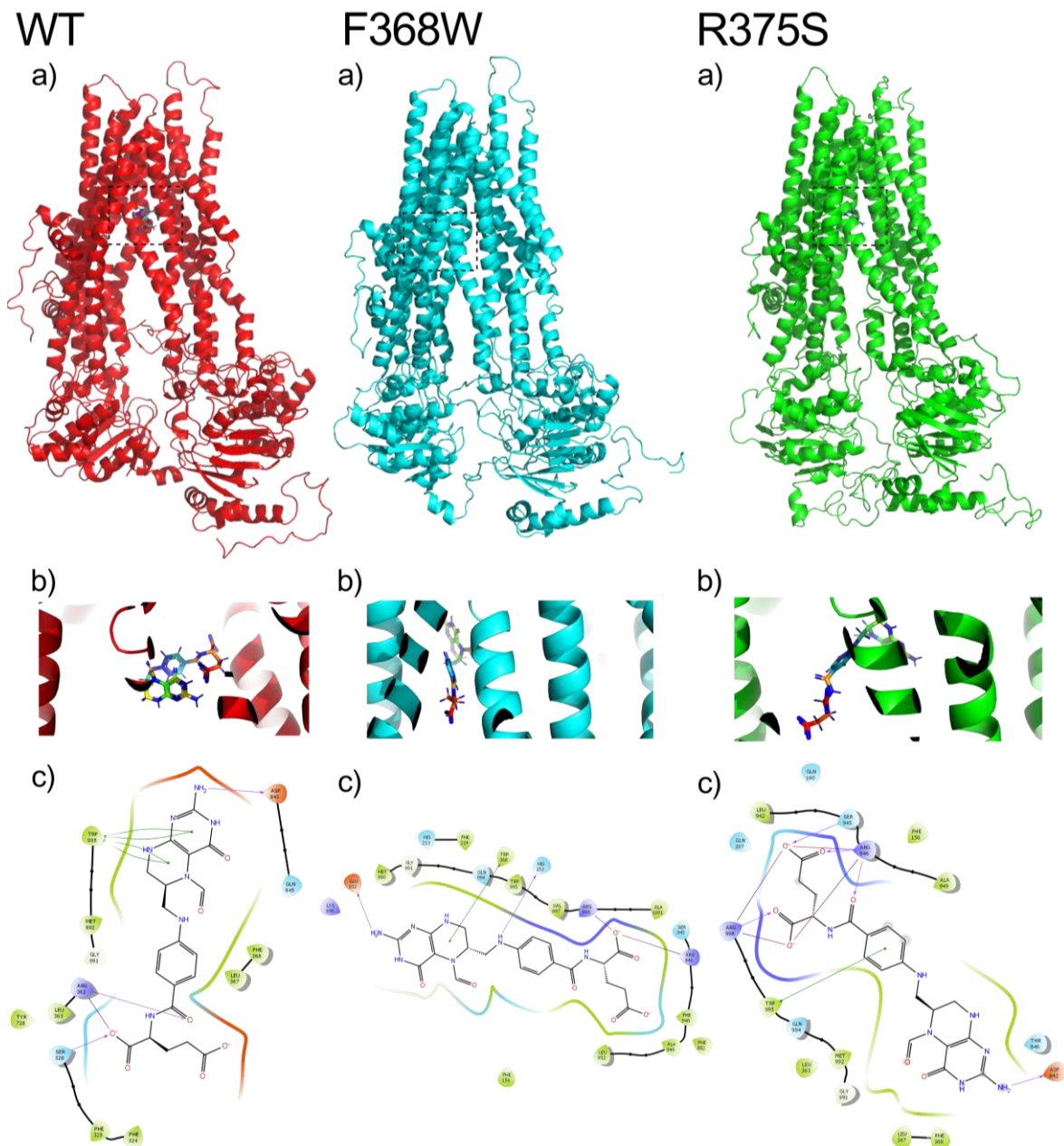


Figura 14. Acoplamiento molecular de LV en MRP4 WT, F368W y R375S. Representación del sitio de unión con su ampliación (a-b) y diagrama de interacciones (c). LV se muestra en color arcoíris. Línea verde: región hidrofóbica, línea azul: región hidrofílica, línea morada: región positiva, línea naranja: región negativa, línea roja con morado: puente salino, punto-línea-punto verde: interacción π - π , flecha rosa: puente de hidrogeno.

La Figura 13 muestra el sitio de unión de PEG2 en los tres modelos. En MRP4 WT y F368W (a y b, respectivamente), el sitio de unión de PEG2 es similar, mientras que en el modelo R375S, se observa una ubicación distinta, ubicada hacia el centro de la proteína. La conformación de PEG2 varía entre los tres modelos: en MRP4 WT y F368W, PEG2 forma un puente de hidrógeno y un puente salino con Arg998, aunque los residuos circundantes son distintos, creando ambientes moleculares diferentes. Esta diferencia en el entorno podría explicar la ligera variación en el DS, con MRP4 WT alcanzando un DS de -7.21 kcal/mol y F368W -8.34 kcal/mol. En el modelo R375S, PEG2 establece tres puentes de hidrógeno (dos con Lys890 y uno con Asn1005) y un puente salino adicional con Lys890, lo que explica su DS más bajo de -9.10 kcal/mol.

La Figura 14 muestra variaciones en el sitio de unión y en la conformación de LV entre los tres modelos de MRP4. En los LIDs, se observa que el entorno molecular alrededor de LV es principalmente hidrofóbico y de carga positiva en F368W y R375S, mientras que en MRP4 WT es hidrofóbico y de carga negativa. En MRP4 WT predominan las interacciones π - π y los puentes de hidrógeno, en contraste con los modelos F368W y R375S, donde prevalecen los puentes salinos además de los puentes de hidrógeno. Estas diferencias explican la similitud de los valores de DS en F368W y R375S, con -8.38 y -8.82 kcal/mol respectivamente, y su diferencia en comparación con MRP4 WT, con -6.06 kcal/mol.

6.4. Ensayos *Umbrella Sampling*

6.4.1. Dinámicas de relajación ligandos selectos

Se llevó a cabo una segunda simulación AA-DM de 25 ns para los complejos proteína-ligando de los sustratos cAMP, cGMP, ácido fólico (FA), 6-MP y MTX. Para analizar la interacción entre los ligandos y los modelos de MRP4 WT y sus variantes mutantes, se realizaron estas simulaciones adicionales que permitieron analizar la estabilidad de los complejos y verificar los modos y sitios de unión. A continuación, se describen los detalles de cada simulación y los resultados obtenidos.

6.4.1.1. Complejos MRP4-cAMP

En los complejos MRP4-cAMP, el sitio de unión no mostró modificaciones significativas tras la simulación AA-DM de 25 ns, confirmando su correcta localización inicial (Figura IV.I, Anexo IV). Sin embargo, se observaron variaciones conformacionales del ligando tras el proceso de simulación.

En el modelo WT, el sitio de unión del cAMP se localizó hacia la izquierda e interactuó mediante dos puentes de hidrógeno con Leu95 y Phe211. En contraste, las variantes mutantes F368W y R375S mostraron similitudes en el sitio de unión, ubicado hacia la derecha, pero con diferencias en la conformación del ligando y en los tipos de interacciones.

En F368W, el cAMP estableció más interacciones con la proteína, incluyendo dos puentes de hidrógeno con Ser328 y Asp842, un puente salino con Asp842, y dos interacciones π - π con Phe324 y Trp995. Por otro lado, en R375S predominaron las interacciones hidrofóbicas (Figura 15).

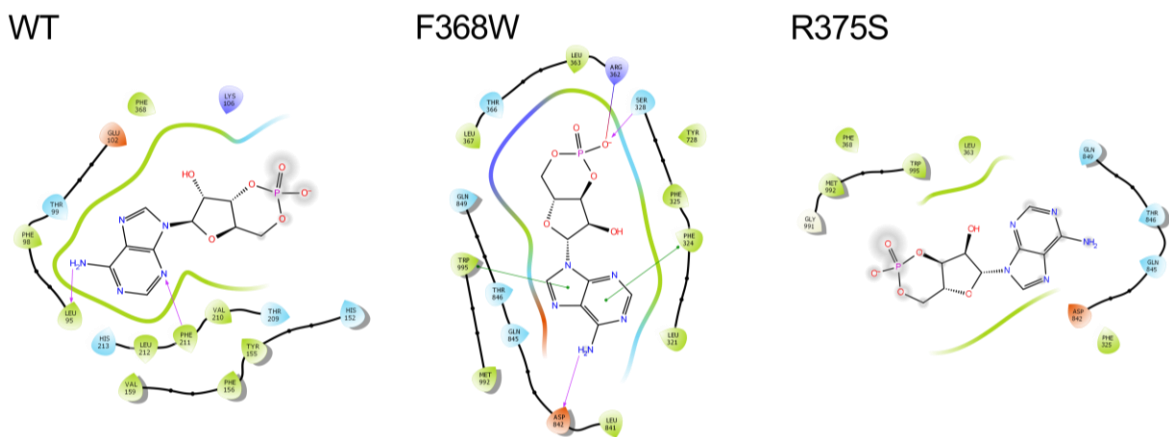


Figura 15. Diagramas de interacción cAMP con MRP4 WT, F368W y R375S. Línea verde: región hidrofóbica, línea azul: región hidrofílica, línea morada: región positiva, línea naranja: región negativa, línea roja con morado: puente salino, punto-línea-punto verde: interacción π - π , flecha rosa: puente de hidrógeno, círculo gris: interacción con el solvente.

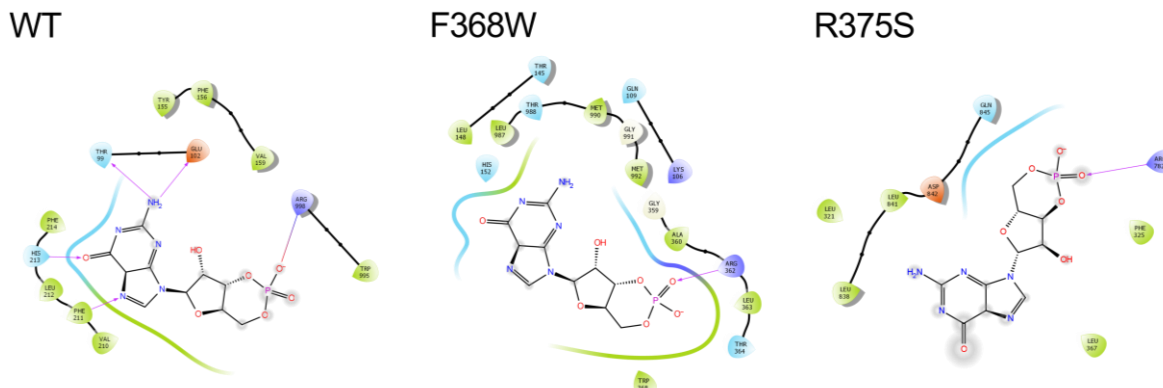


Figura 16. Diagramas de interacción cGMP con MRP4 WT, F368W y R375S. Línea verde: región hidrofóbica, línea azul: región hidrofílica, línea morada: región positiva, línea roja con morado: puente salino, flecha rosa: puente de hidrogeno, círculo gris: interacción con el solvente.

6.4.1.2. Complejos MRP4-cGMP

De manera similar al cAMP, el sitio de unión del cGMP permaneció estable tras la simulación. En MRP4 WT y la variante F368W, este se ubicó hacia la izquierda, mientras que en la variante R375S hacia la derecha (Figura IV.II). No obstante, las conformaciones del ligando y los patrones de interacción mostraron diferencias según el modelo.

En el WT, se formaron tres puentes de hidrógeno con Thr99, Glu102 y His213, además de un puente salino con Arg998. En F368W, las interacciones disminuyeron, limitándose a un puente de hidrógeno con Arg362 y contactos hidrofílicos e hidrofóbicos. Finalmente, en R375S, el cGMP interactuó a través de un puente de hidrógeno con Arg782, acompañado de interacciones hidrofílicas y con el solvente (Figura 16).

6.4.1.3. Complejos MRP4-FA

Los complejos con FA siguieron un patrón similar a los observados con cAMP y cGMP. Aunque el sitio de unión permaneció constante en los tres modelos tras la simulación, las interacciones y la conformación del ligando variaron (Figura IV.III)

En el modelo WT, el FA adoptó una conformación relajada, interactuando mediante dos puentes de hidrógeno con Glu102 y una interacción π -catión con Arg998. En F368W, el ligando mostró una ligera torsión, lo que permitió interacciones hidrofóbicas, hidrofílicas y positivas, además de una tipo π - π con Phe324, dos puentes salinos con His152 y Arg998, y un puente de hidrógeno con Gln999. Por otro lado, en R375S, el FA presentó una conformación más estresada, reflejando una mayor tensión estructural. En este modelo, se formó un mayor número de interacciones, incluyendo cinco puentes de hidrógeno con Ser886, Arg887 (2), Gln994, y Asn1005, tres puentes salinos con Arg879, Lys890 y Arg998, así como interacciones hidrofóbicas, hidrofílicas y positivas (Figura 17).

6.4.1.4. Complejos MRP4-6-MP

En comparación con los ligandos previos, que son sustratos endógenos, la 6-MP, al ser una molécula relativamente pequeña, mostró mayor movilidad en las variantes mutantes durante la simulación. En estas, el ligando se desplazó hacia el centro de la proteína, mientras que en el modelo WT permaneció en su posición inicial hacia la derecha, evidenciando menor variabilidad (Figura 18).

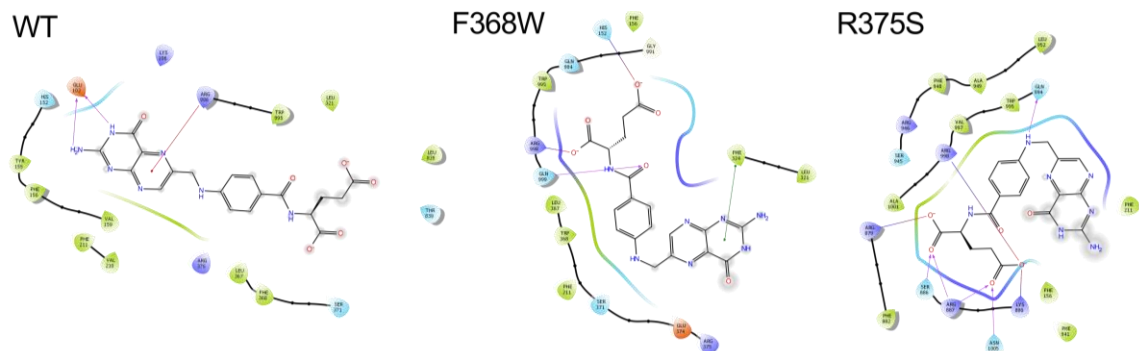


Figura 17. Diagramas de interacción FA con MRP4 WT, F368W y R375S. Línea verde: región hidrofóbica, línea azul: región hidrofílica, línea morada: región positiva, línea roja con morado: puente salino, punto-línea-punto verde: interacción π - π , punto-línea rojo: interacción π -catión, flecha rosa: puente de hidrogeno.

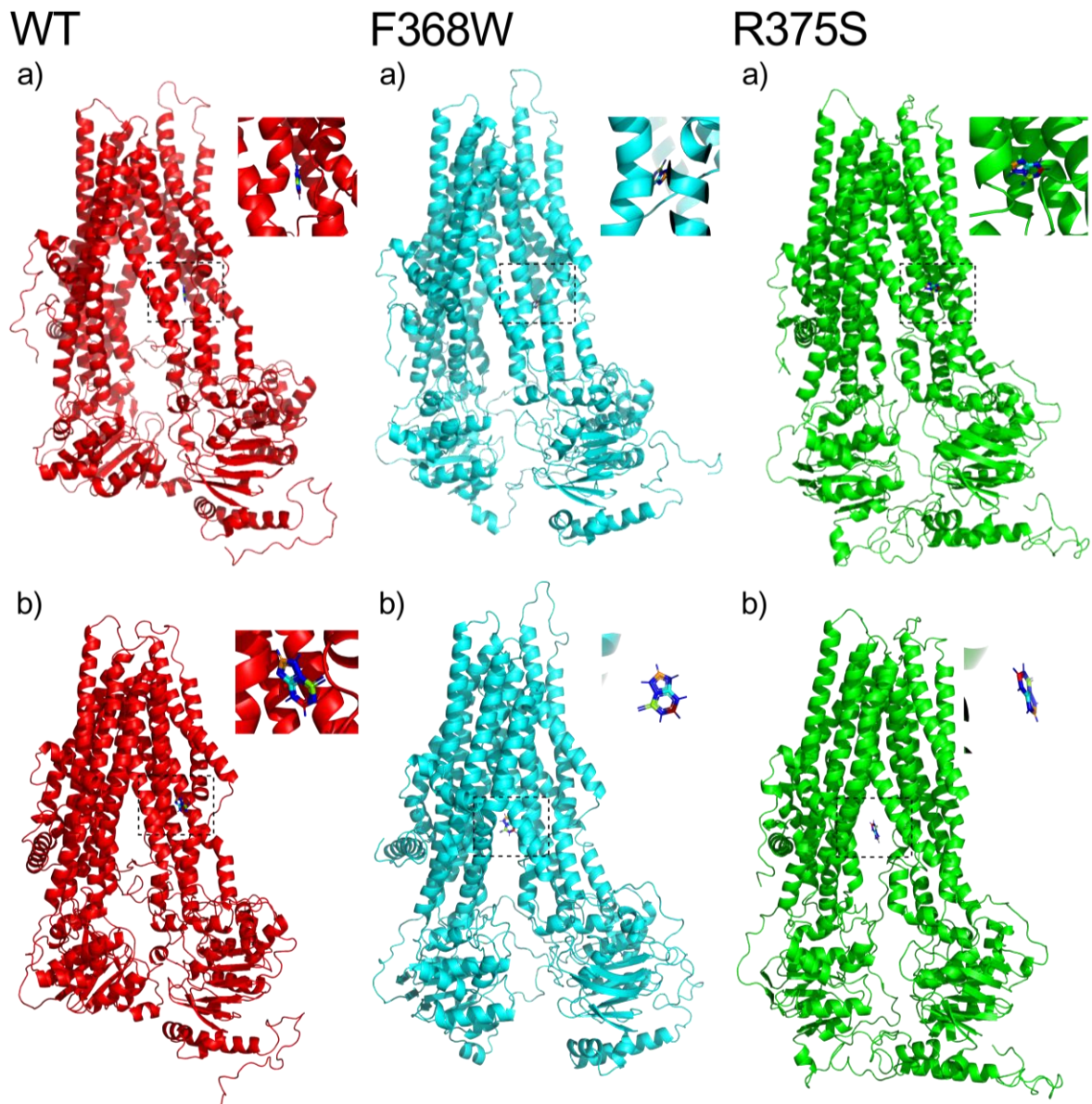


Figura 18. Estructuras 6-MP en complejo con MRP4 WT, F368W y R375S: antes (a) y después de la simulación AA-DM de 25 ns (b).

El modelo WT formó el mayor número de interacciones con la 6-MP, incluyendo interacciones hidrofóbicas, hidrofílicas y dos puentes de hidrógeno con Asn792 y Ser793. En contraste, en las variantes mutantes F368W y R375S, las interacciones estuvieron mayormente mediadas por el solvente. En F368W se formaron dos puentes de hidrógeno con los residuos Lys204 y Glu378 (Figura 19).

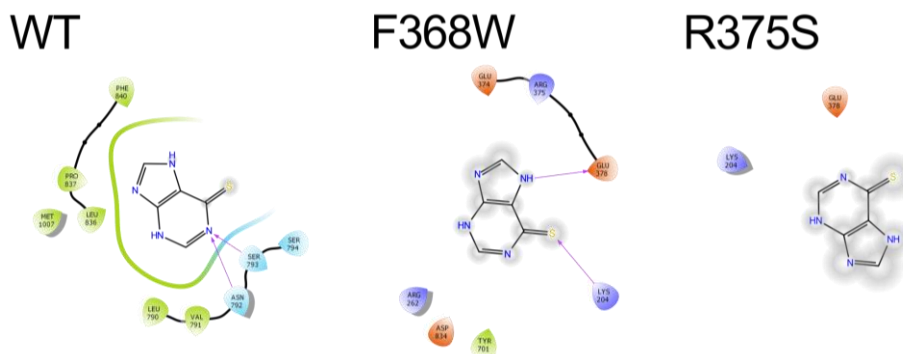


Figura 19. Diagramas de interacción 6-MP con MRP4 WT, F368W y R375S. Línea verde: región hidrofóbica, línea azul: región hidrofílica, flecha rosa: puente de hidrogeno, círculo gris: interacción con el solvente.

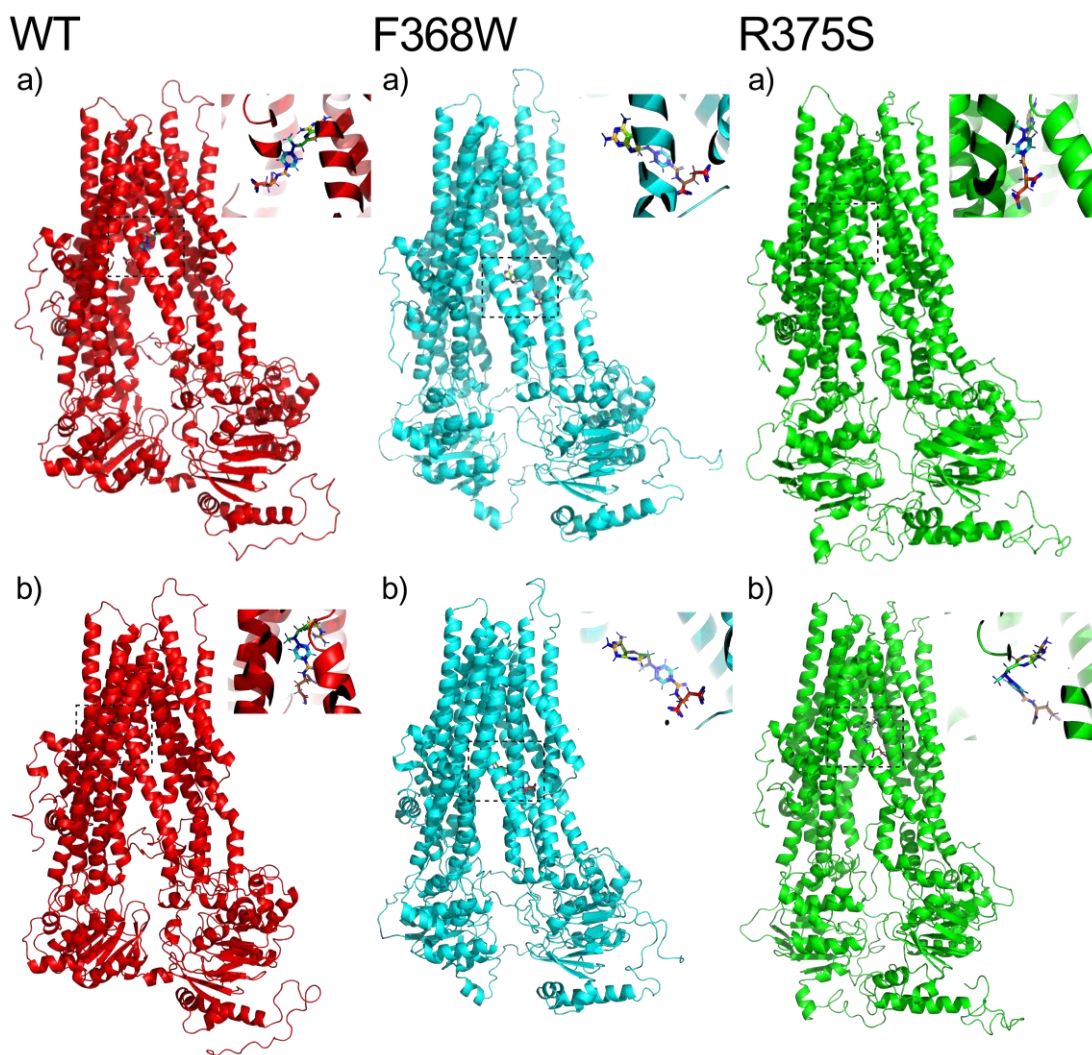


Figura 20. Estructuras MTX en complejo con MRP4 WT, F368W y R375S: antes (a) y después de la simulación AA-DM de 25 ns (b).

6.4.1.5. Complejos MRP4-MTX

Finalmente, en los complejos con MTX, el sitio de unión permaneció estable únicamente en la variante F368W. En MRP4 WT y R375S, sí se modificaron tras la simulación pasando de estar ubicado hacia el centro en MRP4 WT a la izquierda, y viceversa en la variante R375S (Figura 20).

La conformación adoptada por el MTX en MRP4 WT y F368W fue similar, presentando una curvatura en su estructura. En el modelo WT, el ligando se dobló hacia la derecha, mientras que en F368W lo hizo hacia la izquierda. En contraste, en R375S adoptó una conformación más relajada, con menor curvatura en comparación con los otros modelos.

En cuanto a las interacciones formadas, en el modelo MRP4 WT se observaron interacciones hidrofóbicas e hidrofílicas, además de una interacción tipo π - π con His152, un puente de hidrógeno y un puente salino con Arg998. En F368W se vieron interacciones hidrofóbicas y positivas, cinco puentes de hidrógeno con los residuos Arg262, dos con Arg317, Arg375, Tyr704 y Arg706, y dos puentes salinos con Arg262 y Arg317. Finalmente, en R375S se formaron cinco puentes de hidrógeno con Arg317, dos con Arg362 y dos con Gln849, además de un puente salino con Arg317 y una interacción tipo π - π con Trp995 (Figura 21).

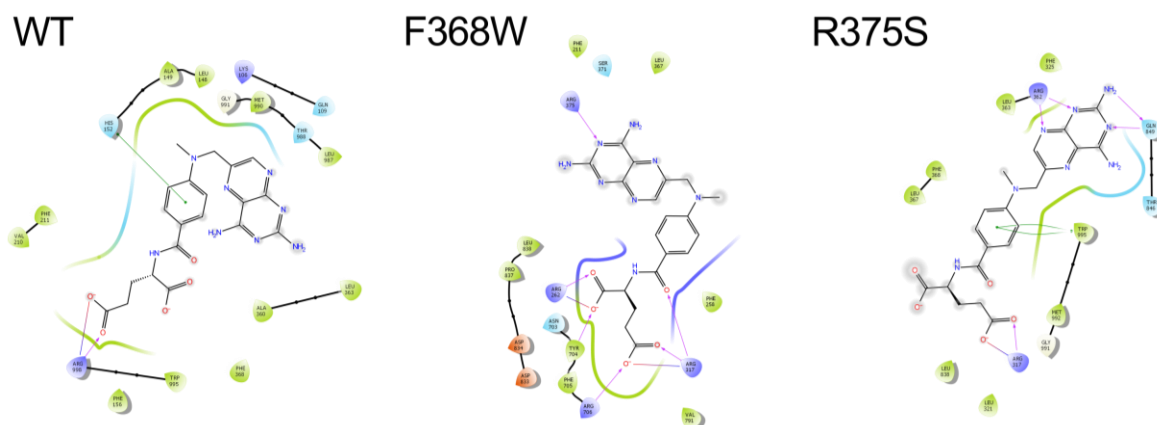


Figura 21. Diagramas de interacción MTX con MRP4 WT, F368W y R375S. Línea verde: región hidrofóbica, línea azul: región hidrofílica, línea morada: región positiva, línea roja con morado: puente salino, punto-línea-punto verde: interacción π - π , flecha rosa: puente de hidrogeno.

El sitio de unión para los sustratos endógenos, como se discutió anteriormente, parece estar más conservado y reconocer de manera más estable a sus ligandos, a diferencia de los fármacos, que mostraron mayores desplazamientos. Este comportamiento se respalda con el análisis de los valores de RMSD, los cuales, en el caso de los sustratos endógenos, se mantuvieron estables sin cambios abruptos, dentro de un rango de 2 Å (Anexo V).

Este patrón coincide con los resultados de los acoplamientos moleculares, donde el sitio de unión de los sustratos endógenos mostró menos movimiento tras la simulación y un mayor número de residuos compartidos entre los modelos y los ligandos. En contraste, los fármacos presentaron mayor variabilidad y menos residuos en común.

6.4.2. Simulaciones de dinámica molecular tipo *Umbrella Sampling*

Se realizaron simulaciones moleculares tipo *Umbrella Sampling* para determinar la afinidad teórica de los ligandos en los diferentes modelos y evaluar si se presentaban mejores o peores afinidades. Los valores de energía libre de Gibbs (ΔG) obtenidos permiten identificar qué ligandos muestran una mayor estabilidad en el sitio de unión. En este sentido, valores más negativos de indican una interacción más fuerte, mientras que valores más positivos sugieren una menor afinidad del ligando por la proteína.

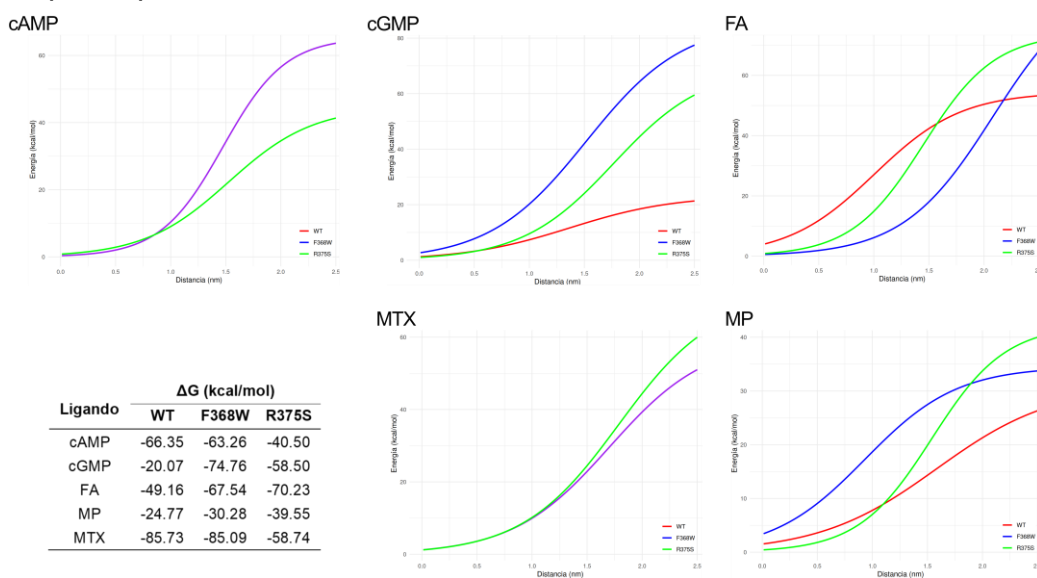


Figura 22. Energía libre de Gibbs y potenciales *Umbrella* de los ligandos seleccionados.

La Figura 22 muestra los potenciales Umbrella y los valores ΔG en kcal/mol para los cinco ligandos seleccionados en los tres modelos de MRP4. Se observa que cAMP presenta una disminución en su afinidad de unión en la variante R375S, en comparación con WT y F368W. Un comportamiento similar se observa en MTX, que mantiene valores similares en WT y F368W, pero muestra una notable reducción en R375S.

Por otro lado, cGMP tiene una diferencia significativa entre WT y las variantes mutantes, especialmente F368W. El FA y la MP presentan una tendencia similar, con valores de ΔG más negativos en las variantes mutantes que en WT, indicando una mayor estabilidad de unión en los mutantes.

En términos generales, las mutaciones afectan la afinidad de los ligandos de manera diferencial, fortaleciendo algunas interacciones y debilitando otras, lo que resalta la influencia de los cambios estructurales en la estabilidad de los complejo

7. CONCLUSIONES

A través de un enfoque basado en herramientas de química computacional, este estudio reveló que las mutaciones F368W y R375S en el transportador MRP4 generan alteraciones estructurales y funcionales significativas. Los modelos por homología y simulaciones de dinámica molecular mostraron que, mientras que la mutante F368W conserva una estructura similar a la WT, presenta una reducción en los movimientos de los dominios transmembranales 6 y 12. En contraste, la variante R375S adopta una conformación más compacta, con segmentos transmembranales estáticos, lo que sugiere una limitación en su flexibilidad estructural.

Los análisis de acoplamiento molecular evidenciaron diferencias clave en las interacciones ligando-proteína. Para la variante F368W, se detectaron modificaciones significativas en la afinidad por más del 50% de los fármacos evaluados, incluyendo el metotrexato, lo que indica una alteración en el transporte farmacológico mediado por MRP4. Por otro lado, la variante R375S presentó cambios más limitados, afectando solo a algunos ligandos específicos, como la leucovorina y la hidroclorotiazida.

Estos resultados confirman la relevancia mecánica de la fenilalanina 368 para la función de transporte diferencial de MRP4. Asimismo, resaltan la importancia de las interacciones estructurales mediadas por el residuo Arg375 en el mantenimiento de la actividad del transportador. Los hallazgos de este estudio subrayan el potencial de F368 como un sitio de interés para el diseño de inhibidores específicos con aplicaciones terapéuticas, especialmente en el contexto de la LLA-T y otras patologías asociadas a la quimiorresistencia.

Como una extensión natural de este trabajo, se plantea la generación de una línea celular Jurkat portadora de la mutación F368W en MRP4. Este modelo experimental permitirá evaluar *in vitro* cómo los cambios estructurales identificados impactan en la sensibilidad celular a fármacos como el metotrexato, así como en la dinámica intracelular de su acumulación.

8. REFERENCIAS

- Abla, N., Chinn, L. W., Nakamura, T., Liu, L., Huang, C. C., Johns, S. J., Kawamoto, M., Stryke, D., Taylor, T. R., Ferrin, T. E., Giacomini, K. M., & Kroetz, D. L. (2008). The Human Multidrug Resistance Protein 4 (MRP4, ABCC4): Functional Analysis of a Highly Polymorphic Gene. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 325(3), 859–868. <https://doi.org/10.1124/jpet.108.136523>
- UniProt Consortium. (2014). Activities at the Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Research*, 42(D1), D191–D198. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1140>
- Banerjee, M., Marensi, V., Conseil, G., Le, X. C., Cole, S. P. C., & Leslie, E. M. (2016). Polymorphic variants of MRP4/ABCC4 differentially modulate the transport of methylated arsenic metabolites and physiological organic anions. *Biochemical Pharmacology*, 120, 72–82. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.09.016>
- Becerra, E., Aguilera-Durán, G., Berumen, L., Romo-Mancillas, A., & 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*, 26(4), 1051. <https://doi.org/10.3390/molecules26041051>
- Beck, D. (2004). Methods for molecular dynamics simulations of protein folding/unfolding in solution. *Methods*, 34(1), 112–120. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2004.03.008>
- Berthier, J., Arnion, H., Saint-Marcoux, F., & Picard, N. (2019). Multidrug resistance-associated protein 4 in pharmacology: Overview of its contribution to pharmacokinetics, pharmacodynamics and pharmacogenetics. *Life Sciences*, 231, 116540. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.06.015>
- Borowicz, P., Chan, H., Medina, D., Gumpelmair, S., Kjelstrup, H., & Spurkland, A. (2020). A simple and efficient workflow for generation of knock-in mutations in Jurkat T cells using CRISPR/Cas9. *Scandinavian Journal of Immunology*, 91(4). <https://doi.org/10.1111/sji.12862>
- Brabetz, O., Alla, V., Angenendt, L., Schliemann, C., Berdel, W. E., Arteaga, M.-F., & Mikesch, J.-H. (2017). RNA-Guided CRISPR-Cas9 System-Mediated

- Engineering of Acute Myeloid Leukemia Mutations. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 6, 243–248. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2016.12.012>
- Brooks, B. R., Brooks, C. L., Mackerell, A. D., Nilsson, L., Petrella, R. J., Roux, B., Won, Y., Archontis, G., Bartels, C., Boresch, S., Caflisch, A., Caves, L., Cui, Q., Dinner, A. R., Feig, M., Fischer, S., Gao, J., Hodoscek, M., Im, W., ... Karplus, M. (2009). CHARMM: The biomolecular simulation program. *Journal of Computational Chemistry*, 30(10), 1545–1614. <https://doi.org/10.1002/jcc.21287>
- Brown, P. A., Shah, B., Advani, A., Aoun, P., Boyer, M. W., Burke, P. W., DeAngelo, D. J., Dinner, S., Fathi, A. T., Gauthier, J., Jain, N., Kirby, S., Liedtke, M., Litzow, M., Logan, A., Luger, S., Maness, L. J., Massaro, S., Mattison, R. J., ... Campbell, M. (2021). Acute Lymphoblastic Leukemia, Version 2.2021, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 19(9), 1079–1109. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2021.0042>
- Bussi, G., Donadio, D., & Parrinello, M. (2007). Canonical sampling through velocity rescaling. *The Journal of Chemical Physics*, 126(1). <https://doi.org/10.1063/1.2408420>
- Chen, Y., Wang, L., Hou, W. T., Zhou, C. Z., & Li, Q. (2023). *Cryo-EM structure of apo-form ABCC4*. <https://doi.org/10.2210/pdb8i4b/pdb>
- Chen, Y., Yuan, X., Xiao, Z., Jin, H., Zhang, L., & 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>
- Choi, R., Sohn, I., Kim, M., Woo, H. I., Lee, J. W., Ma, Y., Yi, E. S., Koo, H. H., & Lee, S. (2019). Pathway genes and metabolites in thiopurine therapy in Korean children with acute lymphoblastic leukaemia. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 85(7), 1585–1597. <https://doi.org/10.1111/bcp.13943>
- Chothia, C., & Lesk, A. M. (1986). The relation between the divergence of sequence and structure in proteins. *The EMBO Journal*, 5(4), 823–826. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1986.tb04288.x>
- Colunga-Pedraza, P. R., Gomez-Cruz, G. B., Colunga-Pedraza, J. E., & Ruiz-Argüelles, G. J. (2018). Geographic Hematology: Some Observations in

- Mexico. *Acta Haematologica*, 140(2), 114–120.
<https://doi.org/10.1159/000491989>
- Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P. D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L. A., & Zhang, F. (2013). Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. *Science*, 339(6121), 819–823.
<https://doi.org/10.1126/science.1231143>
- Dämgen, M. A., & Biggin, P. C. (2019). Computational methods to examine conformational changes and ligand-binding properties: Examples in neurobiology. *Neuroscience Letters*, 700, 9–16.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.03.004>
- Dong, Y., Shi, O., Zeng, Q., Lu, X., Wang, W., Li, Y., & Wang, Q. (2020). Leukemia incidence trends at the global, regional, and national level between 1990 and 2017. *Experimental Hematology & Oncology*, 9(1), 14.
<https://doi.org/10.1186/s40164-020-00170-6>
- El-Sheikh, A. A. K., van den Heuvel, J. J. M. W., Krieger, E., Russel, F. G. M., & Koenderink, J. B. (2008). Functional Role of Arginine 375 in Transmembrane Helix 6 of Multidrug Resistance Protein 4 (MRP4/ABCC4). *Molecular Pharmacology*, 74(4), 964–971. <https://doi.org/10.1124/mol.107.043661>
- Fan, T., Sun, G., Sun, X., Zhao, L., Zhong, R., & Peng, Y. (2019). Tumor Energy Metabolism and Potential of 3-Bromopyruvate as an Inhibitor of Aerobic Glycolysis: Implications in Tumor Treatment. *Cancers*, 11(3), 317.
<https://doi.org/10.3390/cancers11030317>
- Flórez, J., Armijo, J. A., & Mediavilla, A. (2014). *Farmacología humana* (6a ed.).
- Follini, E., Marchesini, M., & Roti, G. (2019). Strategies to Overcome Resistance Mechanisms in T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(12), 3021. <https://doi.org/10.3390/ijms20123021>
- Gioia, L., Siddique, A., Head, S. R., Salomon, D. R., & Su, A. I. (2018). A genome-wide survey of mutations in the Jurkat cell line. *BMC Genomics*, 19(1), 334.
<https://doi.org/10.1186/s12864-018-4718-6>
- Grinter, S., & Zou, X. (2014). Challenges, Applications, and Recent Advances of Protein-Ligand Docking in Structure-Based Drug Design. *Molecules*, 19(7), 10150–10176. <https://doi.org/10.3390/molecules190710150>

- Hareedy, M. S., El Desoky, E. S., Woillard, J.-B., Thabet, R. H., Ali, A. M., Marquet, P., & Picard, N. (2015). Genetic variants in 6-mercaptopurine pathway as potential factors of hematological toxicity in acute lymphoblastic leukemia patients. *Pharmacogenomics*, *16*(10), 1119–1134. <https://doi.org/10.2217/PGS.15.62>
- He, Q., Yan, Z., Si, F., Zhou, Y., Fu, W., & Chen, B. (2019). ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter Genes Involved in Pyrethroid Resistance in the Malaria Vector *Anopheles sinensis*: Genome-Wide Identification, Characteristics, Phylogenetics, and Expression Profile. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(6), 1409. <https://doi.org/10.3390/ijms20061409>
- Hernández-Castro, S. (2024). *Optimización por modelado molecular y obtención de carboxamidas como posibles inhibidores de la proteína MRP4*. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Hoelzer, D., Bassan, R., Dombret, H., Fielding, A., Ribera, J. M., & Buske, C. (2016). Acute lymphoblastic leukaemia in adult patients: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, *27*, v69–v82. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdw025>
- Huang, J., & MacKerell, A. D. (2013). CHARMM36 all-atom additive protein force field: Validation based on comparison to NMR data. *Journal of Computational Chemistry*, *34*(25), 2135–2145. <https://doi.org/10.1002/jcc.23354>
- Janke, D., Mehralivand, S., Strand, D., Gödtel-Armbrust, U., Habermeier, A., Gradhand, U., Fischer, C., Toliat, M. R., Fritz, P., Zanger, U. M., Schwab, M., Fromm, M. F., Nürnberg, P., Wojnowski, L., Closs, E. I., & Lang, T. (2008). 6-mercaptopurine and 9-(2-phosphonyl-methoxyethyl) adenine (PMEA) transport altered by two missense mutations in the drug transporter gene ABCC4. *Human Mutation*, *29*(5), 659–669. <https://doi.org/10.1002/humu.20694>
- Jha, P., Chaturvedi, S., Swastika, Pal, S., Jain, N., & Mishra, A. K. (2018). Improvising 5-HT₇ R homology model for design of high affinity ligands: model validation with docking, embrace minimization, MM-GBSA, and molecular dynamic simulations. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, *36*(10), 2475–2494. <https://doi.org/10.1080/07391102.2017.1359907>
- Jiang, F., & Doudna, J. A. (2017). CRISPR–Cas9 Structures and Mechanisms. *Annual Review of Biophysics*, *46*(1), 505–529. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-062215-010822>

- Jo, S., Kim, T., Iyer, V. G., & Im, W. (2008). CHARMM-GUI: A web-based graphical user interface for CHARMM. *Journal of Computational Chemistry*, 29(11), 1859–1865. <https://doi.org/10.1002/jcc.20945>
- Kästner, J. (2011). Umbrella sampling. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, 1(6), 932–942. <https://doi.org/10.1002/wcms.66>
- Kim, S., Chen, J., Cheng, T., Gindulyte, A., He, J., He, S., Li, Q., Shoemaker, B. A., Thiessen, P. A., Yu, B., Zaslavsky, L., Zhang, J., & Bolton, E. E. (2019). PubChem 2019 update: improved access to chemical data. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D1102–D1109. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1033>
- Krishnamurthy, P., Schwab, M., Takenaka, K., Nachagari, D., Morgan, J., Leslie, M., Du, W., Boyd, K., Cheok, M., Nakauchi, H., Marzolini, C., Kim, R. B., Poonkuzhali, B., Schuetz, E., Evans, W., Relling, M., & Schuetz, J. D. (2008). Transporter-Mediated Protection against Thiopurine-Induced Hematopoietic Toxicity. *Cancer Research*, 68(13), 4983–4989. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6790>
- Lee, J., Cheng, X., Swails, J. M., Yeom, M. S., Eastman, P. K., Lemkul, J. A., Wei, S., Buckner, J., Jeong, J. C., Qi, Y., Jo, S., Pande, V. S., Case, D. A., Brooks, C. L., MacKerell, A. D., Klauda, J. B., & Im, W. (2016). CHARMM-GUI Input Generator for NAMD, GROMACS, AMBER, OpenMM, and CHARMM/OpenMM Simulations Using the CHARMM36 Additive Force Field. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 12(1), 405–413. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00935>
- Liao, Q. (2020). *Enhanced sampling and free energy calculations for protein simulations* (pp. 177–213). <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2020.01.006>
- Liu, X. (2019). *ABC Family Transporters* (pp. 13–100). https://doi.org/10.1007/978-981-13-7647-4_2
- Lovell, S. C., Davis, I. W., Arendall, W. B., de Bakker, P. I. W., Word, J. M., Prisant, M. G., Richardson, J. S., & Richardson, D. C. (2003). Structure validation by C α geometry: ϕ, ψ and C β deviation. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 50(3), 437–450. <https://doi.org/10.1002/prot.10286>
- Mailloux, J., Medwid, S., Facey, A., Sung, I., Russell, L. E., Tirona, R. G., Kim, R. B., & Schwarz, U. I. (2022). In-vitro characterization of coding variants with predicted functional implications in the efflux transporter multidrug resistance

- protein 4 (MRP4, ABCC4). *Pharmacogenetics and Genomics*, 32(3), 111–116. <https://doi.org/10.1097/FPC.0000000000000459>
- Malard, F., & Mohty, M. (2020). Acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet*, 395(10230), 1146–1162. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)33018-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)33018-1)
- Mali, P., Yang, L., Esvelt, K. M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J. E., Norville, J. E., & Church, G. M. (2013). RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9. *Science*, 339(6121), 823–826. <https://doi.org/10.1126/science.1232033>
- Mansoori, B., Mohammadi, A., Davudian, S., Shirjang, S., & Baradaran, B. (2017). The Different Mechanisms of Cancer Drug Resistance: A Brief Review. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 7(3), 339–348. <https://doi.org/10.15171/apb.2017.041>
- McMahon, C. M., & Luger, S. M. (2019). Relapsed T Cell ALL: Current Approaches and New Directions. *Current Hematologic Malignancy Reports*, 14(2), 83–93. <https://doi.org/10.1007/s11899-019-00501-3>
- Mesrian-Tanha, H., Rahgozar, S., & Mojtabavi Naeini, M. (2017). ABCC4 functional SNP in the 3' splice acceptor site of exon 8 (G912T) is associated with unfavorable clinical outcome in children with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 80(1), 109–117. <https://doi.org/10.1007/s00280-017-3340-7>
- Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, 30(16), 2785–2791. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>
- Morris, G. M., & Lim-Wilby, M. (2008). *Molecular Docking* (pp. 365–382). https://doi.org/10.1007/978-1-59745-177-2_19
- Muhammed, M. T., & Aki-Yalcin, E. (2019). Homology modeling in drug discovery: Overview, current applications, and future perspectives. *Chemical Biology & Drug Design*, 93(1), 12–20. <https://doi.org/10.1111/cbdd.13388>
- National Comprehensive Cancer Network. (2023, julio 28). *NCCN Practice Guidelines in Oncology: Acute Lymphoblastic Leukemia. V.1.2018*. www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/all.pdf.
- Nikolaev, D. M., Shtyrov, A. A., Panov, M. S., Jamal, A., Chakchir, O. B., Kochemirovsky, V. A., Olivucci, M., & Ryazantsev, M. N. (2018). A

Comparative Study of Modern Homology Modeling Algorithms for Rhodopsin Structure Prediction. *ACS Omega*, 3(7), 7555–7566.
<https://doi.org/10.1021/acsomega.8b00721>

- Oshima, K., Zhao, J., Pérez-Durán, P., Brown, J. A., Patiño-Galindo, J. A., Chu, T., Quinn, A., Gunning, T., Belver, L., Ambesi-Impiombato, A., Tosello, V., Wang, Z., Sulis, M. L., Kato, M., Koh, K., Paganin, M., Basso, G., Balbin, M., Nicolas, C., ... Ferrando, A. (2020). Mutational and functional genetics mapping of chemotherapy resistance mechanisms in relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Nature Cancer*, 1(11), 1113–1127. <https://doi.org/10.1038/s43018-020-00124-1>
- Parrinello, M., & Rahman, A. (1981). Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. *Journal of Applied Physics*, 52(12), 7182–7190. <https://doi.org/10.1063/1.328693>
- Patel, A. A., Thomas, J., Rojek, A. E., & Stock, W. (2020). Biology and Treatment Paradigms in T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia in Older Adolescents and Adults. *Current Treatment Options in Oncology*, 21(7), 57. <https://doi.org/10.1007/s11864-020-00757-5>
- Pérez De Marcos, J.-C., Pérez Pineda, P.-L., Méndez Morales, S.-T., Arellano Mendoza, M.-G., & 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>
- Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., & Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols*, 8(11), 2281–2308. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.143>
- Santos-Martins, D., Solis-Vasquez, L., Tillack, A. F., Sanner, M. F., Koch, A., & Forli, S. (2021). Accelerating A <sc>uto</sc> D <sc>ock</sc> 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>
- PyMOL; Schrödinger Inc. (2015). *Schrödinger Inc. The PyMOL Molecular Graphics System; Version 2; Schrödinger Inc.: New York, NY, USA.*
- Maestro; Schrödinger Inc. (2019). *Schrödinger. Schrödinger Release 2019-3: Maestro; Schrödinger Inc.: New York, NY, USA.*

- Schuetz, J. D., Connelly, M. C., Sun, D., Paibir, S. G., Flynn, P. M., Srinivas, R. V., Kumar, A., & Fridland, A. (1999). MRP4: A previously unidentified factor in resistance to nucleoside-based antiviral drugs. *Nature Medicine*, 5(9), 1048–1051. <https://doi.org/10.1038/12487>
- Shiraz, P., Jehangir, W., & Agrawal, V. (2021). T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia—Current Concepts in Molecular Biology and Management. *Biomedicines*, 9(11), 1621. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9111621>
- Singh, A., Thakur, M., Singh, S. K., Sharma, L. K., & Chandra, K. (2020). Exploring the effect of nsSNPs in human YPEL3 gene in cellular senescence. *Scientific Reports*, 10(1), 15301. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72333-8>
- Sobolev, O. V., Afonine, P. V., Moriarty, N. W., Hekkelman, M. L., Joosten, R. P., Perrakis, A., & Adams, P. D. (2020). A Global Ramachandran Score Identifies Protein Structures with Unlikely Stereochemistry. *Structure*, 28(11), 1249–1258.e2. <https://doi.org/10.1016/j.str.2020.08.005>
- Szlasa, W., Zendran, I., Zalesińska, A., Tarek, M., & Kulbacka, J. (2020). Lipid composition of the cancer cell membrane. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 52(5), 321–342. <https://doi.org/10.1007/s10863-020-09846-4>
- Tan, S. H., Bertulfo, F. C., & Sanda, T. (2017). Leukemia-Initiating Cells in T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Frontiers in Oncology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00218>
- Tanaka, Y., Manabe, A., Fukushima, H., Suzuki, R., Nakadate, H., Kondoh, K., Nakamura, K., Koh, K., Fukushima, T., Tsuchida, M., Koike, K., Kiyokawa, N., Noguchi, E., Sumazaki, R., & Komiyama, T. (2015). Multidrug resistance protein 4 (MRP4) polymorphisms impact the 6-mercaptopurine dose tolerance during maintenance therapy in Japanese childhood acute lymphoblastic leukemia. *The Pharmacogenomics Journal*, 15(4), 380–384. <https://doi.org/10.1038/tpj.2014.74>
- Tanaka, Y., Nakadate, H., Kondoh, K., Nakamura, K., Koh, K., & Manabe, A. (2018). Interaction between NUDT15 and ABCC4 variants enhances intolerability of 6-mercaptopurine in Japanese patients with childhood acute lymphoblastic leukemia. *The Pharmacogenomics Journal*, 18(2), 275–280. <https://doi.org/10.1038/tpj.2017.12>
- Tsukamoto, M., Sato, S., Satake, K., Miyake, M., & Nakagawa, H. (2017). Quantitative Evaluation of Drug Resistance Profile of Cells Expressing Wild-

- Type or Genetic Polymorphic Variants of the Human ABC Transporter ABCC4. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(7), 1435. <https://doi.org/10.3390/ijms18071435>
- Tsukamoto, M., Yamashita, M., Nishi, T., & Nakagawa, H. (2019). A Human ABC Transporter ABCC4 Gene SNP (rs11568658, 559 G > T, G187W) Reduces ABCC4-Dependent Drug Resistance. *Cells*, 8(1), 39. <https://doi.org/10.3390/cells8010039>
- Tzoneva, G., Dieck, C. L., Oshima, K., Ambesi-Impiombato, A., Sánchez-Martín, M., Madubata, C. J., Khiabani, H., Yu, J., Waanders, E., Iacobucci, I., Sulis, M. L., Kato, M., Koh, K., Paganin, M., Basso, G., Gastier-Foster, J. M., Loh, M. L., Kirschner-Schwabe, R., Mullighan, C. G., ... Ferrando, A. A. (2018). Clonal evolution mechanisms in NT5C2 mutant-relapsed acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*, 553(7689), 511–514. <https://doi.org/10.1038/nature25186>
- Van Der Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B., Groenhof, G., Mark, A. E., & Berendsen, H. J. C. (2005). GROMACS: Fast, flexible, and free. *Journal of Computational Chemistry*, 26(16), 1701–1718. <https://doi.org/10.1002/jcc.20291>
- Villanueva, R. A. M., & Chen, Z. J. (2019). ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis (2nd ed.). *Measurement: Interdisciplinary Research and Perspectives*, 17(3), 160–167. <https://doi.org/10.1080/15366367.2019.1565254>
- Wallach, D., Makowski, D., Jones, J. W., & Brun, F. (2014). The R Programming Language and Software. En *Working with Dynamic Crop Models* (pp. 71–117). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397008-4.00003-4>
- Wang, Q., Chen, S., Xiao, Q., Liu, Z., Liu, S., Hou, P., Zhou, L., Hou, W., Ho, W., Li, C., Wu, L., & Guo, D. (2017). Genome modification of CXCR4 by *Staphylococcus aureus* Cas9 renders cells resistance to HIV-1 infection. *Retrovirology*, 14(1), 51. <https://doi.org/10.1186/s12977-017-0375-0>
- Wang, X., Zhang, H., & Chen, X. (2019). Drug resistance and combating drug resistance in cancer. *Cancer Drug Resistance*. <https://doi.org/10.20517/cdr.2019.10>
- Ward, R. A., Fawell, S., Floc'H, N., Flemington, V., McKerrecher, D., & Smith, P. D. (2021). Challenges and Opportunities in Cancer Drug Resistance. *Chemical Reviews*, 121(6), 3297–3351. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00383>

- Wittgen, H. G. M., van den Heuvel, J. J. M. W., Krieger, E., Schaftenaar, G., Russel, F. G. M., & 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>
- Wojtuszkiewicz, A., Peters, G. J., van Woerden, N. L., Dubbelman, B., Escherich, G., Schmiegelow, K., Sonneveld, E., Pieters, R., van de Ven, P. M., Jansen, G., Assaraf, Y. G., Kaspers, G. J. L., & Cloos, J. (2015). Methotrexate resistance in relation to treatment outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Hematology & Oncology*, *8*(1), 61. <https://doi.org/10.1186/s13045-015-0158-9>
- Xiang, Z. (2006). Advances in Homology Protein Structure Modeling. *Current Protein & Peptide Science*, *7*(3), 217–227. <https://doi.org/10.2174/138920306777452312>
- Xu, W.-X., Li, Y., & Zhang, J. Z. H. (2012). Calculation of Collective Variable-based PMF by Combining WHAM with Umbrella Sampling. *Chinese Physics Letters*, *29*(6), 068702. <https://doi.org/10.1088/0256-307X/29/6/068702>
- Xu, X., Huang, M., & Zou, X. (2018). Docking-based inverse virtual screening: methods, applications, and challenges. *Biophysics Reports*, *4*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1007/s41048-017-0045-8>
- Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., & Zhang, Y. (2015). The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nature Methods*, *12*(1), 7–8. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3213>
- Yao, R., Liu, D., Jia, X., Zheng, Y., Liu, W., & Xiao, Y. (2018). CRISPR-Cas9/Cas12a biotechnology and application in bacteria. *Synthetic and Systems Biotechnology*, *3*(3), 135–149. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2018.09.004>
- Yates, C. M., & Sternberg, M. J. E. (2013). The Effects of Non-Synonymous Single Nucleotide Polymorphisms (nsSNPs) on Protein–Protein Interactions. *Journal of Molecular Biology*, *425*(21), 3949–3963. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.07.012>
- Zhan, T., Rindtorff, N., Betge, J., Ebert, M. P., & Boutros, M. (2019). CRISPR/Cas9 for cancer research and therapy. *Seminars in Cancer Biology*, *55*, 106–119. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2018.04.001>

- Zheng, L., Alhossary, A. A., Kwoh, C.-K., & Mu, Y. (2019). Molecular Dynamics and Simulation. En *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology* (pp. 550–566). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20284-7>
- Zhou, B., Lin, W., Long, Y., Yang, Y., Zhang, H., Wu, K., & Chu, Q. (2022). Notch signaling pathway: architecture, disease, and therapeutics. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1), 95. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00934-y>
- Zhou, X., Zheng, W., Li, Y., Pearce, R., Zhang, C., Bell, E. W., Zhang, G., & Zhang, Y. (2022). I-TASSER-MTD: a deep-learning-based platform for multi-domain protein structure and function prediction. *Nature Protocols*, 17(10), 2326–2353. <https://doi.org/10.1038/s41596-022-00728-0>

9. ANEXOS

Anexo I. Tamaño sistemas para dinámicas moleculares *all-atom*.

Tabla I.I. Tamaño sistemas MRP4 WT y sus variantes para AA-DM de 200 ns.

	WT		F368W		R375S	
	Monocapa		Monocapa		Monocapa	
	Superior	Inferior	Superior	Inferior	Superior	Inferior
Área proteína	1362.21	2085.00	1347.90	2057.51	1346.20	2097.13
Área lípidos	13715.3	12977.5	13715.3	12977.5	13715.3	12977.5
# de lípidos	240	227	240	227	240	227
Área total	15077.51	15062.50	15063.20	15035.01	15061.50	15074.63
Extensión de la proteína en X	59.72		57.39		55.88	
Extensión de la proteína en Y	42.02		40.85		37.74	
Área promedio	15070.00		15049.10		15068.07	
A	122.76		122.67		122.75	
B	122.76		122.67		122.75	

Tabla I.II. Tamaño sistemas del complejo proteína-cAMP de MRP4 WT y sus variantes para AA-DM de 25 ns.

	WT		F368W		R375S	
	Monocapa		Monocapa		Monocapa	
	Superior	Inferior	Superior	Inferior	Superior	Inferior
Área proteína	1409.00	2090.90	1321.54	2150.25	1428.34	2481.21
Área lípidos	10697.7	10017.8	12000.8	11145.2	12184.0	11145.2
# de lípidos	192	180	211	196	214	196
Área total	12106.70	12108.70	13322.34	13295.45	13612.34	13626.41
Extensión de la proteína en X	49.62		49.76		52.74	
Extensión de la proteína en Y	42.91		44.03		47.16	
Área promedio	12107.70		13308.90		13619.38	
A	110.03		115.36		116.70	
B	110.03		115.36		116.70	

Tabla I.III. Tamaño sistemas del complejo proteína-cGMP de MRP4 WT y sus variantes para AA-DM de 25 ns.

	WT		F368W		R375S	
	Monocapa		Monocapa		Monocapa	
	Superior	Inferior	Superior	Inferior	Superior	Inferior
Área proteína	1409.00	2090.90	1321.54	2150.25	1428.34	2481.21
Área lípidos	11892.5	11185.2	12000.8	11145.2	12184.0	11145.2
# de lípidos	209	197	211	196	214	196
Área total	13301.50	13276.10	13322.34	13295.45	13612.34	13626.41
Extensión de la proteína en X	49.62		49.78		52.75	
Extensión de la proteína en Y	42.91		44.05		47.16	
Área promedio	13288.80		13308.90		13619.38	
A	115.28		115.36		116.70	
B	115.28		115.36		116.70	

Tabla I.IV. Tamaño sistemas del complejo proteína-FA de MRP4 WT y sus variantes para AA-DM de 25 ns.

	WT		F368W		R375S	
	Monocapa		Monocapa		Monocapa	
	Superior	Inferior	Superior	Inferior	Superior	Inferior
Área proteína	1409.06	2130.93	1321.54	2200.23	1428.34	2487.73
Área lípidos	11892.5	11145.2	12000.8	11145.2	12184.0	11145.2
# de lípidos	209	196	211	196	214	196
Área total	13301.56	13276.13	13322.34	13345.43	13612.34	13632.93
Extensión de la proteína en X	49.62		49.78		52.77	
Extensión de la proteína en Y	42.90		44.04		47.19	
Área promedio	13288.84		13333.88		13622.63	
A	115.28		115.47		116.72	
B	115.28		115.47		116.72	

Tabla I.V. Tamaño sistemas del complejo proteína-MP de MRP4 WT y sus variantes para AA-DM de 25 ns.

	WT		F368W		R375S	
	Monocapa		Monocapa		Monocapa	
	Superior	Inferior	Superior	Inferior	Superior	Inferior
Área proteína	1408.26	2090.51	1321.54	2150.25	1428.34	2492.64
Área lípidos	11892.5	11185.2	12000.8	11185.2	12184.0	11145.2
# de lípidos	209	197	211	197	214	196
Área total	13300.76	13275.71	13322.34	13335.45	13612.34	13637.84
Extensión de la proteína en X	49.58		49.76		52.74	
Extensión de la proteína en Y	42.90		44.03		47.15	
Área promedio	13288.24		13328.90		13625.09	
A	115.27		115.45		116.73	
B	115.27		115.45		116.73	

Tabla I.VI. Tamaño sistemas del complejo proteína-MTX de MRP4 WT y sus variantes para AA-DM de 25 ns.

	WT		F368W		R375S	
	Monocapa		Monocapa		Monocapa	
	Superior	Inferior	Superior	Inferior	Superior	Inferior
Área proteína	1413.09	2134.05	1321.54	2155.85	1428.34	2492.64
Área lípidos	11892.5	11145.2	12000.8	11145.2	12184.0	11145.2
# de lípidos	209	196	211	196	214	196
Área total	13305.59	13279.25	13322.34	13301.05	13612.34	13637.84
Extensión de la proteína en X	52.26		49.76		52.74	
Extensión de la proteína en Y	41.27		44.02		47.15	
Área promedio	13293.42		13311.70		13625.09	
A	115.29		115.38		116.73	
B	115.29		115.38		116.73	

Tabla I.VII. Tamaño sistemas del complejo proteína-cAMP de MRP4 WT y sus variantes para AA-DM de 5 ns previa a dinámica *Umbrella Sampling*.

	WT		F368W		R375S	
	Monocapa		Monocapa		Monocapa	
	Superior	Inferior	Superior	Inferior	Superior	Inferior
Área proteína	1410.42	2115.56	1315.76	2155.85	1506.76	2472.63
Área lípidos	11892.5	11212.6	14595.5	11145.2	12076.6	11145.2
# de lípidos	209	197	256	196	212	196
Área total	13302.92	13328.16	15911.26	13301.05	13583.36	13617.83
Extensión de la proteína en X	46.68		62.25		48.29	
Extensión de la proteína en Y	43.01		43.13		41.68	
Área promedio	13315.54		15899.78		13600.60	
A	115.39		126.09		116.62	
B	115.39		126.09		116.62	

Tabla I.VIII. Tamaño sistemas del complejo proteína-cGMP de MRP4 WT y sus variantes para AA-DM de 5 ns previa a dinámica *Umbrella Sampling*.

	WT		F368W		R375S	
	Monocapa		Monocapa		Monocapa	
	Superior	Inferior	Superior	Inferior	Superior	Inferior
Área proteína	1377.09	2127.76	1365.42	2254.83	1431.95	2279.86
Área lípidos	11892.5	11145.2	14404.7	13524.8	11960.8	11145.2
# de lípidos	209	196	253	238	210	196
Área total	13269.59	13272.96	15770.12	15779.63	13392.75	13425.06
Extensión de la proteína en X	48.06		61.73		55.54	
Extensión de la proteína en Y	41.55		45.98		41.96	
Área promedio	13271.28		15774.87		13408.90	
A	115.20		125.60		115.80	
B	115.20		125.60		115.80	

Tabla I.IX. Tamaño sistemas del complejo proteína-FA de MRP4 WT y sus variantes para AA-DM de 5 ns previa a dinámica *Umbrella Sampling*.

	WT		F368W		R375S	
	Monocapa		Monocapa		Monocapa	
	Superior	Inferior	Superior	Inferior	Superior	Inferior
Área proteína	1407.09	2194.30	1336.19	2130.00	1395.53	2292.62
Área lípidos	11892.5	11145.2	11960.8	11145.2	12021.2	11145.2
# de lípidos	209	196	210	196	211	196
Área total	13299.59	13339.50	13296.99	13275.20	13416.73	13437.82
Extensión de la proteína en X	52.37		54.91		48.84	
Extensión de la proteína en Y	42.71		42.46		41.73	
Área promedio	13319.54		13286.09		13427.28	
A	115.41		115.27		115.88	
B	115.41		115.27		115.88	

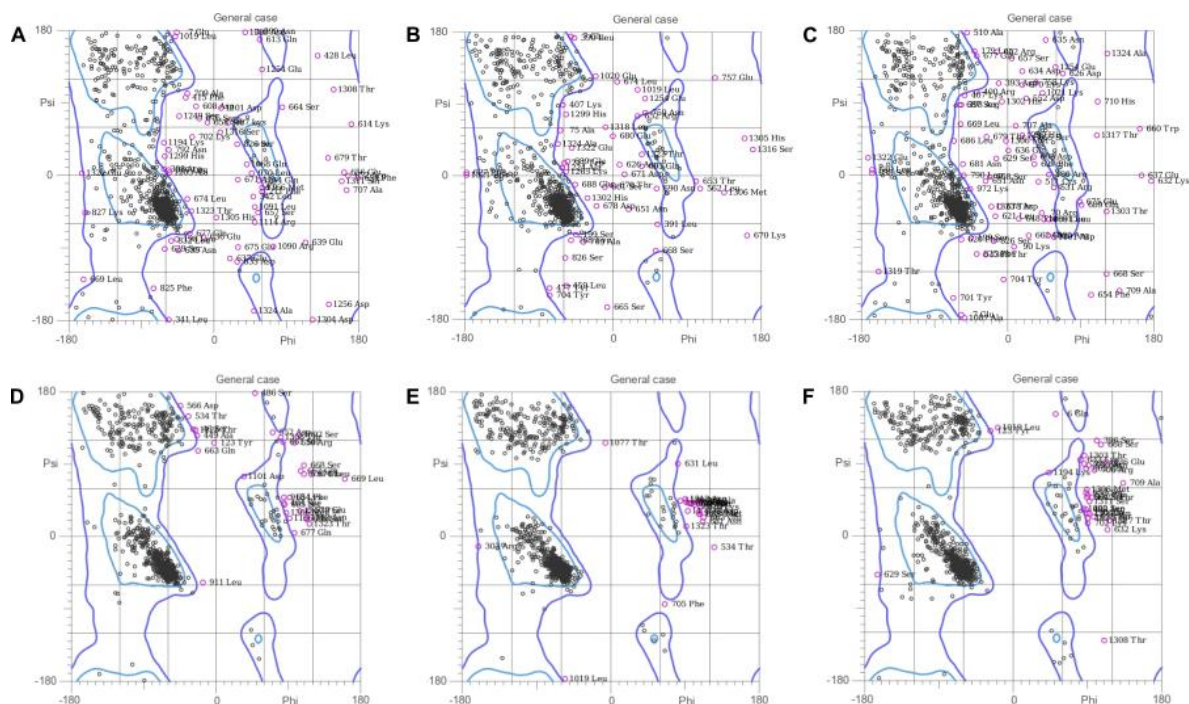
Tabla I.X. Tamaño sistemas del complejo proteína-MP de MRP4 WT y sus variantes para AA-DM de 5 ns previa a dinámica *Umbrella Sampling*.

	WT		F368W		R375S	
	Monocapa		Monocapa		Monocapa	
	Superior	Inferior	Superior	Inferior	Superior	Inferior
Área proteína	1629.97	2287.69	1390.90	2215.32	1483.54	2592.66
Área lípidos	10926.1	10239.2	11960.8	11145.2	12257.5	11145.2
# de lípidos	193	181	210	196	215	196
Área total	12556.07	12526.89	13351.70	13360.52	13741.04	13737.86
Extensión de la proteína en X	40.94		49.03		45.23	
Extensión de la proteína en Y	50.31		42.48		42.92	
Área promedio	12541.48		13356.11		13739.45	
A	111.99		115.57		117.22	
B	111.99		115.57		117.22	

Tabla I.XI. Tamaño sistemas del complejo proteína-MTX de MRP4 WT y sus variantes para AA-DM de 5 ns previa a dinámica *Umbrella Sampling*.

	WT		F368W		R375S	
	Monocapa		Monocapa		Monocapa	
	Superior	Inferior	Superior	Inferior	Superior	Inferior
Área proteína	1413.01	2133.72	1528.17	2375.03	1392.11	2210.12
Área lípidos	11852.5	11145.2	11960.8	11145.2	11955.0	11139.4
# de lípidos	208	196	210	196	210	196
Área total	13265.51	13278.91	13488.97	13520.22	13347.11	13349.52
Extensión de la proteína en X	52.25		44.82		51.71	
Extensión de la proteína en Y	41.27		44.20		37.41	
Área promedio	13272.22		13504.60		13348.31	
A	115.21		116.21		115.53	
B	115.21		116.21		115.53	

Anexo II. Diagramas de Ramachandran de los modelos de MRP4.



A) WT-MH, B) F368W-MH, C) R375S-MH, D) WT-MR, E) F368W-MR y F) R375S-MR.
MH: modelo por homología; MR: modelo relajado.

Anexo III. *Docking score* expresados en kcal/mol de la conformación BC de los sustratos endógenos (a) y fármacos (b) en los modelos MRP4 WT, F368W y R375S.

	WT	F368W	R375S		WT	F368W	R375S
a)				b)	MP	-4.98	-4.53
	GA	-2.71	-3.58		ADV	-5.24	-4.21*
	UA	-5.52	-4.87		TFV	-4.39	-3.00*
	cAMP	-5.39	-5.8		LV	-5.67	-6.95
	PEG2	-6.65	-6.76		HCTZ	-6.01	-6.90
	LTB4	-6.43	-7.64*		TOP	-6.87	-7.74
	cGMP	-6.85	-6.47		DXP	-6.79	-6.11
	CA	-7.91	-8.05		AZA	-5.42	-4.21
	PEG1	-7.02	-6.45		MTX	-4.73	-7.15
	FA	-7.94	-8.71		SN38	-6.85	-6.92
	E17bG	-9.3	-8.39		CTX	-6.90	-6.54
	TA	-10.44	-10.2		FS	-6.14	-8.26
					DHEA	-7.83	-6.96
					CFZ	-7.61	-7.28
					OM	-7.60	

*Representa más de ± 1 kcal/mol de diferencia en el DS comparado con el modelo WT.

Anexo IV. Estructuras cAMP, cGMP y FA en complejo con MRP4 WT, F368W y R375S antes y después de la simulación AA-DM de 25 ns.

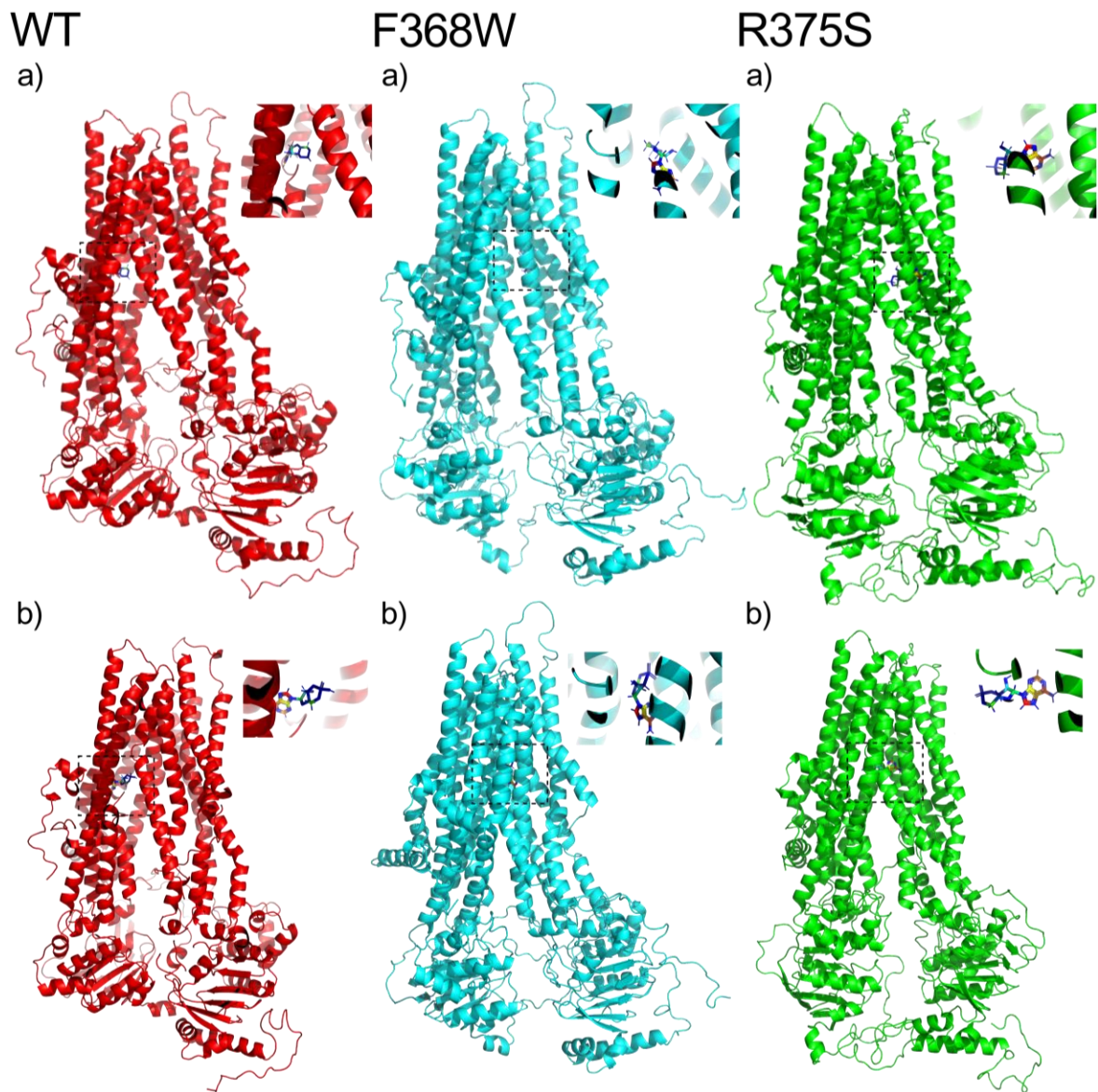


Figura IV.I. Estructuras cAMP en complejo con MRP4 WT, F368W y R375S: antes (a) y después de la simulación AA-DM de 25 ns (b).

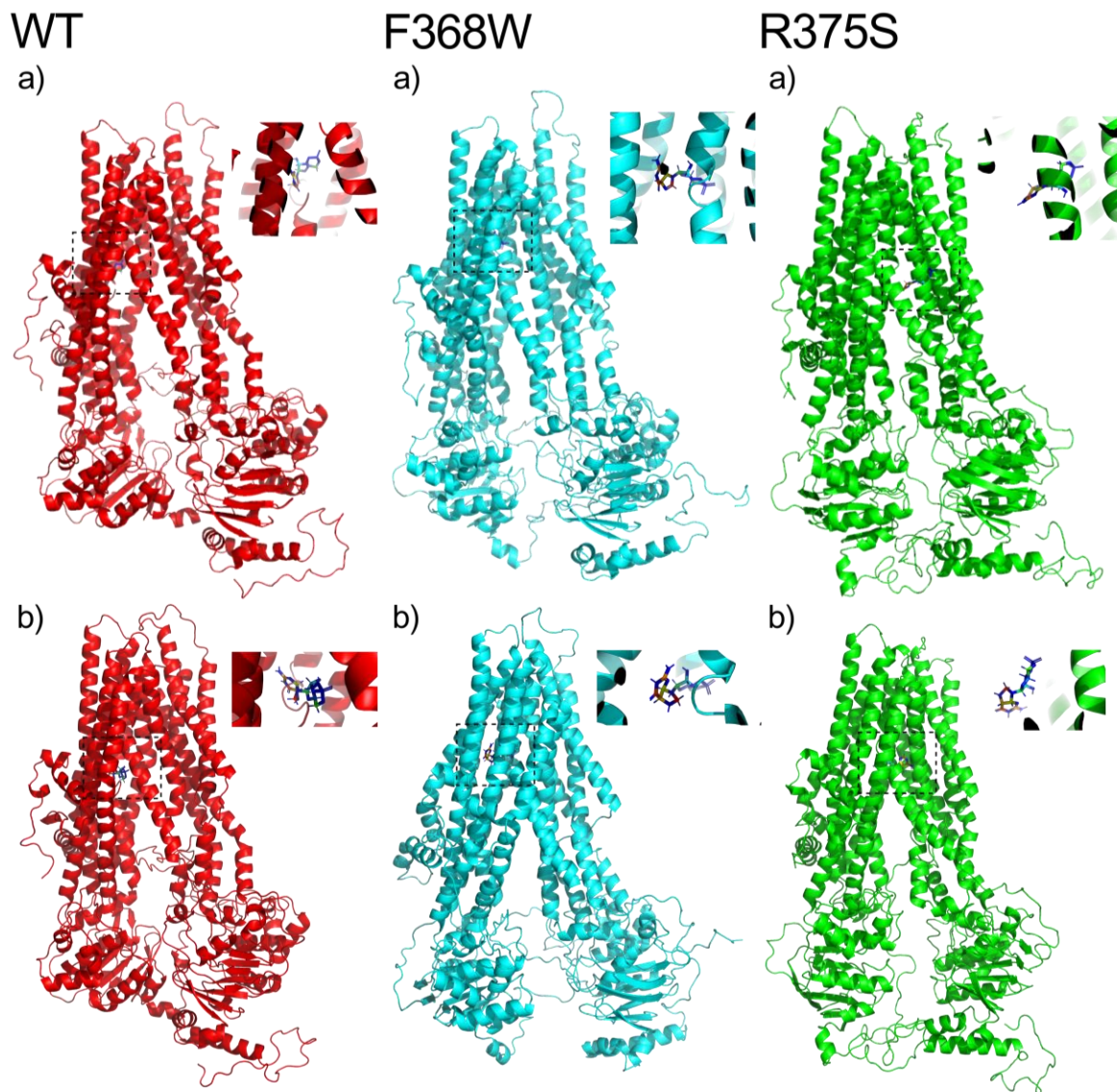


Figura IV.II. Estructuras cGMP en complejo con MRP4 WT, F368W y R375S: antes (a) y después de la simulación AA-DM de 25 ns (b).

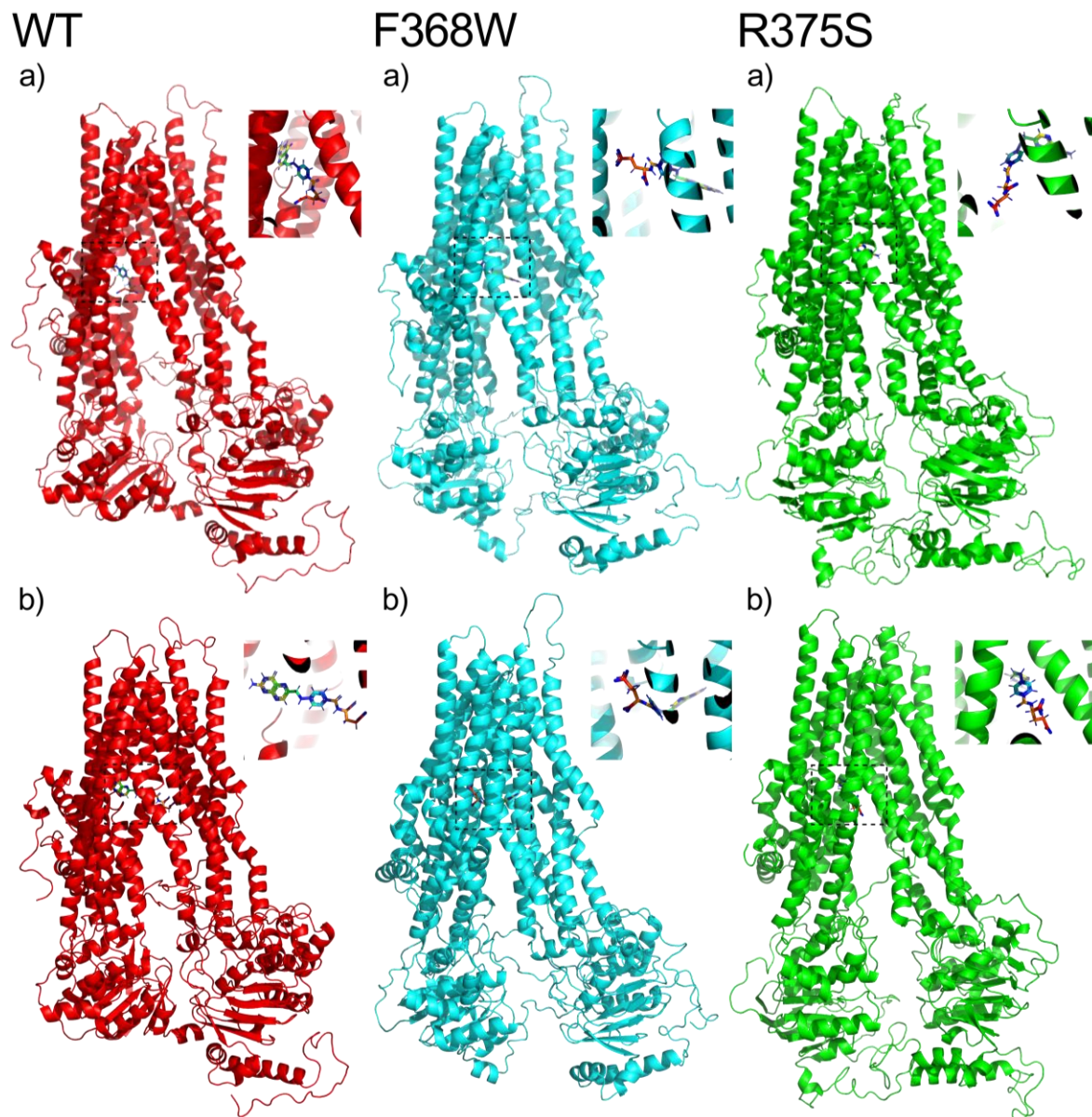
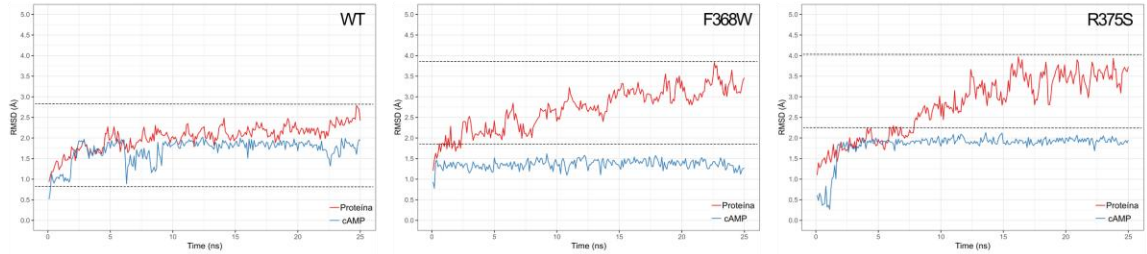


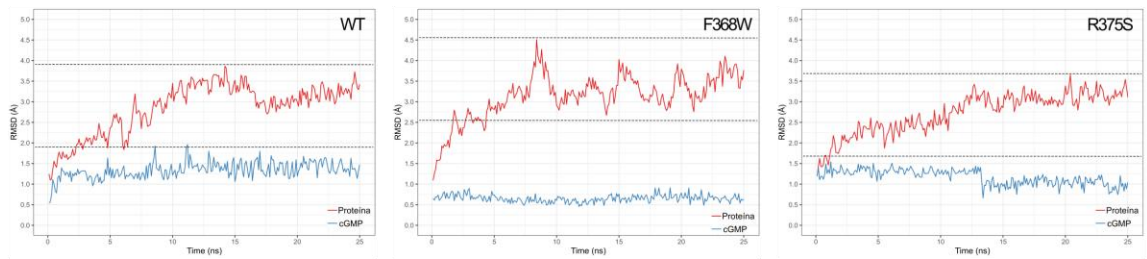
Figura IV.III. Estructuras FA en complejo con MRP4 WT, F368W y R375S: antes (a) y después de la simulación AA-DM de 25 ns (b).

Anexo V. Diagramas RMSD de los ligandos cAMP, cGMP, FA, MTX y MP en complejo con MRP4 WT y sus variantes durante la simulación AA-DM de 25 ns.

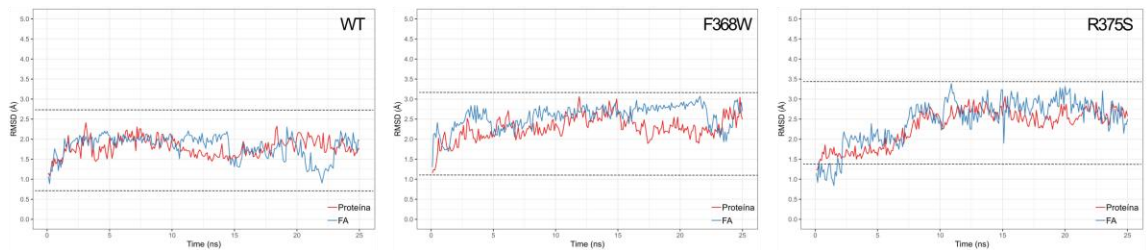
cAMP



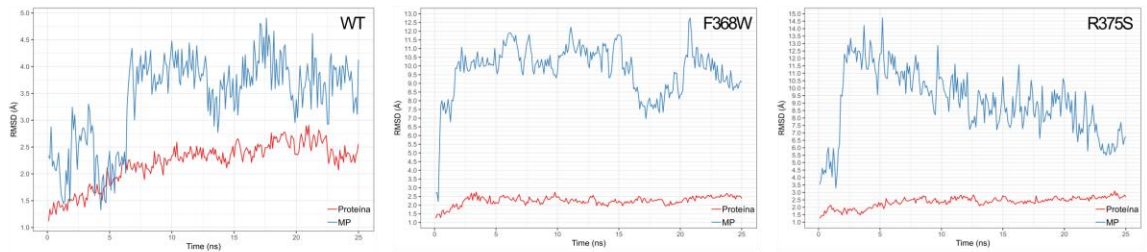
cGMP



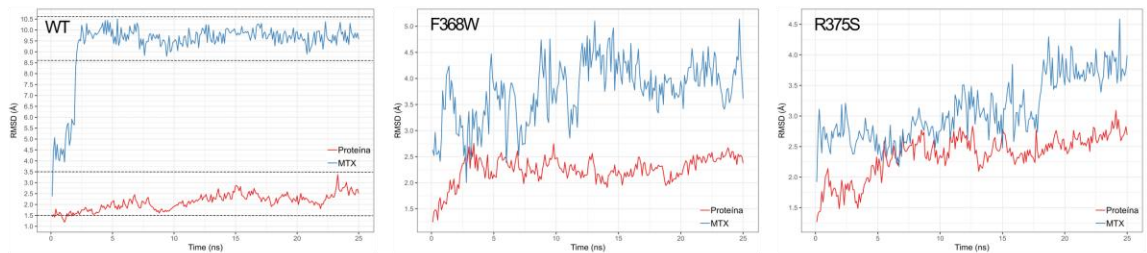
FA



MP

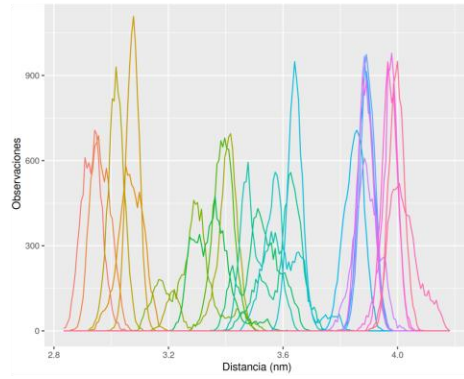


MTX

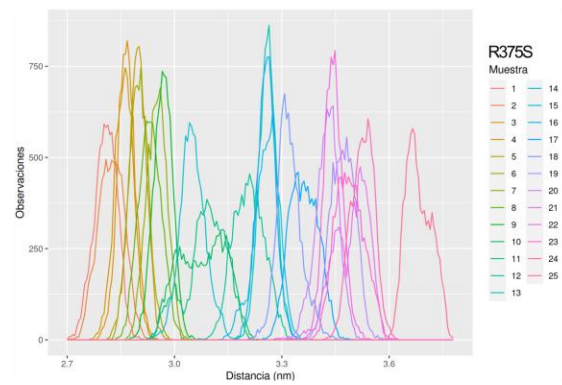
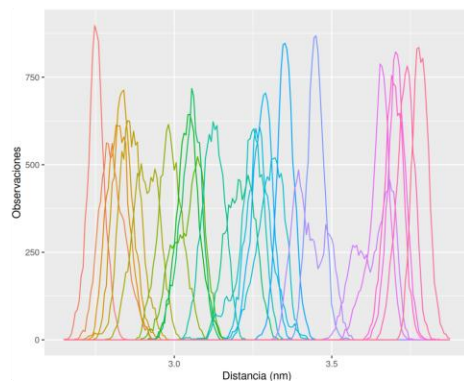
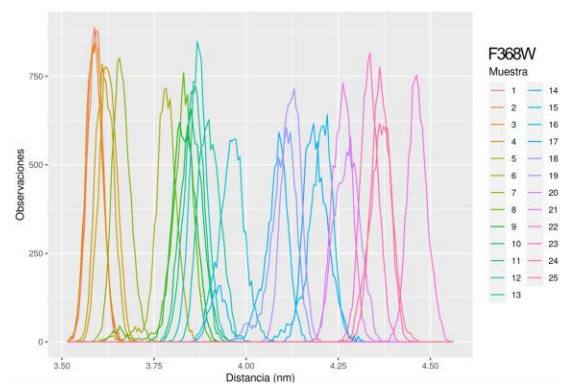
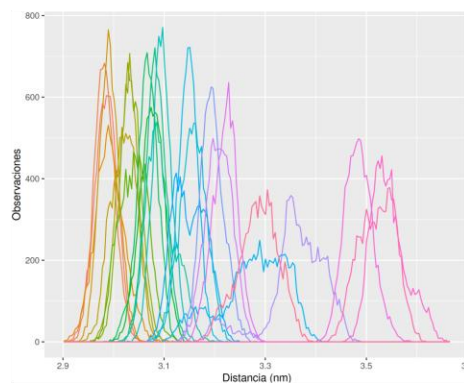
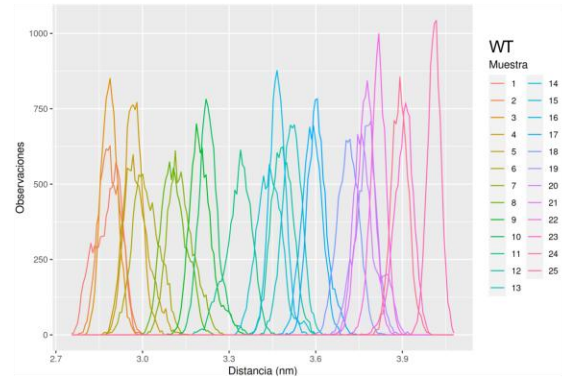


Anexo VI. Histogramas de *Umbrella Sampling* para los ligandos seleccionados.

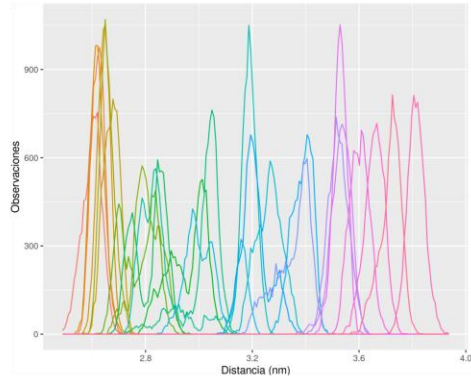
cAMP



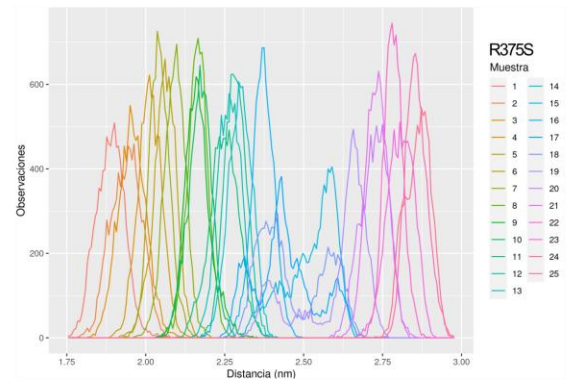
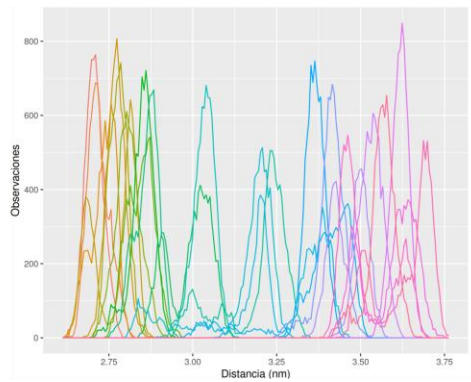
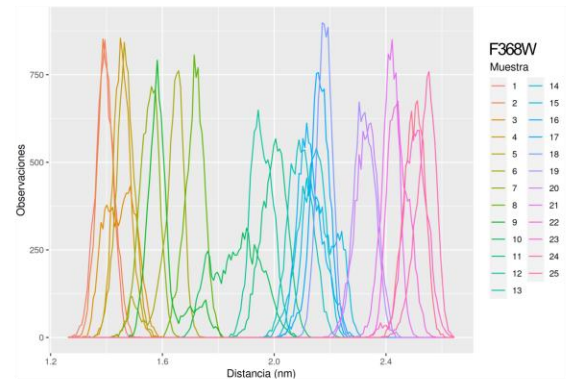
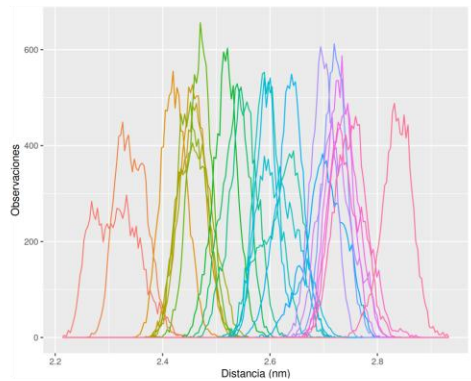
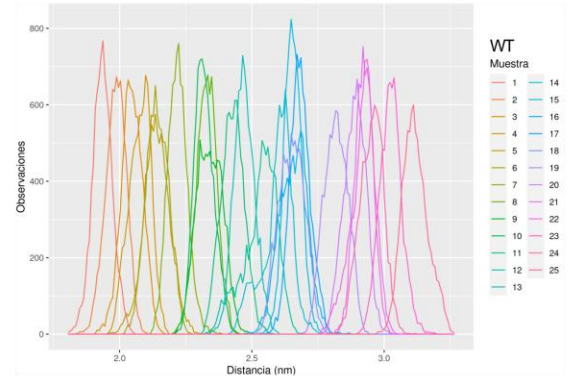
cGMP



FA



MP



MTX

