



**Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química**

Optimización por modelado molecular y obtención de
carboxamidas como posibles inhibidores de la proteína
MRP4

Tesis

Que como parte de los requisitos para
obtener el grado de

Maestría en Ciencias Químico Biológicas

Presenta

LDMNQ Stephanie Hernández Castro

Dirigido por:

Dr. Rubén Antonio Romo Mancillas

Co-Director:

Dr. Edgardo Becerra Becerra

Querétaro, Qro. Enero 2024



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales
de Información



Optimización por modelado molecular y obtención de
carboxamidas como posibles inhibidores de la
proteína MRP4

por

Stephanie Hernández Castro

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional](#).

Clave RI: FQMAC-309154



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría Ciencias Químico Biológicas

Optimización por modelado molecular y obtención de
carboxamidas como posibles inhibidores de la proteína
MRP4

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Maestro en Ciencias Químico Biológicas

Presenta

LDMNQ Stephanie Hernández Castro

Dirigido por:

Dr. Rubén Antonio Romo Mancillas

Co-dirigido por:

Dr. Edgardo Becerra Becerra

COMITÉ TUTORAL

Dr. Rubén Antonio Romo Mancillas
Presidente

Dr. Edgardo Becerra Becerra
Secretario

Dra. Laura Cristina Berumen Segura
Vocal

Dra. Ma. Guadalupe García Alcocer
Suplente

Dr. Marco Antonio Loza Mejía
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
Enero del 2024
México

ÍNDICE

RESUMEN	12
ABSTRACT	13
1. INTRODUCCIÓN	14
2. ANTECEDENTES	15
2.1 Cáncer	15
2.1.1 Leucemia Linfoblástica Aguda	16
2.1.2 Epidemiología de la LLA	17
2.1.3 Tratamiento	18
2.1.4 Quimiorresistencia	20
2.2 MRP en Leucemia linfoblástica aguda	22
2.2.1 Transportadores ABC de eflujo	22
2.2.2 Estructura MRP4	23
2.2.3 Relevancia de MRP4 en la MDR	28
2.3 MRP4 en LLA	28
2.3.1 Participación del AMPc	28
2.4 Inhibidores del MRP4	31
2.4.1 Inhibidores reportados	31
2.4.2 Métodos computacionales para el diseño molecular	34
2.4.3 Diseño de las moléculas EBD1, EBD9, EBD14	34
3. JUSTIFICACIÓN	36
5. HIPÓTESIS	37
6. OBJETIVOS	38
6.1 Objetivo General	38
6.2 Objetivos específicos	38
7. MATERIALES Y MÉTODOS	39
7.1 Optimización de los ligandos EBD9 y EBD14	39
7.2 Acoplamiento dirigido y dinámica molecular de las moléculas optimizadas	39
7.3 Predicción de las propiedades ADME-Tox	42
7.4 Síntesis de SHC-2-1 y SHC-2-2	42
8. Resultados y Discusión	44

8.1	Construcción y relajación del complejo MRP4-C1-ATPs	44
8.3	Acoplamiento y simulación de los ligandos	47
8.4	MRP4-C1-Ligandos selectos	48
8.4.1	Complejo MRP4 C con quercetina y ceefourina-1	48
8.4.2	Complejo MRP4 C con EBD9 y EBD14	53
8.4.3	Complejo MRP4 C con SHC-2-1 y SHC-2-2	56
8.5	Propiedades fisicoquímicas de los ligandos	60
8.6	Simulaciones de Dinámica Molecular Tipo <i>Umbrella Sampling</i>	61
8.6	Síntesis por unión de fragmentos de SHC-2-1 y SHC-2-2	63
9.	CONCLUSIONES	69
10.	PERSPECTIVAS	70
10	REFERENCIAS	71
	ANEXOS	80

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo de beca de maestría (CVU: 1066199).

Al Dr. Rubén Antonio Romo Mancillas por permitirme formar parte del laboratorio DACSIF, y ser un profesor ejemplar.

A mi Co-director, el Dr. Edgardo Becerra Becerra por ser muy paciente conmigo y enseñarme todo lo necesario para este proyecto.

A mis sinodales la Dra. Laura Cristina Berumen, Dra. Ma. Guadalupe García Alcocer y el Dr. Marco Antonio Loza Mejía por apoyarme durante toda esta trayectoria y lograr culminar este proyecto.

A el Dr. Giovanni Aguilera Durán y el MCQB. Manuel Álvarez Baltazar por ser mis maestros en este camino y compartir sus conocimientos conmigo. Al igual, por ser muy buenos amigos.

A mis compañeros y amigos, Mayra, Betty, Fer y Alex les agradezco por su apoyo y su carisma en la maestría.

A mis padres, Víctor y Gely por ser un ejemplo para seguir. Los admiro como a ninguna a persona. Ustedes han sido mis maestros de vida y lo seguirán siendo. Me han dado amor y apoyo. Los amo muchísimo.

A mi hermana, Nadia por ser incondicional y siempre estar ahí acompañándome, literal desde que nací. Te amo mucho.

A mi hermana, Nathalie por escucharme cuando más lo necesite. Te amo mucho.

A mi compañero Andrés por apoyarme en los momentos buenos y malos, por llenarme de un amor infinito. Te amo.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Casos anuales de cáncer infantil (0-14 años)	17
2. Datos estadísticos del cáncer: Leucemia linfoblástica aguda	18
3. Mecanismos de farmacoresistencia tumoral	20
4. Regulación de la homeostasis REDOX y quimiorresistencia en las células mediada por Nrf2	21
5. Propuesta de las estructuras topológicas de MRP	24
6. Elementos estructurales de MRP4	25
7. El mecanismo de transporte de MRP4	26
8. Modelo por homología de MRP4	27
9. Modelo de MRP4 por modelado por homología de MRP1 de <i>Bos Taurus</i>	27
10. Vías de señalización relacionadas con MRP4.	30
11. Agentes terapéuticos que actúan como inhibidores de MRP4	32
12. Optimización de las moléculas EBD9 y EBD14	39
13. Propuesta de ruta sintética para la obtención del fragmento A y B	42
14. Propuesta de ruta sintética de la molécula SHC-2-1	43
15. Propuesta de ruta sintética de la molécula SHC-2-2	43
16. Diagrama de interacción del ATP1 en NBD1 (A) y ATP2 en NBD2 (B)	45
17. Estructura tridimensional del MRP4 C1 con la unión del ATP1 en NBD1 y ATP2 en NBD2	46
18. Acoplamiento molecular del ligando ceefourina-1 en el sitio de unión inhibidor de su mejor conformación	48
19. Dinámica molecular de ceefourina-1 en el sitio de unión inhibidor de su mejor conformación	49
20. Acoplamiento molecular del ligando ceefourina-1 en el sitio de unión inhibidor de baja energía	50
21. Dinámica molecular de ceefourina-1 en el sitio de unión inhibidor	50
22. Acoplamiento molecular del ligando quercetina en el sitio de unión inhibidor	51
23. Dinámica molecular de quercetina en el sitio de unión inhibidor	52
24. Acoplamiento molecular del ligando quercetina en el sitio de unión sustrato fármaco	52
25. Dinámica molecular de quercetina en el sitio de unión sustrato fármaco	53
26. Acoplamiento molecular del ligando EBD9 en el sitio de unión inhibidor	54
27. Dinámica molecular de EBD9 en el sitio de unión inhibidor	54
28. Acoplamiento molecular del ligando EBD14 en el sitio de unión inhibidor	55

29. Dinámica molecular de EBD14 en el sitio de unión inhibidor	55
30. Acoplamiento molecular del ligando SHC-2-1 en el sitio de unión inhibidor	56
31. Dinámica molecular de SHC-2-1 en el sitio de unión inhibidor	57
32. Acoplamiento molecular del ligando SHC-2-1 en el sitio de unión sustrato endógeno	58
33. Dinámica molecular de SHC-2-1 en el sitio de unión sustrato endógeno	58
34. Acoplamiento molecular del ligando SHC-2-2 en el sitio de unión inhibidor	59
35. Dinámica molecular de SHC-2-2 en el sitio de unión inhibidor	59
36. Diagrama de propiedades ADME-Tox de los ligandos	60
37. Gráfico del <i>umbrella sampling</i> de los ligandos	63

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1. Tratamiento de primera línea de la LLA	19
2. Relación entre los diferentes MRP con sus respectivos sustratos e inhibidores	23
3. Inhibidores de MRP4 de los compuestos 1,4-dihidropiridinas	33
4. Valores del <i>Docking Score</i> y residuos de interacción de los inhibidores de MRP4	35
5. Grids de diferentes sitios de unión	41
6. Valores del control de calidad de los modelos de MRP4	46
7. <i>Docking score</i> de los ligandos en los diferentes sitios de unión de MRP4 (BC)	47
8. Energía libre de Gibbs de los ligandos. Valor real representado en kcal/mol	62
9. Rendimientos de la síntesis de los fragmentos	68

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo	Página
1. Resultados del alineamiento entre la proteína MRP4 M y MRP4 C1 (ATPs)	80
2. Espectro de RMN 1H del intermediario 2 de la reacción del fragmento A	81
3. Espectro de RMN ¹ H del intermediario 3 del fragmento A	81
4. Espectro predicho de RMN de ¹ H del compuesto 4, fragmento A	82
5. Espectro de RMN 1H del intermediario 4 de la síntesis del fragmento B	82
6. Espectro de RMN 1H del compuesto 5, fragmento B	83
7. Espectro predicho de ¹ H RMN del compuesto 5, fragmento B	83
8. Espectro de RMN 1H del intermediario 11 del fragmento D	84
9. Espectro predicho de ¹ H RMN del intermediario 11 del fragmento D	84
10. Espectro de RMN 1H del compuesto 14, fragmento D metilado	85
11. Espectro predicho de RMN ¹ H del compuesto 14, fragmento D metilado	85

ACRÓNIMOS

LLA Leucemia linfoblástica aguda

MDR Resistencia a múltiples fármacos

MRP Proteína de resistencia a múltiples fármacos

AMPc monofosfato cíclico de adenosina

CREB Transcripción Supervivencia Proliferación Apoptosis Diferenciación

PKA Proteína quinasa dependiente de AMPc

Ciclina Regulador del ciclo celular

BsAbs Anticuerpos bioespecíficos

BiTE Enganchador bioespecífico de células T

CAR Receptor de antígeno quimérico

TKI Inhibidores de tirosina quinasa

P-gp Glicoproteína P

EMT Transición epitelial-mesenquimatosas

CMC Células madre cancerosas

CDKN2A/B Inhibidor 2A/B de quinasa dependiente de ciclina

REDOX Reducción oxidación

ROS Especie reactiva de oxígeno

SOD Superóxido dismutasa

Prx Peroxirredoxina

Nrf2 Factor nuclear eritroide 2

tmAC Adenilil ciclasas asociadas a la membrana

sAC Adenilil ciclasa soluble

ATP trifosfato de adenosina

MTX Metotrexato

NBD Dominios de unión a nucleótidos

TMD Dominios transmembranales

AM Acoplamiento molecular

HM Modelado por homología

DM Dinámica molecular

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 that reads "Stephanie HC". The letters are cursive and somewhat stylized.

LDMNQ. Stephanie Hernández Castro

RESUMEN

La leucemia linfoblástica aguda es uno de los principales cánceres a nivel pediátrico, aproximadamente el 60% de casos se presentan en niños y adolescentes menores de 20 años y se estima una incidencia anual de 36.2 casos por cada 1 millón de personas. La sobreexpresión del transportador MRP4, un miembro de la subfamilia C de los transportadores ABC, en células de leucemia linfoblástica aguda se relaciona a la resistencia a múltiples fármacos debido a que MRP4 está involucrado en la traslocación de sustratos endógenos, fármacos anticancerígenos y AMPc, el cual es un agente proapoptótico. Ésta es una de las principales causas por las cuales los tratamientos utilizados en los pacientes fracasan. Se han reportado pocos inhibidores selectivos de MRP4, los cuales, al inhibir el eflujo que lleva a cabo este transportador, favorecerían el aumento de la concentración y actividad de los fármacos anticancerígenos y sustratos proapoptóticos dentro de la célula. Por ello, el objetivo de este trabajo fue optimizar química y estructuralmente las propiedades fisicoquímicas y energías de unión con MRP4 de dos moléculas, EBD9 y EBD14, previamente diseñadas en el Laboratorio de Diseño Asistido por Computadora y Síntesis de Fármacos (DACCSIF), se realizó un estudio computacional, su síntesis e identificación estructural de ambas moléculas optimizadas, SHC-2-1 y SHC-2-2, mediante resonancia magnética nuclear. El estudio computacional determinó que SHC-2-1 y SHC-2-2 en el sitio de unión inhibidor sus interacciones moleculares, como su energía de unión son mayormente más favorecidos en contraste con EBD9 y EBD14. La síntesis por unión de fragmento de SHC-2-1 y SHC-2-2, se concretó en sus intermediarios de reacción.

Palabras clave:

Leucemia linfoblástica aguda, MRP4, inhibidores selectivos

ABSTRACT

Acute lymphoblastic leukemia is one of the leading pediatric cancers, with approximately 60% of cases occurring in children and adolescents under 20 years and an estimated annual incidence of 36.2 cases per 1 million people. Overexpression of the transporter MRP4, a member of the C subfamily of ABC transporters, in acute lymphoblastic leukemia cells is related to multidrug resistance because MRP4 is involved in the translocation of endogenous substrates, anticancer drugs, and cAMP, which is a proapoptotic agent. This is one of the main reasons why treatments used on patients fail. Few selective MRP4 inhibitors have been reported, which, by inhibiting the efflux carried out by this transporter, would favor an increase in the concentration and activity of anticancer drugs and proapoptotic substrates inside the cell. Therefore, this work aims to optimize chemically and structurally the physicochemical properties and MRP4 binding energies of two molecules previously designed in the Computer-Assisted Drug Design and Synthesis research group, a computational study was conducted for the synthesis and structural identification of both optimized molecules, SHC-2-1 and SHC-2-2, using nuclear magnetic resonance. The computational study determined that the molecular interactions at the inhibitor binding site of SHC-2-1 and SHC-2-2, as well as their binding energy, are predominantly more favorable compared to EBD9 and EBD14. The synthesis via fragment coupling of SHC-2-1 and SHC-2-2 resulted in the formation of their reaction intermediates.

Keywords:

Acute lymphoblastic leukemia, MRP4, selective inhibitors

1. INTRODUCCIÓN

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es el cáncer más común entre niños de dos a cinco años, aproximadamente el 60% de casos se presentan en niños y adolescentes menores de 20 años y se estima una incidencia anual de 36.2 casos por cada 1 millón de personas. Una vez que han sido diagnosticados con LLA, el tratamiento de elección es la quimioterapia multifarmacológica. Sin embargo, el paciente puede tener recaídas debido a la resistencia a múltiples fármacos (MDR por sus siglas en inglés), que perjudica la farmacodinamia del fármaco. Se han identificado diversas proteínas involucradas en la MDR, siendo uno de los principales los transportadores de *cassette* de unión a ATP, también conocidos como transportadores ABC. Éstos participan en la salida de varios sustratos a la región extracelular de la membrana plasmática. Las proteínas de resistencia a múltiples fármacos (MRP) pertenecen a la subfamilia C de los transportadores ABC, una de las principales proteínas es MRP4.

La sobreexpresión del transportador MRP4 se ha observado en diferentes tipos de cánceres y en la LLA se involucra activamente en el transporte de xenobióticos como diversos agentes anticancerígenos. Adicionalmente, MRP4 participa en el transporte de moléculas de señalización endógenas como AMPc, el cual, es fundamental para determinar la maduración de las células leucémicas y en concentraciones elevadas promueve la apoptosis. En el presente trabajo se optimizaron las propiedades fisicoquímicas MRP4 de dos moléculas previamente diseñadas en el Laboratorio de Diseño Asistido por Computadora y Síntesis de Fármacos, del cual, resultaron las moléculas SHC-2-1 y SHC-2-21.

Mediante un estudio computacional se observó que las moléculas SHC-2-1 y SHC-2-2, derivadas de la optimización de las moléculas previamente diseñadas EBD9 y EBD14 pueden actuar como posibles inhibidores selectivos de MRP4 debido a que pueden unirse al sitio de unión inhibidor y fármaco con una energía de unión significativa en comparación a EBD9 y EBD14 e inhibidores previamente reportados. Posteriormente, se realizó la síntesis por unión de fragmentos de ambas moléculas, SHC-2-1 (Fragmento A y C) y SHC-2-2 (Fragmento B y D), obteniendo rendimientos de 12.5, 1.99 y 2.9 para los intermediarios de reacción de los Fragmentos A, B y D, respectivamente. Su identificación estructural se obtuvo mediante espectroscopía de resonancia magnética molecular (RMN ¹H).

2. ANTECEDENTES

2.1 Cáncer

Las células normales del humano siguen usualmente un proceso ordenado de división celular cada que el cuerpo las necesita. A diferencia de las células cancerígenas, quienes a pesar de estar en un ambiente rico o limitado en nutrientes tienen la notable capacidad de reprogramar su metabolismo y promover su proliferación y supervivencia, al modificar elementos del mismo metabolismo, en la regulación de las vías de señalización o mutaciones en la expresión genética. (Agathocleous et al., 2013; Morrison, 2022).

El cáncer es un proceso de múltiples etapas que se refleja en la pérdida y ganancia de función en diferentes tipos de células, por ello, existen diferentes tipos de cánceres. Adicionalmente, en la desregulación de la mitosis ocurre una pérdida progresiva de puntos de control en el ciclo celular, que resulta en una proliferación incontrolable. Por otra parte, a medida que avanza el cáncer ocurre un bloqueo en la diferenciación de las células progenitoras o bien si ya han sido diferenciadas, pueden desdiferenciarse y resulta en un aumento en células inmaduras, que no pueden realizar las funciones de células completamente maduras (Lineweaver et al., 2021).

El microambiente de la médula ósea está compuesto por osteoclastos, osteoblastos, osteocitos, células inmunes, células endoteliales y células estromales (Raimondi et al., 2020), incluidos otros componentes, como son factores de adhesión, factores de crecimiento y quimiocinas. Particularmente, la médula ósea influye en el comportamiento de las células madre hematopoyéticas, a través de diferentes cascadas de señalización y mantiene la hematopoyesis normal, al estimular la autorrenovación, proliferación y diferenciación celular (A. Wang y Zhong, 2018). La interacción de las células leucémicas con este microambiente provoca la pérdida de la homeostasis ósea, para asegurar su propia supervivencia y expansión (Hernández-Martínez et al., 2019).

La leucemia aguda es un grupo heterogéneo de neoplasias que afecta a las células progenitoras del sistema hematopoyético, se dividen en diferentes subtipos; la leucemia mielógena aguda, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide crónica y la leucemia linfocítica crónica (Laosai y Chamnongthai, 2018). Durante el diagnóstico, la población de células clonales son un indicador para determinar de cuál subtipo se trata, además de que está directamente relacionado con la edad. Por ejemplo, en la leucemia linfoblástica aguda de células-T (LLA-T) y la leucemia mieloide aguda (LMA) existen al menos 18 subtipos de células. Por lo tanto, sus

criterios de diagnóstico y tratamiento son variables ya que dependen de las características morfológicas, características clínicas inmunológicas, moleculares, y en los patrones de expresión del antígeno de superficie (Soares et al., 2020).

2.1.1 Leucemia Linfoblástica Aguda

La leucemia es un cáncer hematológico que afecta cualquiera de los precursores de las diferentes líneas celulares de la médula ósea y se puede extender a diferentes órganos (Raetz y Gojo, 2018). Este fenómeno comienza cuando un glóbulo blanco inmaduro se divide de manera incontrolada, lo que resulta en la sobreproducción excesiva de linfoblastos del linaje B o T (Hernández-Martínez et al., 2019).

En un desarrollo normal de estos linfocitos, en la médula ósea es donde maduran los linfocitos B a través de factores de transcripción específicos y marcadores de superficie celular. A diferencia de los linfocitos T, éstos surgen a medida que los progenitores linfoides tempranos emigran de la médula al timo. En la LLA, estas células adquieren la capacidad necesaria para generar múltiples alteraciones en genes con el fin de favorecer su supervivencia, diferenciación y proliferación (Thapa y Farber, 2019). Por ejemplo, los casos de LLA de células B se originan de clones que se encuentran detenidos en etapas tempranas, las células pre-pro-B o células pro-B, mientras que los linfocitos T son a partir de clones en diferentes etapas de su desarrollo. Desde el ámbito molecular, las alteraciones genéticas encontradas en células precursoras T tempranas LLA, son distintos de los LLA de precursoras de células T no tempranas. En la mayoría de los casos de los precursores de células T se muestran mutaciones en los reguladores de transcripción (>80%), señalización JAK y STAT (>40%), y regulación epigenética (>80%). También se han observado otro tipo de alteraciones no tan comunes, por ejemplo, la participación de la señalización NOTCH. Los pacientes con LLA de células T han tenido peores resultados que pacientes con LLA de células B en la mayoría de los ensayos clínicos (Teachey y Pui, 2019).

Los síntomas que presentan estos pacientes son múltiples, tales como: sangrado gingival, pequeñas hemorragias subcutáneas, dolor, fiebre, infecciones asociadas con citopenia, anemia, trombocitopenia, linfadenopatías en cuello o axila, hepatomegalia o esplenomegalia, trastornos del sistema nervioso central, infiltración testicular y cutánea, debilidad, fatiga, malestar abdominal, y pérdida de peso. Encontrar los síntomas tempranos es crucial para el diagnóstico e identificación de la enfermedad residual mínima (MRD) para su clasificación y tener una evaluación adecuada (Shahverdi et al., 2020).

2.1.2 Epidemiología de la LLA

La leucemia linfoblástica aguda es el cáncer más común en la población pediátrica y se diagnostica con mayor frecuencia entre los dos y los cinco años (Dong et al., 2020). El mayor desafío clínico en la leucemia es la recaída que sufren aproximadamente el 30% de los pacientes pediátricos con LLA. Por ejemplo, en México más del 50% de los pacientes con LLA se clasifican de alto riesgo por una recaída (Juárez-Avedaño et al., 2020). La tasa de incidencia de LLA infantil en la Ciudad de México es la más alta a nivel mundial, se han reportado aproximadamente 49.5 casos por cada millón de niños menores de 15 años (Valenzuela-Vazquez et al., 2020). A su vez, la Organización Mundial de la Salud reportó dentro de los cánceres infantiles con mayor número de casos anuales en México, alrededor de 1363 casos para la LLA, como se muestra en la Figura 1 (Organización Panamericana de la Salud, 2020).

Adicionalmente, se estimó que en el año 2022 el porcentaje de nuevos casos de LLA fue del 0.3 %, similar al porcentaje que se estima para el número de muertes. A su vez, la tasa de supervivencia relativa de 5 años para la población infantil que padece de LLA es del 70.8 %. Es decir que 70 de cada 100 niños con LLA se encontrará con vida 5 años después de su diagnóstico, mostrado en la Figura 2 (National Institutes of Health, 2021).

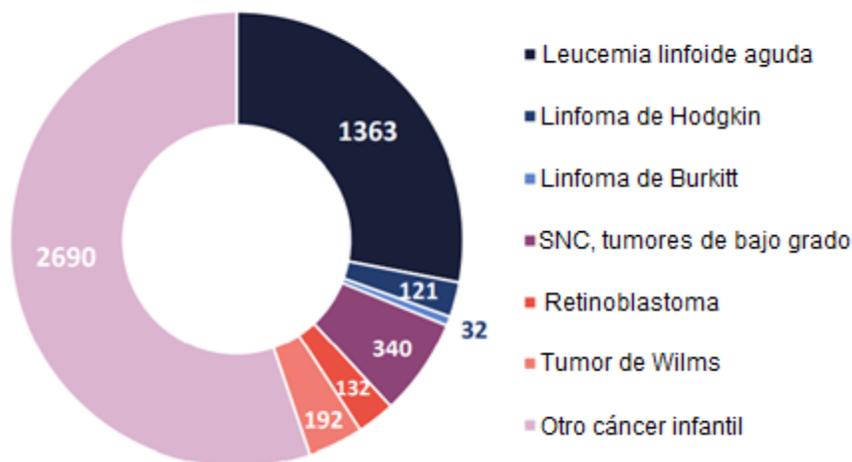


Figura 1. Casos anuales de cáncer infantil (0-14 años) (OPS, 2020).

Nuevos casos estimados en 2022	6,660
% de todos los nuevos casos de cáncer	0.3%
Muertes estimadas en 2022	1,560
% de todas las muertes por cáncer	0.3%

Supervivencia relativa a 5 años
70.8%
2012-2018



Figura 2. Datos estadísticos del cáncer: Leucemia linfoblástica aguda (NIH, 2021)

2.1.3 Tratamiento

Los procedimientos para el tratamiento del cáncer consisten principalmente en la quimioterapia, radioterapia y cirugía (Aramini et al, 2022; Akbari et al, 2017). En ocasiones, algunos pacientes tienen recaídas, por lo que es importante la continua búsqueda de una terapia dirigida. Por ello, en la actualidad, un tratamiento de partida para los pacientes que sufren de LLA es una quimioterapia multifarmacológica y la estratificación de la intensidad del tratamiento, que se diferencian de acuerdo con características clínicas, biológicas y genómicas de las células leucémicas del paciente (Hunger y Mullighan, 2015).

Para seleccionar el tratamiento adecuado para cada paciente es necesario la etapa de clasificación y detección. En primer lugar, se evalúa la enfermedad mínima residual (EMR), la cual, consiste en la identificación de la morfología de los linfoblastos y la evaluación de linaje, anomalías genéticas y se mantiene durante todo el tratamiento (Cárdenas y Gutiérrez, 2018). El tratamiento consta de cuatro fases: inducción, consolidación, intensificación y mantenimiento. La etapa de

inducción se basa en una combinación de quimioterapia, que suele incluir un glucocorticoide, vincristina, L-asparaginasa y una antraciclina. La consolidación consiste en varios ciclos cortos secuenciales de quimioterapia cada dos semanas con los fármacos mostrados en la Tabla 1. en un periodo de 12 semanas. Posteriormente, se inicia una fase de intensificación en la que estos fármacos se combinan con los utilizados durante la terapia de inducción. Finalmente, la etapa de mantenimiento consiste en mercaptopurina diaria y metotrexato semanalmente, con o sin vincristina, y pulsos de glucocorticoides durante 1 o 3 meses. Además, se administra un tratamiento dirigido para prevenir una recaída, así como el trasplante alogénico de células hematopoyéticas para pacientes con enfermedad residual mínima persistente (Malard y Mothy, 2020).

Tabla 1. Tratamiento de primera línea de la LLA.			
Inducción*	Consolidación[†]	Intensificación*	Mantenimiento*
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Glucocorticoide ▪ Vincristina ▪ L-asparaginasa ▪ Antraciclina ▪ Quimioterapia intratecal[‡] 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Glucocorticoide ▪ Dosis altas de metotrexato ▪ Citarabina a dosis bajas ▪ Asparaginasa ▪ Quimioterapia 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Glucocorticoide ▪ Vincristina ▪ Asparaginasa ▪ Antraciclina ▪ Quimioterapia intratecal[‡] 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Glucocorticoide ▪ Metotrexato ▪ Mercaptopurina ▪ Vincristina ▪ Quimioterapia intratecal[‡]
<p>* LLA con cromosoma Filadelfia positivo se administran inhibidores de la tirosina cinasa durante cada fase del tratamiento. [‡]La quimioterapia intratecal consiste en metotrexato solo o combinado con citarabina e hidrocortisona e hidrocortisona. [†] El trasplante alogénico de células hematopoyéticas es opcional tras la consolidación (Malard y Mothy, 2020).</p>			

Por otro lado, la inmunoterapia consiste en el diseño de anticuerpos monoclonales que reconozcan antígenos específicos sobre la superficie de las células B y T. Éstos median procesos como la citotoxicidad dependiente de anticuerpos o del complemento o directamente favorece el proceso de apoptosis en células leucémicas (Mukherjee y Sekeres, 2019). A diferencia de los anticuerpos monoclonales estándar, los anticuerpos biespecíficos (BsAbs) tiene la ventaja de que no solo reconocer un sólo antígeno, éstos tienen especificidad sobre dos antígenos, facilitando interacciones entre células. Dentro de este último grupo, se encuentran los enganchadores bioespecíficos de células T (*BiTE*) y las células T receptoras de antígeno quimérico (*CAR*) (Algeri et al., 2018). De igual manera, las inmunotoxinas son otro tipo de anticuerpo monoclonal que está conjugado con una toxina, ya sea de naturaleza bacteriana o vegetal (Khirehgesh et al., 2021).

La terapia de diferenciación es otra terapia dirigida a los biomarcadores de la célula cancerosa. Éstos son agentes que favorecen el proceso de maduración y diferenciación de las células cancerosas. Por ejemplo, la endonucleasa

apurínica/apirimidínica (*APE1/Ref-1*) realiza una regulación reducción-oxidación de factores de transcripción importantes en las vías de señalización en las células T de la LLA (Ding et al., 2017; Oliveira et al., 2022).

Para aquellos pacientes que padecen LLA positivos al cromosoma Filadelfia, se ha utilizado como alternativa a los inhibidores de tirosina cinasa (TKI), dirigidos a BCR-ABL, en combinación con la quimioterapia (Galán et al., 2022).

2.1.4 Quimiorresistencia

Los pacientes pueden llegar a presentar resultados desfavorables durante su tratamiento debido a un fenómeno conocido como quimiorresistencia. Esto como resultado de múltiples mecanismos de supervivencia utilizados por las células leucémicas, por ejemplo, mutaciones en los sitios de la diana del fármaco, farmacocinética alterada, una falla en la administración del fármaco, por la activación de transportadores ABC, regulación baja de la apoptosis y células madre tumorales resistentes (Baron y Micallef, 2020; Kong et al., 2015). Como se ilustra en la Figura 3, los mecanismos que contribuyen al desarrollo de MDR, se catalogan en generales y específicos, que resultan de modificaciones a nivel molecular.

Por un lado, la transición epitelial-mesenquimatoso (EMT) es un proceso, por el cual, las células epiteliales adquieren las características de células mesenquimales y pueden producir un fenotipo similar a las células madre cancerosas (CMC). Otro mecanismo de resistencia que influye en la MDR es la desregulación de las vías de muerte celular o alteraciones en las vías de señalización involucradas en el microambiente de la médula ósea (Chen et al., 2020).

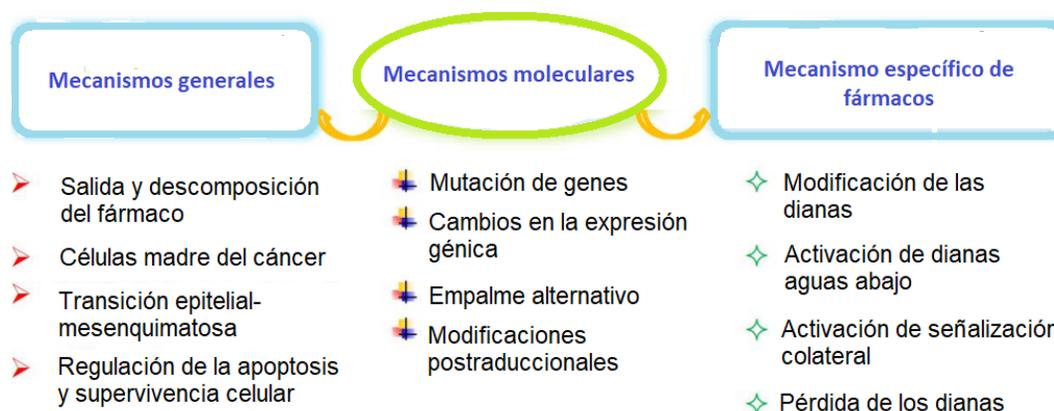


Figura 3. Mecanismos de farmacorresistencia tumoral. Pueden ser específicas de un fármaco o de una vía. Todos ellos están relacionados con la expresión y la función de genes específicos o la restauración de la vía de señalización impulsora del tumor (Chen et al., 2020).

El microambiente de la médula ósea está conformado por nichos endóxicos y vasculares; sitio donde ocurre la regeneración y renovación de las células hematopoyéticas. Las CMC o progenitoras leucémicas adquieren la capacidad de resistencia al poder interactuar con células vecinas, ya que pueden alterar significativamente la homeostasis hematopoyética, como las vías de señalización Notch, Wnt/ β -catenina y otras vías relacionadas con la hipoxia dentro de los nichos leucémicos (Kuek et al., 2021). Las mutaciones en el receptor NOTCH1 se han encontrado en casi dos tercios de los casos de LLA-T (Leucemia linfoblástica aguda de células T) pediátricos. Estos receptores pueden actuar tanto como oncogenes como supresores de tumores, dependiendo del ambiente celular. NOTCH1 es importante para el desarrollo de los timocitos, ya que compromete a los progenitores linfoides comunes con el destino de las células T (Pocock et al., 2021).

La LLA-T recidivante es muy agresiva y a menudo estos pacientes generan resistencia a glucocorticoides y quimioterapia. La proteína CREBBP es la que contribuye a la resistencia a los glucocorticoides y CDKN2A/B (Senft y Jeremias, 2019).

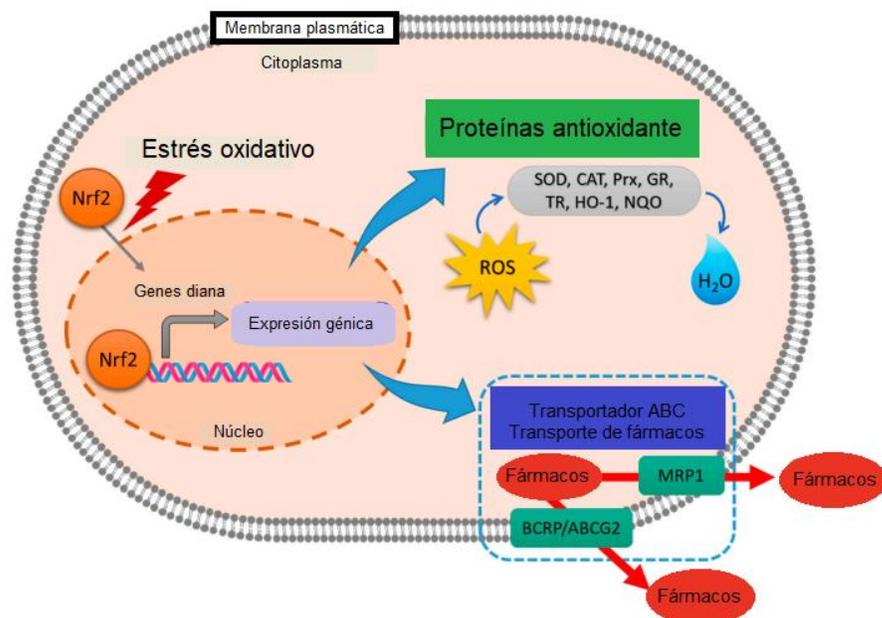


Figura 4. Regulación de la homeostasis REDOX y quimiorresistencia en las células mediada por Nrf2. El Nrf2 regula la homeostasis redox y la quimiorresistencia celular. Nrf2 induce proteínas antioxidantes (SOD, CAT, Prx, GR, TR). La proteína MRP1 y BCRP/ABCG2 están relacionadas con el transporte de fármacos y se regulan mediante la activación de Nrf2 (Kim et al., 2019).

Por lo tanto, la quimiorresistencia es un fenómeno que los pacientes con leucemia pueden presentar durante su tratamiento (Rey-Caro et al., 2020). Por ejemplo, la sobreexpresión de los transportadores ABC median la salida de varios sustratos, disminuyendo su acumulación intracelular. Los MRP pertenecen a esta superfamilia

de transportadores ABC, que emite tantos agentes anticancerígenos o endógenos; durante este proceso utilizan energía impulsada por ATP, es decir, el mecanismo por el cual causan la MDR, es la sobreexpresión del transportador de *cassette* de unión a ATP (Giddings et al., 2021).

Por otro lado, la capacidad antioxidante y la homeostasis redox son esenciales para la supervivencia y el crecimiento celular. La homeostasis redox está regulada por un estado equilibrado entre producción y eliminación de especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés). Por consiguiente, las células cancerosas aumentan los niveles de antioxidantes, como protección contra niveles altos de ROS. Algunos ejemplos, de antioxidantes son la enzima superóxido dismutasa (SOD), catalasa, peroxirredoxina (Prx), y el factor nuclear eritroide 2 (Nrf2). Nrf2 está implicado en la expresión de genes involucrados en el metabolismo/transporte de fármacos, los MRP (Kim et al., 2019), como se muestra en la Figura 4.

2.2 MRP en Leucemia linfoblástica aguda

2.2.1 Transportadores ABC de eflujo

La familia de los transportadores de *cassette* de unión a ATP, también conocidos como transportadores ABC (ATP Binding Cassette) median los gradientes de concentración de fármacos. Los transportadores ABC obtienen energía mediante la hidrólisis de ATP y permite la translocación del sustrato a través de la membrana celular (Wang et al., 2021). Existen siete subfamilias, entre las más numerosas están las subfamilias ABCA, ABCG, y ABCC. Hasta el momento, de la familia ABCC se conocen 13 miembros (Bruhn et al., 2020), las proteínas MRP son las que median el transporte de varios agentes quimioterapéuticos o sus metabolitos activos a través de la membrana celular, un ejemplo de éstas es el transportador MRP4 sobreexpresado en LLA (Jaramillo et al., 2019). En la Tabla 2 se comparan a los MRP que se han reportado hasta el momento, indicando la especificidad que tienen con su sustrato, ya sea un fármaco o un sustrato fisiológico, y sus inhibidores.

Tabla 2. Relación entre los diferentes MRP con sus respectivos sustratos e inhibidores (Zhou et al., 2008; Kamath et al., 2022; Kroll et al., 2021)

Nombre	Fármacos	Sustrato fisiológico	Inhibidores
MRP1	Doxorrubicina, vincristina, etopósido, MTX, camptotecina, CPT-11, SN-38, ciclofosfamida, conjugados	Glutación, LTC ₄ , E ₂ 17βG, ácidos de la bilis sulfatada, bilirrubina, PGA, conjugado GSH, GSH, GSSG	Probenecid, sulfipirazona, indometacina, verapamilo, quercetina, genisteína, ciclosporina, PAK-104P, análogos de esteroide, MK-571, ONO-1078, sulfonilurea, glibenclamida
MRP2	Conjugados, cisplatino, etopósido, alcaloides de la vinca, antraciclinas, camptotecinas, MTX, lopinavir, olmesartán	LTC ₄ , GSH, GSSG, conjugados de bilirrubina, LTD ₄ , LTE ₄	MK-571, furosemida
MRP3	Etopósido, tenipósido, dinitrofenilo S-glutación, glucurónido de acetaminofén, vincristina, MTX	LTC ₄ , E ₂ 17βG, cholate, glucocolato, taurocolato	Etopósido, MTX
MRP4	MTX, 6-tioguanina, PMEAs, 6-mercaptapurina, topotecan	GMPc, AMPc, DHEAS, E ₂ 17βG, PGE ₁ , PGE ₂	MK-571, celecoxib, rofecoxib, diclofenaco
MRP5	6-mercaptapurina, 6-tioguanina, PMEAs, metales pesados, S- (2,4-dinitrofenil) glutación	GMPc, AMPc	Probenecid, sulfipirazona, benzbromarona, MK-57
MRP6	LTC ₄ , N-etilmaleimida S-glutación, dinitrofenol glutación, etopósido, doxorubicina, cisplatino, daunorrubicina	NR	Indometacina, probenecid, benzbromarona
MRP7	NR	E ₂ 17βG	NR
MRP8	5-FU, PMEAs, MTX, ácidos biliares	GMPc, AMPc, LTC ₄ , DHEAS	NR
MRP9	NR	NR	NR

*NR= No reportado

2.2.2 Estructura MRP4

El gen MRP4 se encuentra en el cromosoma 13q32.1, que se considera un gen altamente polimórfico y variantes como Y556C, G187W, pueden dar lugar a un cambio en el transporte de sustratos (Becerra et al., 2021). Los MRP difieren en su estructura y composición, éstos tienen múltiples dominios transmembranales (TMD) y dominios de unión a nucleótidos (NBD). Entre los MRP difiere el número de TMD.

MRP4 carece de la N-terminal en TMD0, por lo que, se clasifica como un MRP corto. Hasta el momento no es clara la función que realiza el TMD0 (Figura 5) (Wang et al., 2021).

Cada NBD contiene dos subdominios, un dominio catalizador y un dominio α -helicoidal. El dominio catalizador contiene dos motivos, el motivo *Walker A*, que interactúa con los grupos fosfato del nucleótido y el motivo *Walker B* donde ocurre la hidrólisis del ATP, Figura 6 (Pérez et al., 2021).

El transporte del sustrato de la región intracelular a la extracelular dependerá del cambio conformacional que adopte MRP4 (Cheepala et al., 2013). Para la mayoría de los transportadores ABC, al comienzo del mecanismo de transporte, el transportador adopta una conformación orientada hacia adentro (Estado 1) en la que el sustrato podría acceder desde el citosol, o lateralmente desde la bicapa lipídica. Una vez que el sustrato está atado, el transportador se convertiría en una conformación que mira hacia adentro con una cavidad más estrecha (Estado 2). Tras la unión del ATP, existe un estado aún más estrecho cuando el ATP y el sustrato se unen simultáneamente durante un breve periodo de tiempo (Estado 3). Sin embargo, la dimerización de los NBD rápidamente desencadena un cambio conformacional orientada hacia afuera, lo que resulta en la liberación del sustrato (Estado 4). Finalmente, la hidrólisis de ATP separa los dos NBD y restablece el transportador al estado de reposo (Estado 1), como se muestra en la Figura 7 (Xiao et al., 2021).

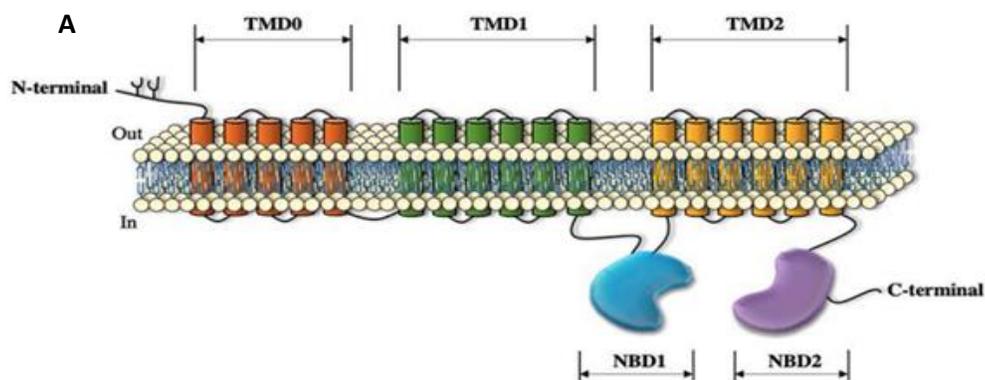


Figura 5. Propuesta de las estructuras topológicas de MRP. Representación de la estructura de los MRP largos (Wang et al., 2021).

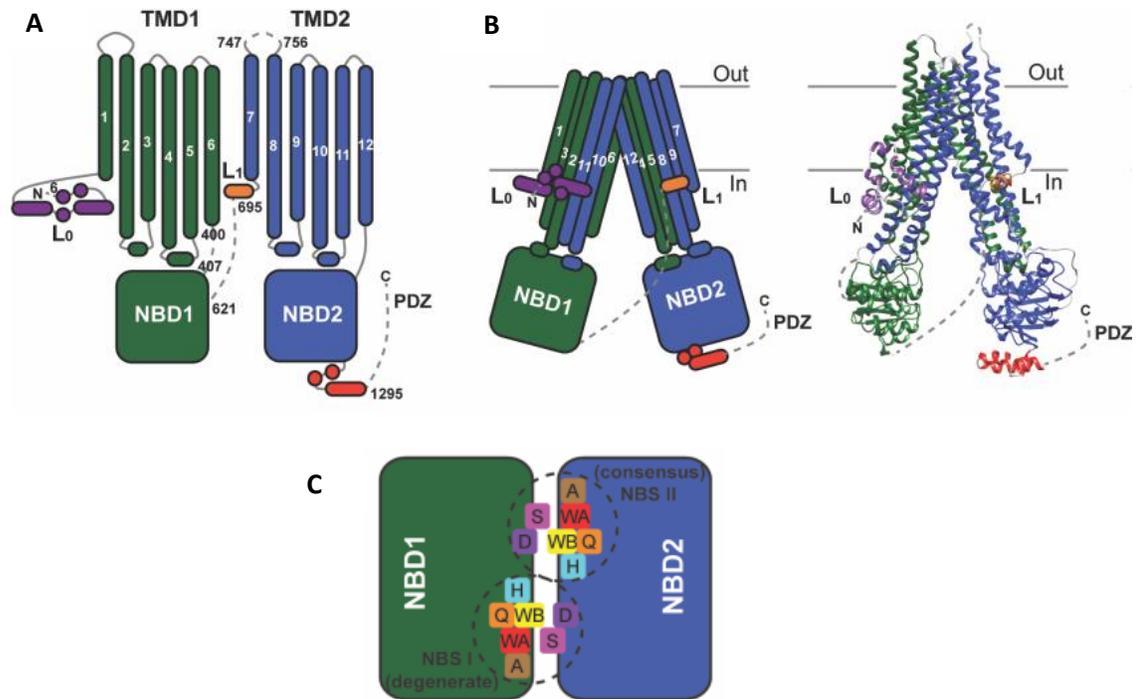


Figura 6. Elementos estructurales de MRP4. En el inciso A se muestran las hélices transmembranales numeradas desde el extremo N hasta el extremo terminal C. L0= motivo Lasso, L1= hélice de codo C-terminal, PDZ= unión motivo PDZ. Inciso B, representación del MRP4 en la región transmembranal con una conformación orientada hacia adentro (Out=zona extracelular, In= zona intracelular), con una conformación abierta (lado izquierdo). Representación de un modelo MRP4 (lado derecho). Inciso C, Representación de los dos NBD y sus motivos ABC: A (marrón)=A loop, WA (rojo)=Walker A, Q (naranja)=Q-loop, WB (amarillo)=Walker B, H (turquesa)= Interruptor, H, D y S (púrpura)= motivo D-loop (Magnus et al., 2022).

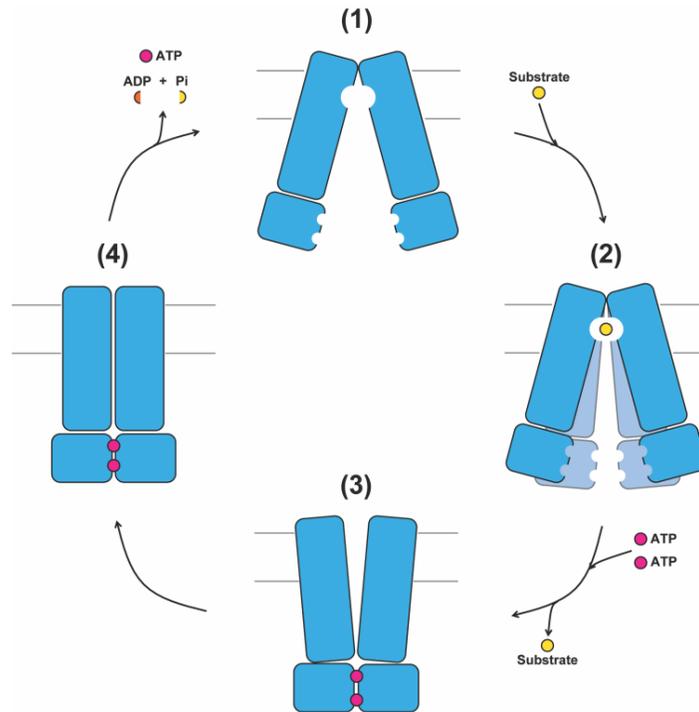


Figura 7. El mecanismo de transporte de MRP4. (1) La proteína MRP4 (azul) se encuentra en su conformación basal (orientada hacia adentro); (2) Llegada de un sustrato (amarillo) (3); Unión de dos moléculas de ATP (Morado) en los NBD, y translocan al sustrato, (4) hidrólisis del ATP (Xiao et al., 2021).

Se han reportado diferentes estructuras de MRP4 mediante modelado por homología, debido a que al inicio del proyecto no se había aún resuelto la estructura tridimensional de la proteína por técnicas como resonancia magnética nuclear, criomicroscopía electrónica o rayos X. Por lo que, la construcción de MRP4 fue a partir de otros miembros de la familia de los transportadores ABC que han sido obtenidas de diferentes organismos por dichas técnicas. Por ejemplo, la representación del estado exterior de MRP4 se obtuvo a partir de Sav1866 de *Staphylococcus aureus* mientras que para la orientación hacia adentro de MRP4, a partir de *Escherichia coli* y el dominio de unión de ATP, a partir de MRP1 humano. Para los modelos orientados hacia adentro se utilizó la estructura de P-gp, mostrada en la Figura 8 (Chen et al., 2018) y la estructura completa de MRP4 (modelo por homología) a partir de MRP1 de *Bos taurus* (Becerra et al., 2021), Figura 9.

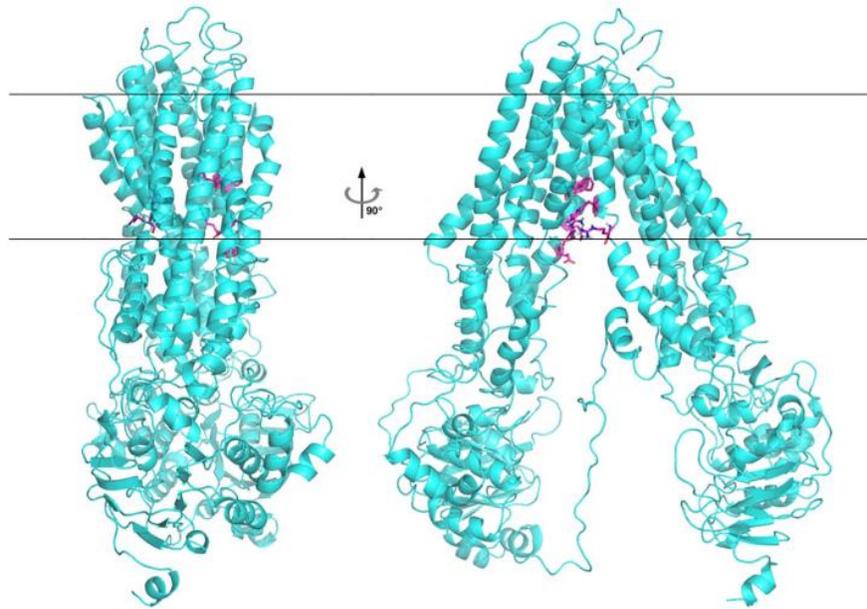


Figura 8. Modelo por homología de MRP4. Conformación abierta del MRP4 (color azul). Los residuos de TMH6 y TMH12 de MRP4 son los más importantes para la unión del sustrato (color morado) (Chen et al., 2018).



Figura 9. Modelo de MRP4 por modelado por homología de MRP1 de *Bos Taurus*. Construido en I-TASSER con una conformación orientada hacia dentro de tipo CG-MDS (Becerra, 2021).

2.2.3 Relevancia de MRP4 en la MDR

MRP4 se expresa en diferentes tejidos, como es en el riñón, hígado, próstata, plaquetas, músculo liso, corazón y barrera sanguínea cerebral. Particularmente, los MRP4 transportan sustancias como xenobióticos, sustratos endógenos, nucleósidos cíclicos y análogos de nucleótidos (Elfadadny et al., 2021; Oevermann et al., 2009). Por ejemplo, regula el transporte de conjugados de glucurónido y glutatión, moléculas de señalización endógenas como AMPc, GMPc, ADP, prostaglandinas, leucotrienos y ácido fólico (Wen et al., 2015).

MRP4 tiene la capacidad de expulsar diversos agentes terapéuticos, particularmente medicamentos contra el cáncer, como tiopurinas, camptotecinas y metotrexato, antivirales análogos de nucleósidos, incluidos ganciclovir y nelfinavir (Chen et al., 2018). Sus sustratos son principalmente análogos de nucleósidos (purina y pirimidina), también análogos de desoxinucleósidos, tales como citarabina y cladribina que se utilizan en el tratamiento de leucemias (Ali et al., 2022; Reid et al., 2003). MRP4 en comparación a los demás transportadores de la familia ABCC es fundamental para el transporte de moléculas de señalización celular involucradas en procesos fisiológicos importantes en las células, como es la comunicación intra y extracelular (Ritter et al., 2005; Szerémy et al., 2019). Por ejemplo, niveles altos de expresión del MRP4 estaban inicialmente asociados con la resistencia a la quimioterapia, actualmente, se han relacionado con el transporte endobiótico de AMPc y prostaglandinas que están presentes durante la progresión tumoral (Lacava et al., 2019).

Para contrarrestar este efecto, se debe realizar una inhibición en la función de transporte de salida del MRP4 y favorecer así la acumulación intracelular de agentes quimioterapéuticos.

2.3 MRP4 en LLA

2.3.1 Participación del AMPc

En la comunicación celular, el AMPc es responsable de la activación de la proteína cinasa A (PKA) y las proteínas de intercambio activadas por el AMPc (EPAC), ambos son efectores aguas abajo del AMPc y regulan la activación de diferentes factores de transcripción. PKA regula un gran número de procesos mediante la fosforilación de sus sustratos, como CREB, Raf, Bad y GSK3 (Zhang et al., 2020). Por ejemplo, la proteína CREB se sobreexpresa generalmente en células de la médula ósea de pacientes que padecen leucemia linfocítica (Crans et al., 2002). Su

actividad media la transcripción de una variedad de genes que involucran en la detención del ciclo celular en G1/S.

Por un lado, como se muestra en la Figura 10, el PKA inhibe la proliferación celular a través de la inducción del inhibidor del ciclo celular P27kip1 que suprime CDK2 y CDK4 (Wen et al., 2015). Por otro lado, la señalización AMPc-PKA promueve la apoptosis a través de una vía intrínseca al aumentar la expresión de proteínas pro-apoptóticas (Bax y Mcl-2) y éstas, a su vez, regulan la liberación de citocromo c y Smac/DIABLO y activan un iniciador caspasa a nivel mitocondrial (Murray, 2013; Roufayel et al., 2022). Por el contrario, la vía extrínseca inicia en la unión de un ligando de muerte, como TNF- α , ligando Fas (FASL) y el ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (TRAIL). Esta interacción conduce a la formación de un complejo de señalización que induce la muerte (DISC) y activación de pro-caspasa-8 y caspasa-3 (Pérez et al., 2021).

Por lo tanto, el AMPc es un segundo mensajero que regula varios procesos celulares importantes para combatir la supervivencia y proliferación de células cancerosas, por ende, MRP4 al mediar la salida del AMPc a la región del citoplasma se asocia con la evolución de la LLA. Sin embargo, MRP4 en presencia de un inhibidor favorece un aumento intracelular del AMPc y contribuye a la promoción de la diferenciación celular, detención del crecimiento celular y apoptosis (Berthier et al., 2019).

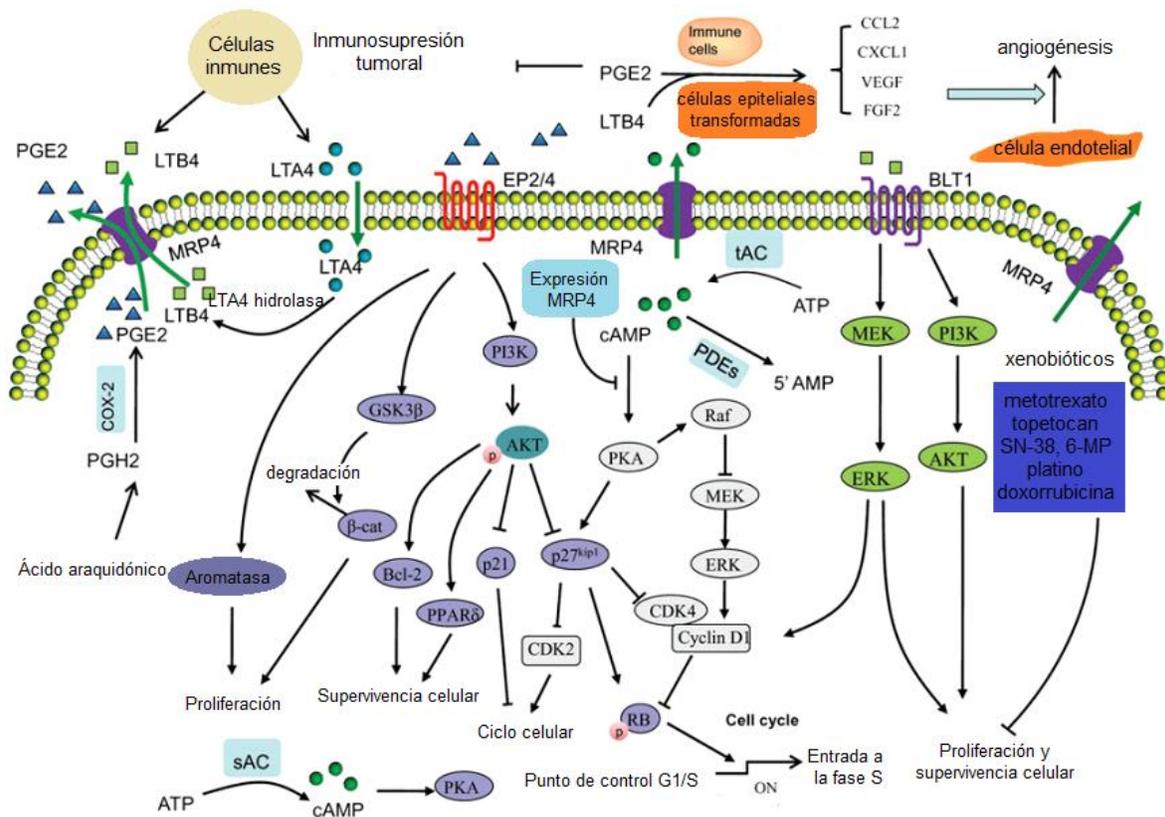


Figura 10. Vías de señalización relacionadas con MRP4. La sobreexpresión de MRP4 en la señalización PKA-AMPC modifica la detención del ciclo celular. Por un lado, la vía de señalización PKA-AMPC inhibe las vías Raf y ERK, lo que provoca la detención del ciclo celular en el punto de control G1. Por otro lado, PKA también inhibe la proliferación a través de la inducción del inhibidor del ciclo celular, P27kip1. En las células cancerosas, MRP4 puede bombear la PGE2 y LTB4. Por un lado, la PGE2 puede conducir a la inmunosupresión y disminución de la inmunidad antitumoral. Por otro lado, la PGE2 y la LTB4 pueden promover la salida de factores angiogénicos de las células inmunitarias y de las células epiteliales transformadas. La PGE2 puede estimular la proliferación y la supervivencia celular a través de su unión a los receptores EP2/4, que a su vez activan la aromatasa, la b-catenina (b-cat) y la PI3K-AKT. La activación de PI3K-Akt por PGE2 puede inhibir además P21 y p27kip1, que participan en la detención del ciclo celular. LTB4 puede unirse a BLT1 y activar PI3K-AKT, así como la señalización Erk, provocando la proliferación y la supervivencia celular. Por último, MRP4 transloca xenobióticos, lo que conduce a la resistencia a los fármacos. GSK, glucógeno sintasa quinasa; FGF, factor de crecimiento de fibroblastos; MEK, proteína quinasa activada por mitógenos; VEGF, factor de crecimiento endotelial vascular (Wen et al., 2015).

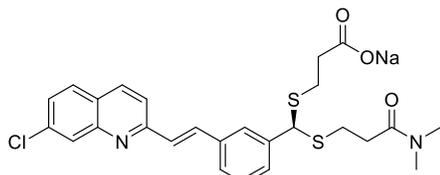
2.4 Inhibidores del MRP4

2.4.1 Inhibidores reportados

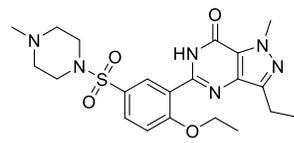
Para bloquear el flujo de los transportadores ABC existen diferentes estrategias, como inhibir al transportador, bloquear una vía de señalización específica que sea responsable de amplificar la sobreexpresión del transportador ABC o dirigirse a los factores de transcripción que regulan la expresión de estas bombas de flujo. Con relación a los inhibidores del transportador ABC, éstos se categorizan en tres generaciones. Los inhibidores ABC de primera generación son aquellos compuestos que ya están aprobados por la FDA para usos médicos. Los de segunda generación equivalen a los compuestos que se desarrollaron como inhibidores de P-gp y los inhibidores de tercera generación comprenden los compuestos desarrollados, los cuales carecen de interacciones farmacocinéticas significativas (Sharma et al., 2021).

Los inhibidores reportados hasta el momento para MRP4, generalmente son de baja potencia y especificidad. Por ejemplo, un compuesto que ha sido clínicamente probado es el inhibidor MK571 (quinolina), sin embargo, se observó que no es específico de MRP4, ya que también inhibe MRP1, MRP2, MRP5 y fosfodiesterasas. Esta tendencia se repite para otros inhibidores mostrados en la Figura 11 (Tian et al., 2005).

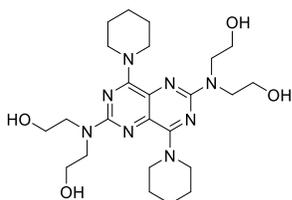
Para la continua búsqueda de nuevos inhibidores de MRP4, se han utilizado diferentes técnicas computacionales y diferentes métodos para determinar su efecto inhibitorio en MRP4. Por ejemplo, a través de un cribado de alto rendimiento con una biblioteca virtual de 30,000 compuestos con amplia cobertura de espacio farmacofórico, a su vez, se les realizó un segundo cribado con la capacidad para mejorar la acumulación intracelular de 6-MP y se consideraron sus características fisicoquímicas óptimas (evaluación de núcleos estructurales, considerar grupos funcionales y facilidad de derivatización química). Ceefourina-1 (pirazolopirimidina) y ceefourina-2 (quinolinamina) demostraron ser inhibidores altamente selectivos de MRP4 sobre otros transportadores ABC, a su vez, presentaron baja toxicidad y alta estabilidad (Cheung et al., 2014). Adicionalmente, en un estudio donde se evaluó el efecto antiproliferativo y apoptótico de la 6-MP en presencia de la ceefourina 1 mostró un efecto aditivo en combinación con el 6-MP en células Jurkat (Becerra et al., 2022). Del mismo modo, en un nuevo cribado consideraron 3600 compuestos aprobados por la FDA o compuestos bioactivos con un mecanismo de acción definida y seleccionaron 36 compuestos con capacidad inhibitoria en MPR4 para probarlos en un ensayo dosis-respuesta con 6-MP y SN-38 en células HEK293. El dantroleno mostró ser más efectivo en comparación a la tirstofina AG 1478 y glafenina (Cheung et al., 2015).



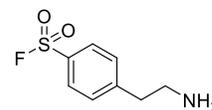
MK571



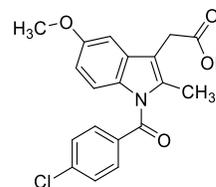
Sildenafil



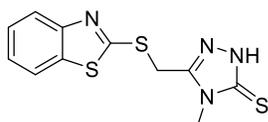
Dipiridamol



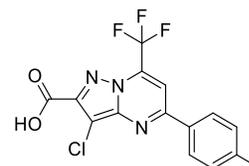
AEBSF



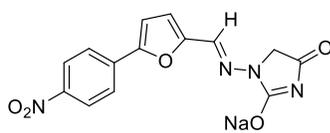
Indometacina



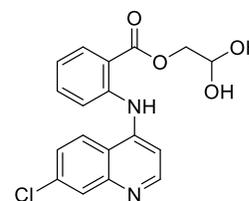
Cefourina-1



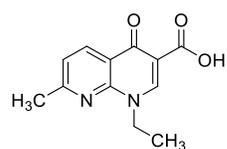
Cefourina-2



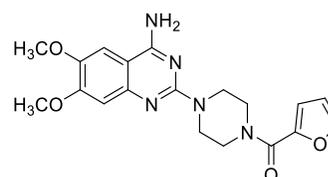
Dantroleno



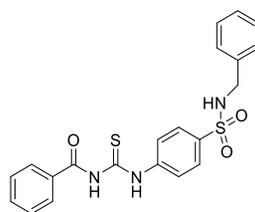
Glafenina



Ácido nalidíxico



Prazosina



Cpd23

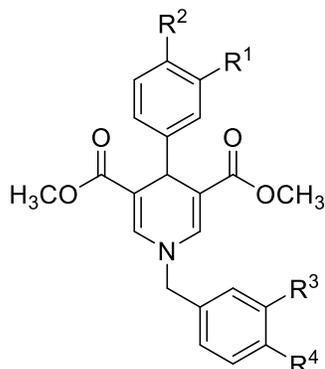
Figura 11. Agentes terapéuticos que actúan como inhibidores de MRP4 (Chen et al., 2018).

Asimismo, en la biblioteca virtual disponible en SPECSchemic se identificaron 39 compuestos, a los cuales se les realizó un ensayo de viabilidad celular con el 6-MP en células HEK293/MRP4, de los cuales, sólo siete de ellos inhibieron al MRP4 en un 55%. El compuesto Cpd23 tuvo un aumento significativo de la acumulación de 6-MP (Chen et al., 2018).

El hallazgo de compuestos con potencial inhibitorio sobre MRP4 también representa un reto en la parte sintética, debido a la complejidad que pueden presentar en su estructura molecular. En este contexto, se han diseñado inhibidores simétricos, como las 1,4-dihidropiridinas con diferentes patrones de sustitución. Se sintetizaron mediante una reacción *one-pot* con tres componentes principales, un aldehído aromático, malonato de metilo, un compuesto de bencilamina y resultaron en los compuestos mostrados en la Tabla 3. Se evaluó su actividad inhibitoria en una línea celular colo357 que sobreexpresa MRP4 frente al sustrato fluorescente, calceína. Los compuestos en presencia de un 4-fenilo disustituidos y un anillo de N-bencilsustituido sus valores de inhibición fueron más significativos (Döring et al., 2021).

Tabla 3. Inhibidores de MRP4 de los compuestos 1,4-dihidropiridinas con diferentes sustituyentes y sus respectivos valores Relación de Actividad de Fluorescencia (FAR, por sus siglas en inglés) (Döring et al., 2021).

Compuesto	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	FAR
4	CF ₃	H	CF ₃	H	1.28
5	CF ₃	H	H	H	1.21
6	CF ₃	H	H	OCH ₃	1.11
7	CF ₃	H	OCH ₃	OCH ₃	1.10
8	H	CF ₃	OCH ₃	H	1.28
9	H	CF ₃	H	OCH ₃	1.11
10	H	CF ₃	OCH ₃	OCH ₃	1.26
11	F	F	OCH ₃	H	1.43
12	F	F	H	OCH ₃	1.40
13	F	F	OCH ₃	OCH ₃	1.23
14	F	H	OCH ₃	OCH ₃	1.21
15	H	F	OCH ₃	OCH ₃	1.12
16	CF ₃	OCH ₃	CF ₃	H	1.19
17	CF ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	1.55
18	CF ₃	OCH ₃	H	OCH ₃	0.95
19	CF ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	1.22
20	OCH ₃	OCH ₃	CF ₃	H	0.98
21	OBn	OBn	CF ₃	H	1.30



2.4.2 Métodos computacionales para el diseño molecular

A pesar de que los inhibidores de MRP4 que se han reportado hasta el momento no son selectivos de esta diana biológica son estructuras que se pueden utilizar para optimizar su respuesta proteína-ligando. Por tanto, para el diseño molecular se pueden utilizar técnicas computacionales que permitan analizar y predecir una posible funcionalidad biológica.

Los dos métodos más utilizados para el diseño de fármacos son el acoplamiento molecular (AM), modelado por homología (HM) y simulaciones de dinámica molecular (DM). Por un lado, el AM es útil para encontrar la orientación más favorable de una molécula. Analiza las posibles conformaciones estructurales, así como los modos de interacción que un ligando puede adoptar con la proteína de interés. El HM permite obtener una estructura tridimensional de proteínas cuya estructura no ha sido resuelta. Por otro lado, la DM estudia los movimientos atómicos de los sistemas con respecto al tiempo. Durante cada simulación, cada partícula interactúa entre sí en un período de tiempo definido, lo que registra una trayectoria en nanosegundos (ns) que describe la evolución del complejo desde una conformación inicial (Altharawi et al., 2021), desde movimientos internos rápidos y cambios conformacionales lentos hasta procesos complejos como la unión de ligandos a un sitio activo o el plegamiento de proteínas.

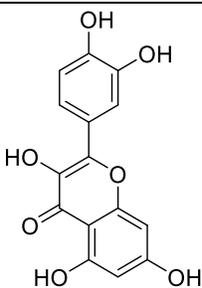
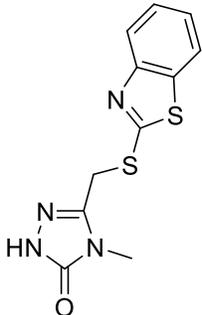
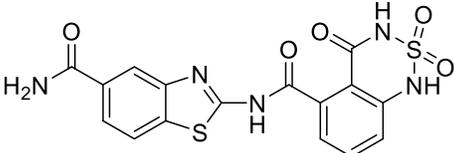
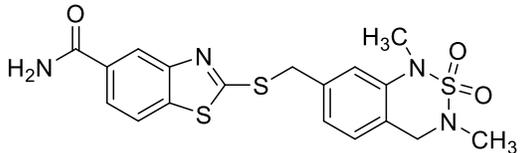
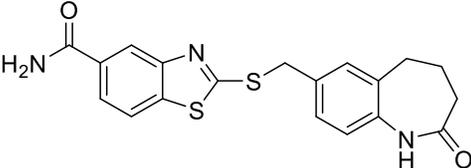
Alternativamente, el AM también se puede usar de manera integrada para lograr objetivos más allá de la predicción del modo de unión proteína-ligando. Por ejemplo, el acoplamiento de ligandos puede ayudar en el diseño computacional o el rediseño de los sitios de unión al alterar las interacciones ligando-proteína (Santos et al., 2019).

2.4.3 Diseño de las moléculas EBD1, EBD9, EBD14

En el Laboratorio de Diseño Asistido por Computadora y Síntesis de Fármacos (DACSiF), Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro se llevó a cabo el diseño de tres moléculas con potencial de inhibir a MRP4. Se utilizó AM de inhibidores fármaco sustratos y sustratos endógenos con la estructura de MRP4 obtenida por HM tomando como plantilla siete distintos modelos, entre ellos, el modelo regulador de conductancia transmembrana de fibrosis quística (CFTR) de pez cebra (código Uniprot Q1LX78), CFTR humano (código Uniprot Q20BH0) (Becerra et al., 2021). El AM se realizó de manera dirigida a residuos relevantes reportados para la unión de los grupos de moléculas mencionados anteriormente. Esto permitió observar los tipos de interacciones entre las moléculas y MRP4, lo cual, permitió el diseño basado en fragmentos de tres estructuras con potencial de inhibición de MRP4 (EBD1, EBD9 y EBD14) las estructuras y los *docking score*

(valor utilizado por los programas computacionales de AM para categorizar las conformaciones obtenidas) se pueden observar en la Tabla 4. Sin embargo, estas moléculas presentaron problemas en sus características fisicoquímicas y alta complejidad sintética, tales como, solubilidad, polaridad, bajos rendimientos, la formación de subproductos no deseados, entre otros. Por lo cual, se decidió optimizar EBD9 y EBD14 y a partir de ahora se nombrarán SHC-2-1 (Fragmento A y C) y SHC-2-2 (Fragmento B y D).

Tabla 4. Valores del *Docking Score* y residuos de interacción de los inhibidores de MRP4 (Becerra et al, 2021). Estructura de la Quercetina y Cefourina-1, utilizadas para el diseño molecular de EBD9, EBD1, EBD14. *NR= No reportado.

Nombre	Estructura	Residuos de interacción MRP4	<i>Docking Score</i> (kcal/mol)
Quercetina		ARG 362 ASN 320 PHE 324 ASP 842	-5.73
Cefourina-1		PHE 368 GLU 103	-7.16
EBD9		THR 839 LEU 836 LYS 702	-11.93
EBD1		NR	-10.49
EBD14		NR	-11.74

3. JUSTIFICACIÓN

La leucemia linfoblástica aguda es un tipo de cáncer que resulta de la proliferación excesiva de linfoblastos, que evitan la producción de otras líneas celulares. En un marco clínico, esta enfermedad afecta aproximadamente el 60% de casos se presentan en niños y adolescentes menores de 20 años y se estima una incidencia anual de 36.2 casos por cada 1 millón de personas. Durante su tratamiento, se pueden llegar a presentar complicaciones que ocasionan una recaída en los pacientes, que generalmente es causada por la resistencia a múltiples fármacos. Dicho fenómeno se correlaciona con la sobreexpresión de un integrante perteneciente a la familia de las proteínas de resistencia a múltiples fármacos (MRP), el transportador de eflujo MRP4. Esta proteína transmembranal, media la salida de varios fármacos quimioterapéuticos y moléculas endógenas, como el AMPc; un segundo mensajero, que en la región intracelular puede favorecer procesos, como la apoptosis. Por ello, una alternativa es incorporar al tratamiento un inhibidor de MRP4, para que estos sustratos puedan ejercer su mecanismo de acción dentro de la célula. Hasta el momento, los inhibidores que se han reportado muestran una baja selectividad a MRP4.

En el laboratorio Diseño Asistido por Computadora y Síntesis de Fármacos de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro en un estudio realizado por Becerra y col. se realizó el diseño de tres nuevas moléculas con potencial inhibitorio, las cuales fueron EBD1, EBD9 y EBD14. Se utilizó una estrategia de diseño basado en fragmentos las cuales presentaron problemas en sus características fisicoquímicas y alta complejidad sintética.

Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo es realizar la optimización estructural de EBD9 y EBD14, la síntesis orgánica e identificación de las nuevas estructuras SHC-2-1 y SHC-2-2.

5. HIPÓTESIS

Las moléculas SHC-2-1 y SHC-2-2, resultado de la optimización por modelado molecular de EBD9 y EBD14, tendrán mejor energía de unión en el sitio de unión inhibitor en complejo con MRP4-ATPs, y a su vez, las rutas sintéticas propuestas por unión de fragmentos facilitarán su obtención

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo General

Realizar la optimización estructural mediante modelado molecular de EBD9 y EBD14, obtener por síntesis química los compuestos SHC-2-1 y SHC-2-2.

6.2 Objetivos específicos

- Determinar las interacciones del complejo proteína-ligando de las moléculas SHC-2-1 y SHC-2-2 por acoplamiento molecular; así como predecir sus propiedades ADME-Tox mediante el servidor en línea SwissADME.
- Calcular la energía de unión de las moléculas EBD9, EBD14, SHC-2-1 y SHC-2-2 mediante simulaciones de dinámica molecular y *Umbrella Sampling*.
- Realizar la síntesis convergente y caracterización de los fragmentos y las moléculas mencionadas, mediante espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C .

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Optimización de los ligandos EBD9 y EBD14

Para facilitar la síntesis por unión de fragmentos de las moléculas EBD9 y EBD14 se optimizó su estructura para favorecer sus características fisicoquímicas. En la Figura 12 se observa que tanto EBD9 como EBD14 tienen un grupo amida unido a su anillo benzotiazol, susceptible a ataques nucleofílicos. Por ende, existe la posibilidad de que los reactivos reaccionen en esta zona. Por lo tanto, se modificó por un grupo más voluminoso, la *terbutilamida*, quien por impedimento estérico es menos susceptible a que ocurra una sustitución química en esta región además de conferirle a la molécula un ambiente más apolar, dando como resultado a las moléculas SHC-2-1 y SHC-2-2. Asimismo, este último cuenta con un grupo carbonilo que, en principio, potenciaría interacciones polares y facilitaría su obtención.

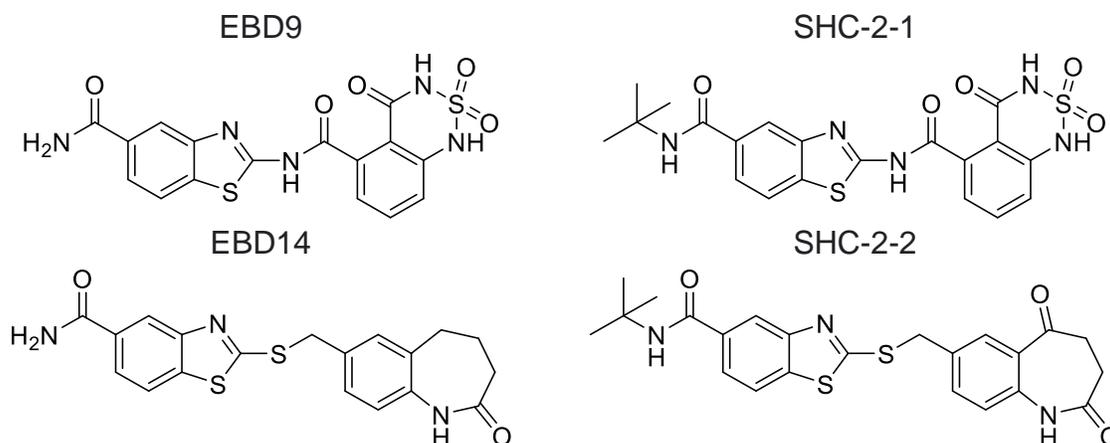


Figura 12. Optimización de las moléculas EBD9 y EBD14

7.2 Acoplamiento dirigido y dinámica molecular de las moléculas optimizadas

Obtención de MRP4

Para el acoplamiento molecular se utilizó la estructura tridimensional de MRP4 perteneciente a la biblioteca de proteínas del DACSiF. Esta estructura se obtuvo mediante modelado por homología utilizando como plantilla MRP1 de *Bos Taurus* (Bovino) (PDB ID; 5UJ9; (Johnson y Chen, 2017)) con una resolución de 3,3 Å y comparten un 36,6% de identidad de secuencia con MRP4 (Becerra et al., 2022).

Acoplamiento molecular de ATP

Para el acoplamiento molecular de los ATPs se generó un *grid* considerando que su sitio de unión está en la región NBDs, donde se ha reportado que se hidrolizan los ATPs, las coordenadas para ATP1 y ATP2 se indican en la Tabla 5. En una *GridBox* de 80x80x80 centrada en los NBDs. Posteriormente, se realizó el acoplamiento molecular utilizando AutoDock-GPU 1.5.3 (Santos-Martins et al., 2021). Se realizaron un total de 100 corridas y 100 000 000 de evaluaciones con el algoritmo genético lamarckiano y el método de búsqueda local Solis-Wets.

Simulación de relajación del complejo MRP4-ATPs

El sistema para la dinámica molecular se construyó en el servidor público CHARMM-GUI (Qi et al., 2015) con una topología *all-atom*, añadiendo modificaciones postraduccionales, que son glicosilaciones y fosforilaciones. La simulación se realizó en Gromacs 2021.6 (Van Der Spoel et al., 2005) utilizando un ensamblaje isotérmico-isobárico (NPT) con una atmósfera de presión y 310.15 K empleando una temperatura y velocidad de acoplamiento con el término estocástico y un barostato de Parrinello-Rahman (Aguilera y Romo, 2020). El sistema fue sometido a 5 000 pasos de minimización *steepest-descent* seguido de un esquema de equilibrio de 6 pasos sugerido por el servidor CHARMM-GUI antes de los pasos de producción. Se utilizó un modelo de agua TIP3P y POPC como lípidos de membrana y se añadieron los correspondientes iones de sodio y cloruro (NaCl 0.15 M). Se utilizó el módulo Clúster de Gromacs 2021.6 (Van Der Spoel et al., 2005) para encontrar las conformaciones relevantes durante la simulación con el algoritmo Gromos. Los gráficos RMSD se construyeron con R utilizando las bibliotecas ggplot2 (The R Core Team, 2018) (Villanueva y Chen, 2019). Para los estudios posteriores se continuó con dicha estructura representativa del clúster más numeroso de la simulación MRP4-ATPs.

Acoplamiento de los ligandos de interés

Los ligandos EBD9, EBD14, SHC-2-1 y SHC-2-2 se construyeron en su conformación 3D y se optimizaron, en su conformación 3D, utilizando el campo de fuerza OPLS-2005 en el programa Maestro Schrödinger (*Schrödinger Release 2020-1: Desmond Molecular Dynamics System, D. E. Shaw Research, 2020*). Estos ligandos se evaluaron en los *grids* 2, 3, 4 y 5 en la región transmembranal, construidos con AutoGrid 4.2.6, mostradas en la Tabla 5. Con el fin de encontrar el mejor sitio de unión. Posteriormente, se evaluaron en AutoDock-GPU 1.5.3 y se utilizaron 200 corridas y 100 000 000 de evaluaciones con el algoritmo genético lamarckiano y el método de búsqueda local Solis-Wets (Martins et al., 2021).

Grid	Coordenadas	Número de puntos	Spacing	Sitio de unión
1	ATP1 x=70.59, y=94.39, z=60.76 ATP2 x=88.54, y=59.73, z=39.1	80x80x80	0.375	NBD1 y NBD2
2	x=51.38, y=70.43, z=75.99	80x80x80	0.375	Interacción EBD9
3	x=48.63, y=50.26, z=66.71	80x80x80	0.375	Sustrato endógeno
4	x=56.19, y=53.57, z=68.53	80x80x80	0.375	Sustrato fármaco
5	x=55.48, y=50.2, z=61.83	80x80x80	0.375	Inhibidor

Simulación del complejo MRP4-ATPs y ligandos

Los sistemas de los complejos MRP4-ATPs y ligandos para la dinámica molecular se construyeron en CHARMM-GUI bajo los mismos criterios utilizados anteriormente para el complejo MRP4-ATP, con una membrana lipídica de tipo POPC y se adicionó agua TIP3P y los iones de cloruro de sodio (NaCl 0.15 M). La simulación se realizó en Gromacs 2021.6 (Van Der Spoel et al., 2005) utilizando un ensamblaje isotérmico-isobárico (NPT) con una atmósfera de presión y 310.15 K, para obtener el clúster más numeroso y los diagramas de interacción de ligandos y los gráficos RMSD que se construyeron con R utilizando las bibliotecas ggplot2 (Villanueva & Chen, 2019).

Simulaciones de tipo Umbrella Sampling

A partir de la conformación representativa del clúster más numeroso (C1) de los complejos MPR4-ligandos se construyeron los sistemas en CHARMM-GUI para las simulaciones de tipo *Umbrella sampling*, se utilizó un modelo de agua TIP3P y una membrana de tipo POPC y se añadieron los correspondientes iones de sodio y cloruro (NaCl 0.15 M), se continuó con las opciones predeterminadas del programa, 5000 pasos de minimización *steepest-descent* seguido de 6 pasos de equilibrio y finalmente los pasos de producción. Se calculó la energía de unión mediante la diferencia en el aumento de distancia entre el centro de masa del ligando y la proteína MRP4 en el eje z a una velocidad de 0.06 nm/ns y con una fuerza de 1000 kJ/mol-nm², y se construyó un histograma de fuerza potencial media.

7.3 Predicción de las propiedades ADME-Tox

Mediante el servidor web *SwissADME* (Daina et al., 2017) se evaluaron los Fragmentos A, B, C y D, EBD9, EBD14, SHC-2-1 y SHC-2-2, para explorar sus características fisicoquímicas y perfil ADME-Tox.

7.4 Síntesis de SHC-2-1 y SHC-2-2

Se sintetizaron las moléculas SHC-2-1 y SHC-2-2 (Figura 12); las rutas sintéticas propuestas se realizaron mediante métodos sintéticos simples, con rutas convergentes, basadas en criterios de ahorro de energía relacionados a la química verde. Se continuó con su purificación mediante el método de recristalización, y se hizo un monitoreo mediante cromatografía en capa fina para controlar la evolución de la reacción.

La elucidación estructural, se llevó a cabo mediante una técnica espectroscópica, la resonancia magnética nuclear de protón adquirido en un equipo Aligent de 400 MHz en la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Xochimilco por el Dr. Ernesto Sánchez.

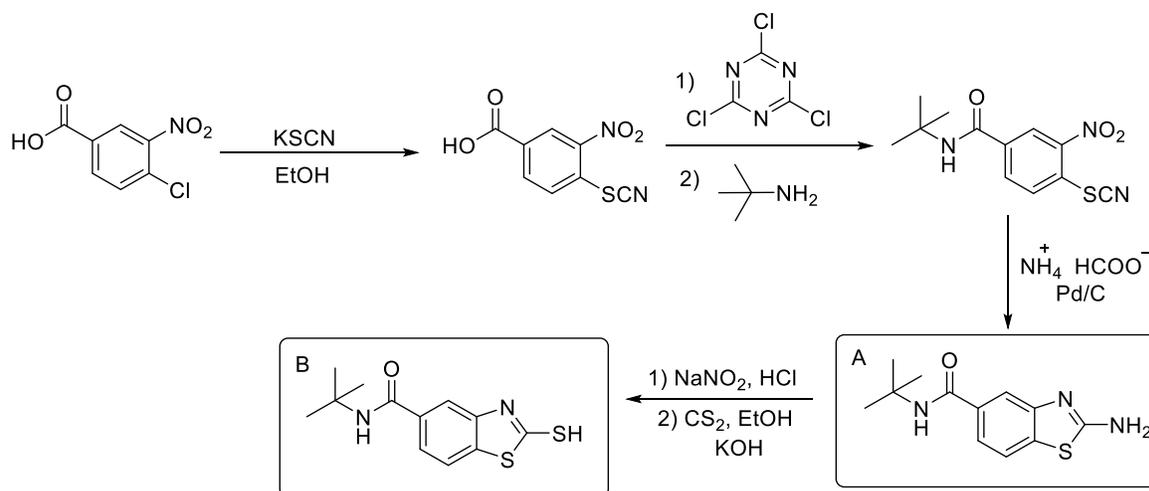


Figura 13. Propuesta de ruta sintética para la obtención del fragmento A y B.

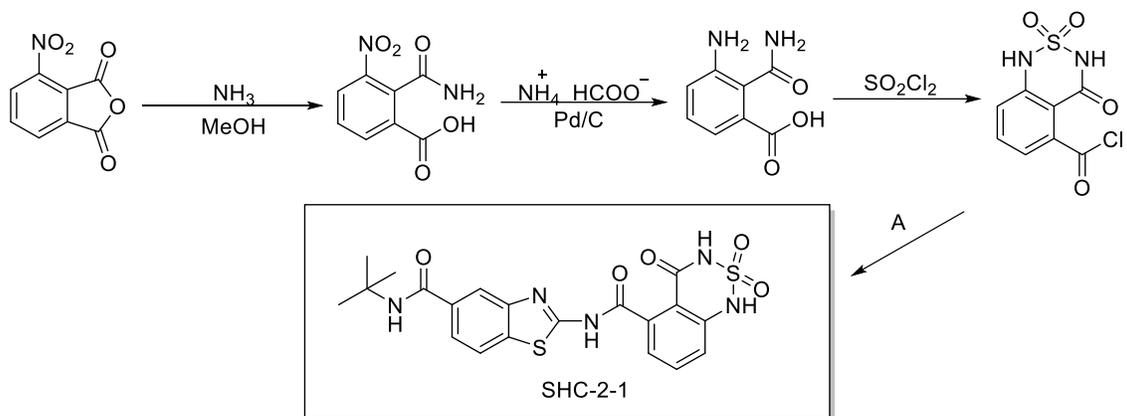


Figura 14. Propuesta de ruta sintética de la molécula SHC-2-1.

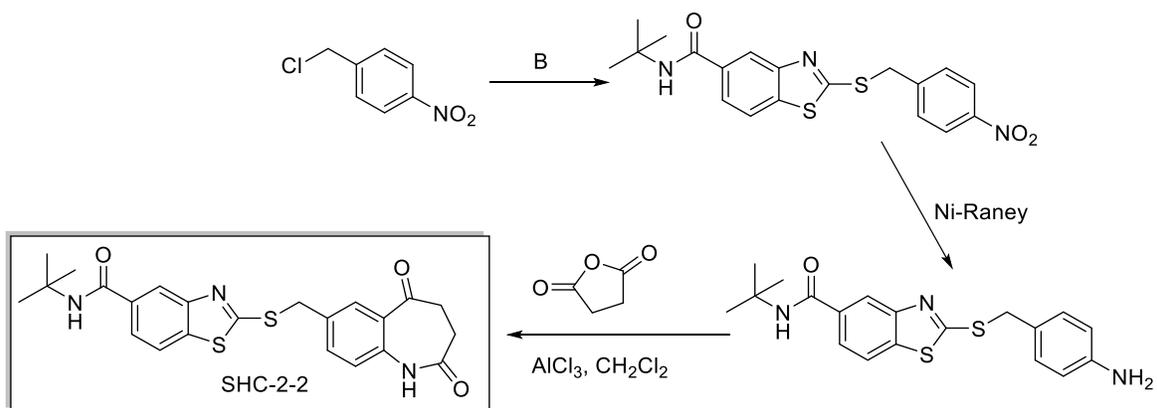


Figura 15. Propuesta de ruta sintética de la molécula SHC-2-2.

8. Resultados y Discusión

8.1 Construcción y relajación del complejo MRP4-C1-ATPs

El MRP4 es un transportador que se conforma por los dominios TMDs y NBDs, estructuralmente es una apo-forma, es decir, que adopta una conformación orientada hacia adentro (Chen et al., 2022). Para cada dominio de NBD se localiza una molécula de ATP que le facilita a la proteína un cambio conformacional y ocurra el eflujo de los sustratos.

A través de los años se ha especulado en el funcionamiento del motor molecular del transportador MRP4. Es decir, el comportamiento de los ATPs una vez que llegan a región de los NBDs y ocurra eventualmente la traslocación de los sustratos. Por un lado, el primer mecanismo propuesto es el modelo de "interruptor". En la llegada del sustrato a la región TMD desde el citoplasma, simultáneamente dos moléculas de ATP se unen a los monómeros (NBDs) e induce la formación del dímero. Por lo tanto, pasa de una conformación orientada hacia adentro a una orientada hacia afuera y en la hidrólisis de los ATPs se induce la separación del dímero. Por otro lado, el modelo de "contacto constante" propone que los NBD se abren secuencialmente en cuanto sucede la hidrólisis de los ATPs. En cuanto, se libera el P_i (ion fosfato inorgánico) y el ADP, puede llegar otra molécula de ATP a unirse, sin necesidad de que los monómeros se separen completamente (Yanef et al., 2017).

Sin embargo, un estudio reciente basado en crio-microscopía electrónica de alta resolución ha revelado que la unión de las moléculas de ATP induce un reordenamiento conformacional en la región del TMD, dando como resultado una orientación hacia afuera y la hidrólisis de ATP, el transportador regresa a un estado de reposo, listo para un nuevo ciclo de transporte (Huang et al., 2023).

Por lo tanto, para los posteriores estudios computacionales, se requería utilizar una proteína funcional, un MRP4 con sus respectivos ATPs en cada uno de los NBDs. Las coordenadas utilizadas para posicionar a los ATPs en una caja de 80x80x80 en el dominio NBD, fueron $x=70.59$, $y=94.39$, $z=60.76$, para ATP1 y $x=88.54$, $y=59.73$, $z=39.1$ para ATP2. En el acoplamiento molecular, se realizaron 100 corridas y 100 000 000 de evaluaciones en AutoDock-GPU 1.5.3 y con el objetivo de relajar la proteína en presencia de los ATPs. En la Figura 16 se pueden observar los diagramas de interacción que nos señala que los ATPs se encuentran en un ambiente hidrófobo dentro de los NBDs.

Una vez obtenido el complejo MRP4-ATPs se prosiguió con una simulación de 100 ns en el programa Gromacs 2021.6 utilizando un ensamble NPT con una atmósfera de presión y 310.15 K, el sistema se minimizó previamente en 5 000 pasos y se equilibró en 6 pasos que están predeterminados en el servidor CHARMM-GUI. Para el sistema se utilizó un modelo de agua TIP3 y POPC como lípidos de membrana y se adicionaron 0.15 M de NaCl.

El comportamiento de la proteína en presencia de los ATPs se puede visualizar en el gráfico RMSD, mostrada en la Figura 17. Durante la trayectoria de los 100 ns, se puede observar que la proteína se estabiliza a los 50 ns, sin embargo, se muestra un ligero cambio a los 75 ns aproximadamente, y se mantiene con un movimiento estable el resto de la simulación. Mientras que los ATPs, se estabilizan a la par a los 30 ns y tiene un cambio a los 87 ns, para volverse a estabilizar a los 90 ns. Hasta el momento, podemos inferir que sin la presencia de sustratos en la región TMD, tanto la proteína como sus ligandos se mantienen estables.

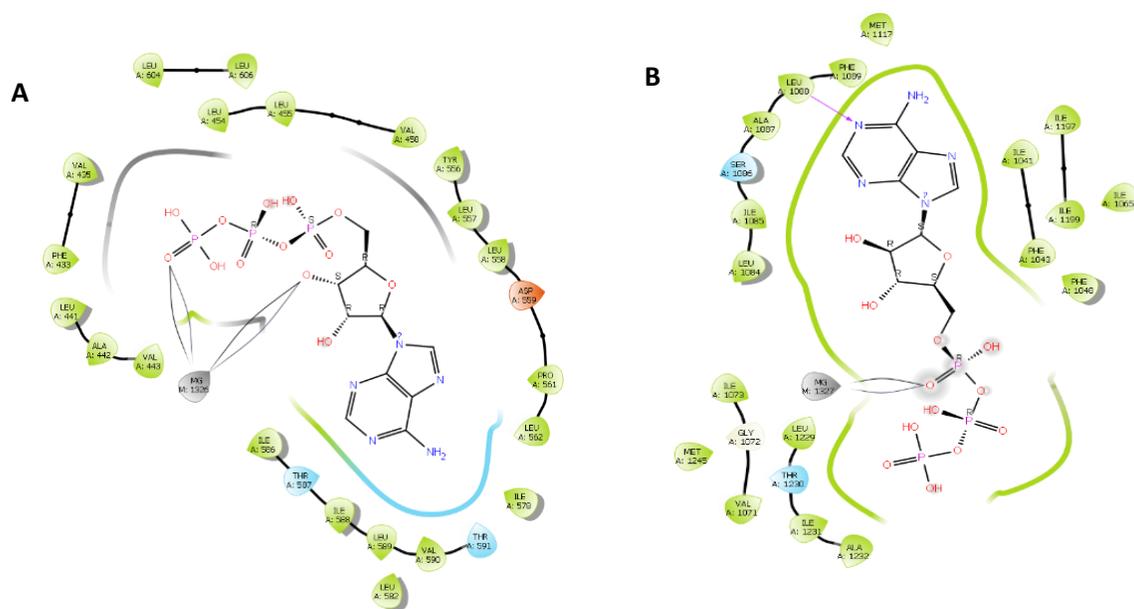


Figura 16. Diagrama de interacción del ATP1 en NBD1 (A) y ATP2 en NBD2 (B). Residuos en color verde indican un ambiente hidrofóbico. Residuos en color azul favorecen un ambiente hidrofílico.

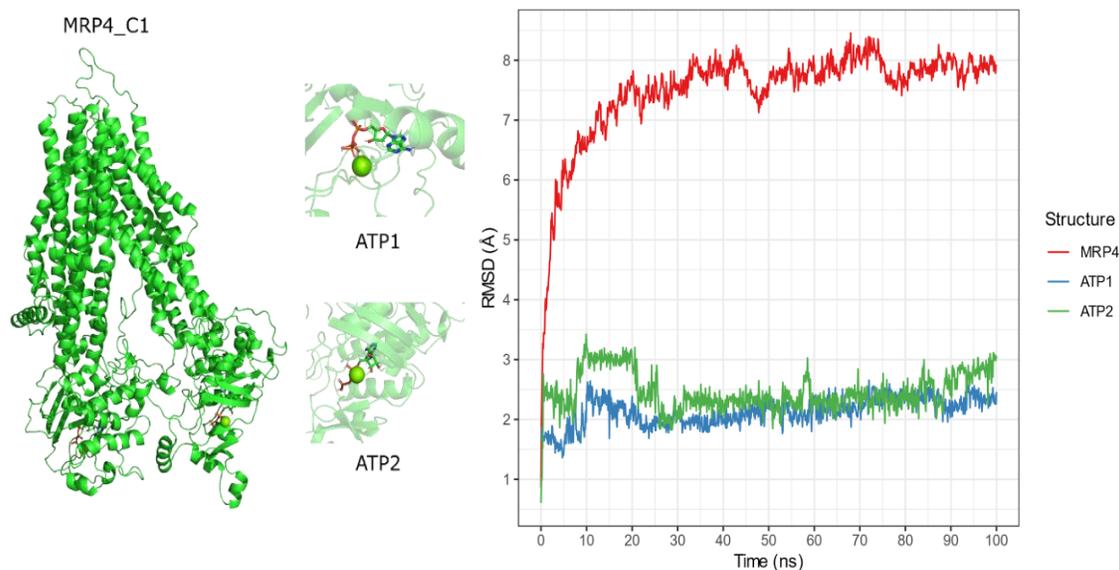


Figura 17. Estructura tridimensional del MRP4 C1 con la unión del ATP1 en NBD1 y ATP2 en NBD2. RMSD de la proteína con los ligandos; ATP1 (azul) y ATP2 (verde).

8.2 Control de calidad entre MRP4 M y MRP4 C

Tabla 6. Valores del control de calidad de los modelos de MRP4		
Código Uniprot	Z-Score	Favorecido de Ramachandran
<i>MRP4 M</i>	-3.72 ± 0.20	83.60%
<i>MRP4 C1</i>	-2.38 ± 0.19	92.52%

Una vez que se logró unir ambas moléculas de ATP en los dominios NBDs y obtener el clúster más representativo, se evaluó la calidad del modelo el MRP4 C1 (modelo con ATPs) contra la estructura de la cual se partió el estudio y que fue obtenida por modelado por homología, MRP4 M (Becerra et al., 2022). Se compararon sus métricas de validación: z-score y el porcentaje de residuos favorecidos en el diagrama de Ramachandran obtenido del servidor MolProbity, mostrados en la Tabla 6.

Por un lado, el valor del z-score describe qué tan "normal" un modelo es comparado con un set de estructuras tridimensionales de referencia de alta resolución que han sido previamente reportadas. Aquellos z-score que se encuentran más allá de -3 o +3 corresponden a estructuras geoméricamente improbables. En caso de tener valores entre -3 a -2 o de 2 a 3, corresponde a un modelo que es un modelo

aceptable, y aquellos que se encuentren entre los -2 y 2 indican una geometría normal. De acuerdo, al z-score que se obtuvo del MRP4 C1 es un valor que se encuentra entre -3 a 2, es decir, que los valores de C1 están dentro del rango. Por otro lado, el porcentaje de residuos en la región de favorecidos para el modelo del MRP4 C1 es del 92.52%, un valor 8.92 % más significativo en comparación al valor que obtuvo el MRP4 M. Por lo tanto, al considerar que el modelo MRP4 C1 tiene parámetros de calidad aceptables, se continuaron los siguientes estudios con el mismo (Sobolev et al., 2020).

8.3 Acoplamiento y simulación de los ligandos

Una vez que se obtuvo la estructura 3D del MRP4 con sus respectivos ATPs, se prosiguió con el acoplamiento molecular de los ligandos. Se estableció una caja de 80x80x80 en la región de los TMDs, y las coordenadas para cada uno de los sitios de unión. Para el sitio de unión EBD9, sus coordenadas fueron x=51.38, y=70.43, z=75.99; x=48.63, y=50.26, z=66.71 para el sitio de unión sustrato endógeno; x=56.19, y=53.57, z=68.53 para el sitio de unión sustrato fármaco y x=55.48, y=50.2, z=61.83 para el sitio de unión inhibidor. Posteriormente, se obtuvieron los resultados del *docking score* (DS) de la mejor conformación (Best Cluster, BC) para cada uno de los sustratos, mostradas en la Tabla 7 en los diferentes sitios de unión.

Tabla 7. *Docking score* de los ligandos en los diferentes sitios de unión de MRP4 (BC).

Ligandos	Sitio de unión (kcal/mol)			
	Sustrato endógeno	Sustrato fármaco	Sustrato inhibidor	EBD9
Ceefourina-1	-5.64	-6.79	-5.56	-6.70
Quercetina	-8.78	-9.01	-8.90	-6.95
EBD9	-5.94	-4.99	-8.50	-6.78
EBD14	-7.16	-7.23	-7.23	-5.44
SHC-2-1	-9.15	-7.56	-7.79	-8.09
SHC-2-2	-6.54	-8.08	-8.92	-7.86

Debido a que los ligandos que se evaluaron son inhibidores, para la dinámica molecular se utilizó la conformación BC que se obtuvo en el sitio de unión inhibidor. Sin embargo, es importante considerar que a medida que el valor de DS disminuye, la conformación se considera energéticamente estable. En consecuencia, los ligandos quercetina y SHC-2-1 exhiben un DS mayor en comparación a los demás sitios de unión, diferenciándose en 1 o 2 kcal/mol. Por lo tanto, se seleccionó la conformación de la quercetina en sustrato fármaco y SHC-2-1 como sustrato endógeno. En el caso de la ceefourina-1 su conformación BC en todos sus sitios de unión no tiene un valor significativo como los demás ligandos, por lo que, se decidió también evaluar la conformación de menor energía (LE) en el sitio de unión inhibidor, que reportó un DS de -6.90 kcal/mol.

8.4 MRP4-C1-Ligandos selectos

8.4.1 Complejo MRP4 C con quercetina y ceefourina-1

En la Figura 18 se muestra el diagrama de interacción del ligando ceefourina-1 en el sitio de unión inhibitor, el cual no señala ningún tipo de interacción, sólo indica que está rodeado por un ambiente hidrofóbico, sin embargo, podemos observar que no se favorece debido a que durante la dinámica la ceefourina-1 se encuentra fuera del sitio de unión en el dominio TMD. Ello podría explicar porque en el gráfico RMSD, de la Figura 19, como el ligando muestra movimiento muy abrupto, se estabiliza a los 35 ns y se mantiene así por el resto de la trayectoria, a la par con la proteína y sus ATPs.

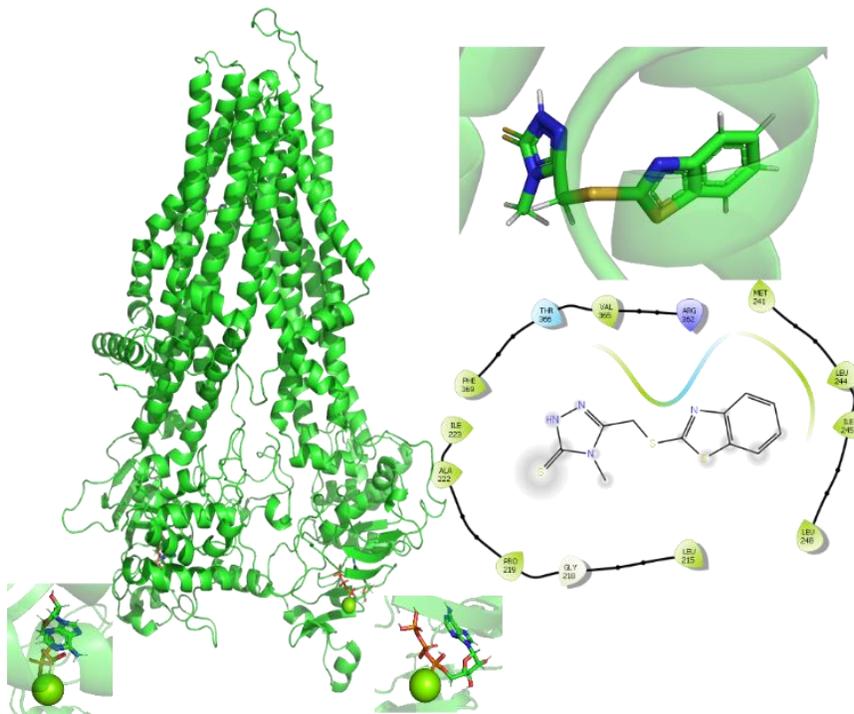


Figura 18. Acoplamiento molecular del ligando ceefourina-1 en el sitio de unión inhibitor de su mejor conformación. A) Diagrama de interacción de la ceefourina-1 BC en el sitio de unión Inhibidor (línea verde: región hidrofóbica y línea azul: región hidrofílica). B) Mejor conformación (BC) de la Ceefourina-1 en el dominio TMD y ATPs en los dominios NBDs.

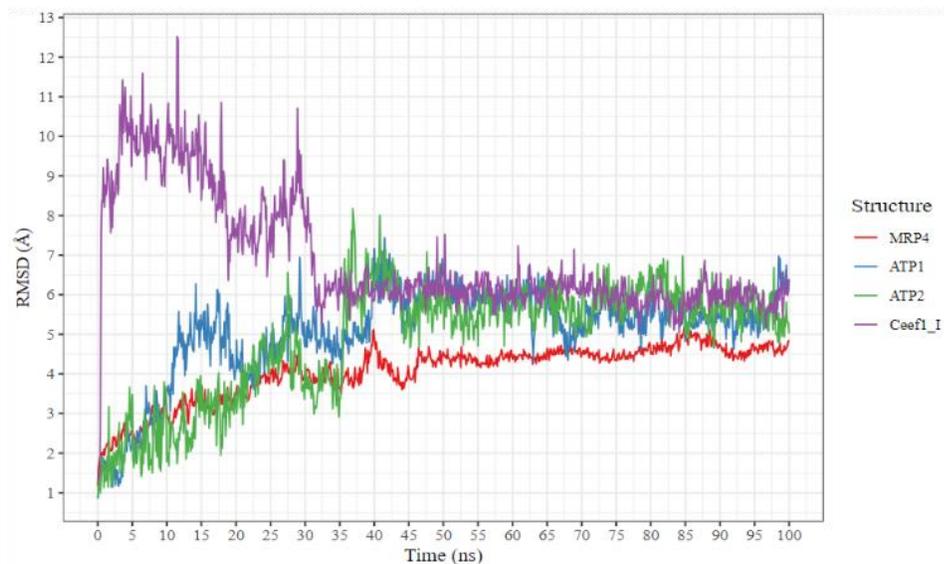


Figura 19. Dinámica molecular de ceefourina-1 en el sitio de unión inhibitor de su mejor conformación. RMSD de una trayectoria de 100 ns para ceefourina-1 BC (Morado), MRP4 (rojo), ATP1 (azul), ATP2 (verde).

La ceefourina-1 obtenida de la conformación de LE, el diagrama de interacción indica una interacción de tipo pi-pi entre el anillo aromático y el residuo Arg 782, donador de enlaces de hidrógeno (HBD) y aceptor de enlaces de hidrógeno (HBA) por parte de los grupos aminos con los residuos Asp 842, Trp 995, mostrados en la Figura 20. No obstante, en el gráfico RMSD (Figura 21) la ceefourina-1 se estabiliza hasta los 55 ns. La proteína alcanza estabilidad a los 25 ns, mientras que el ATP1 mantiene un movimiento constante a partir de los 70 ns. En contraste, el ATP2 permanece estable desde los 25 ns, pero experimenta desestabilización a partir de los 70 ns.

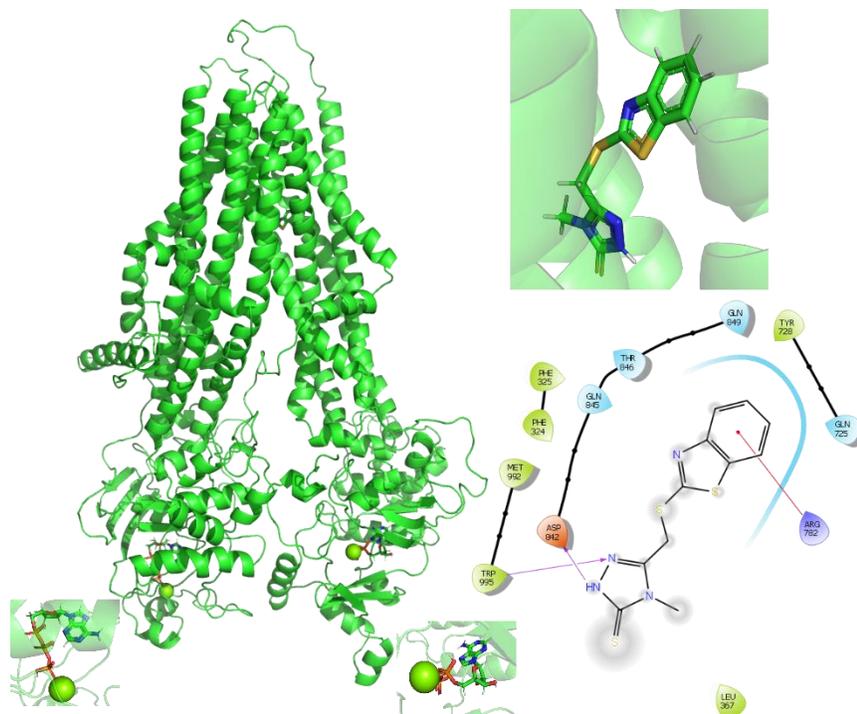


Figura 20. Acoplamiento molecular del ligando ceftiofurina-1 en el sitio de unión inhibidor de baja energía. A) Diagrama de interacción de la ceftiofurina-1 LE en sitio de unión inhibidor (línea azul: región hidrofílica, flecha rosa: HBD o HBA, línea-punto roja: interacción pi-cación). B) conformación de menor energía (LE) de la ceftiofurina-1 en el dominio TMD y ATPs en los dominios NBDs.

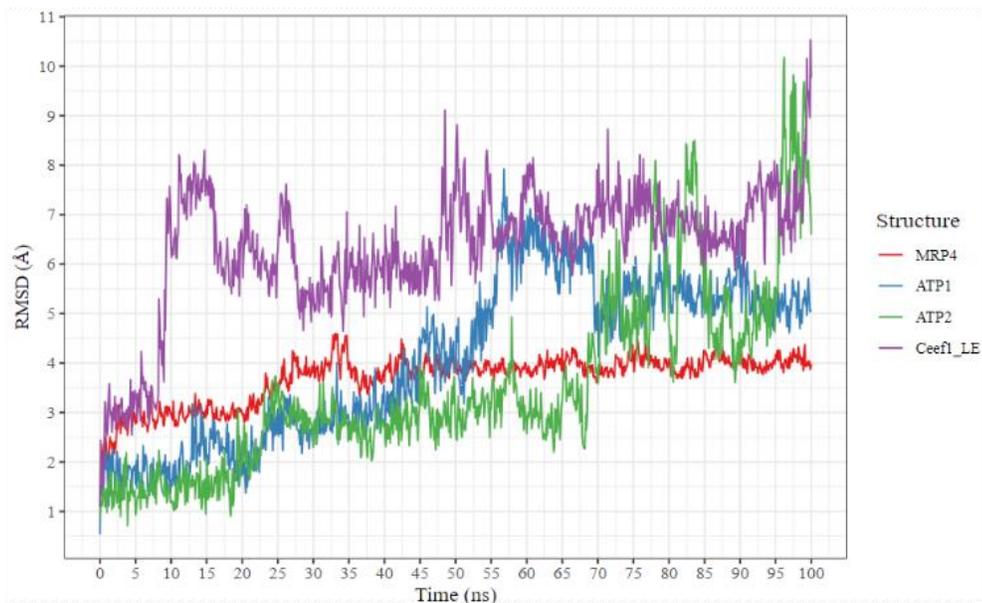


Figura 21. Dinámica molecular de ceftiofurina-1 en el sitio de unión inhibidor. RMSD de una trayectoria de 100 ns para ceftiofurina-1 LE (Morado), MRP4 (rojo), ATP1 (azul), ATP2 (verde).

La quercetina en el sitio de unión inhibitor, en la Figura 21 se muestra que tiene una interacción con Phe 324 y una adicional de tipo donador de enlaces de hidrógeno (HBD) con Arg 782. A su vez, en el gráfico de RMSD se mantenía estable durante los primeros 45 ns y tiene un movimiento exponencial a los 65 ns, para volverse a estabilizar a los 85 ns. Mientras que los ATPs y la proteína se mantienen estables durante la simulación (Figura 23).

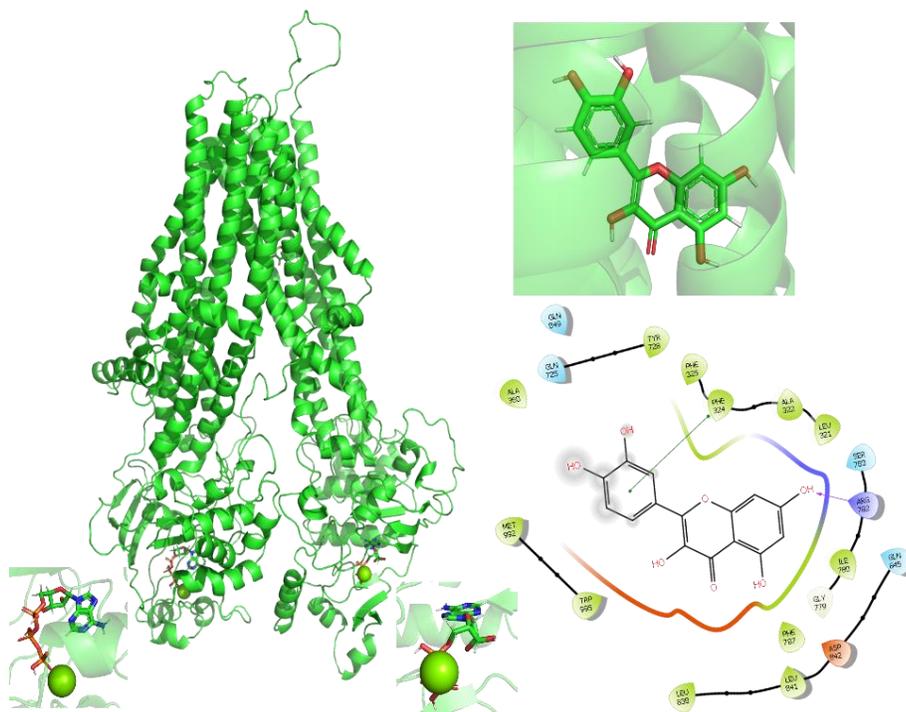


Figura 22. Acoplamiento molecular del ligando quercetina en el sitio de unión inhibitor. A) Diagrama de interacción de la quercetina en sitio de unión inhibitor (línea verde: región hidrofóbica, línea azul: región hidrofílica flecha rosa: HBD o HBA, punto-línea-punto verde: interacción pi-pi). B) Conformación de la quercetina en el dominio TMD y ATPs en los dominios NBDs.

En el sitio de unión fármaco, la quercetina reporta una interacción pi-pi entre el anillo aromático con el residuo Trp 995 (Figura 24). El gráfico RMSD de la quercetina del sustrato fármaco (Figura 25), el ligando se mantiene estable desde el inicio de la simulación hasta los 27 ns y hay un movimiento abrupto para estabilizarse a los 35 ns y un ligero cambio después de los 80 ns hasta los 100 ns.

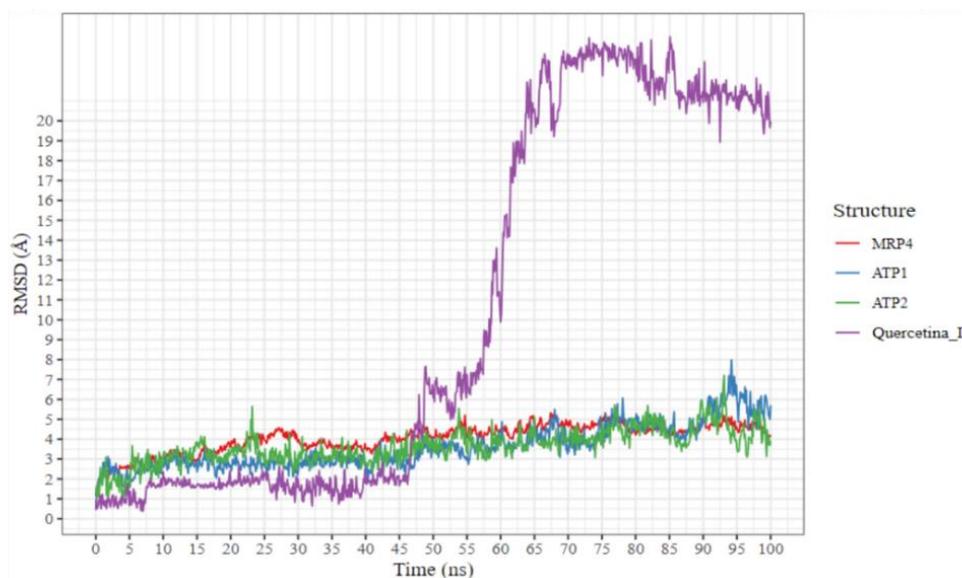


Figura 23. Dinámica molecular de quercetina en el sitio de unión inhibitor. RMSD de una trayectoria de 100 ns para quercetina sustrato inhibitor (Morado), MRP4 (rojo), ATP1 (azul), ATP2 (verde).

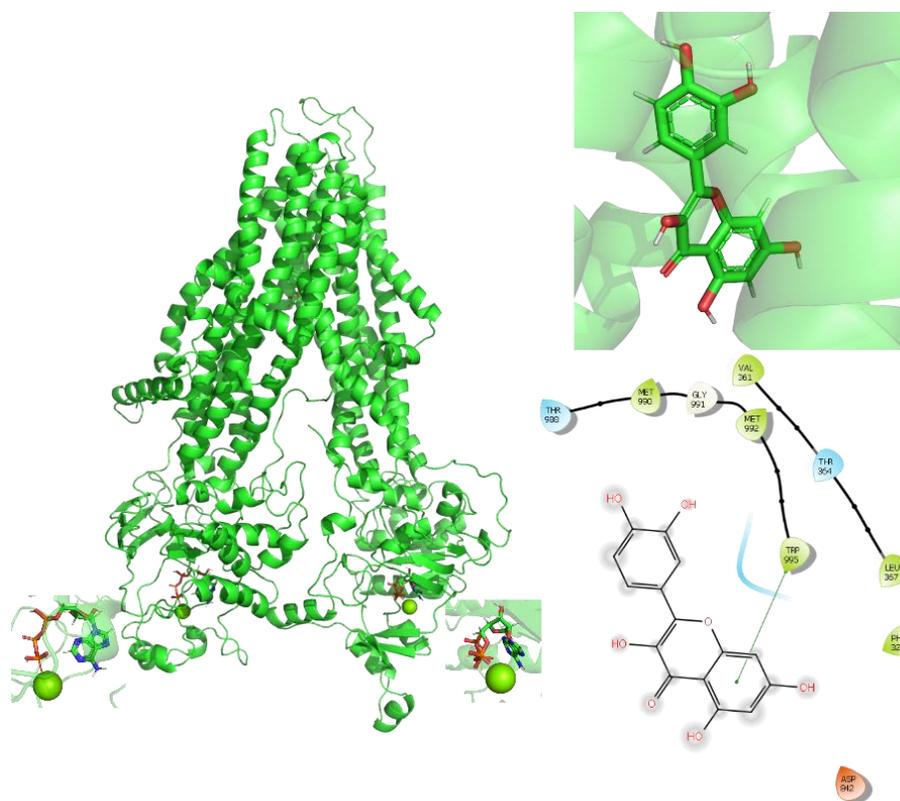


Figura 24. Acoplamiento molecular del ligando quercetina en el sitio de unión sustrato fármaco. A) Diagrama de interacción de la quercetina en sitio de unión sustrato fármaco (punto-línea-punto verde: interacción pi-pi). B) Conformación de la quercetina en el dominio TMD y ATPs en los dominios NBDs.

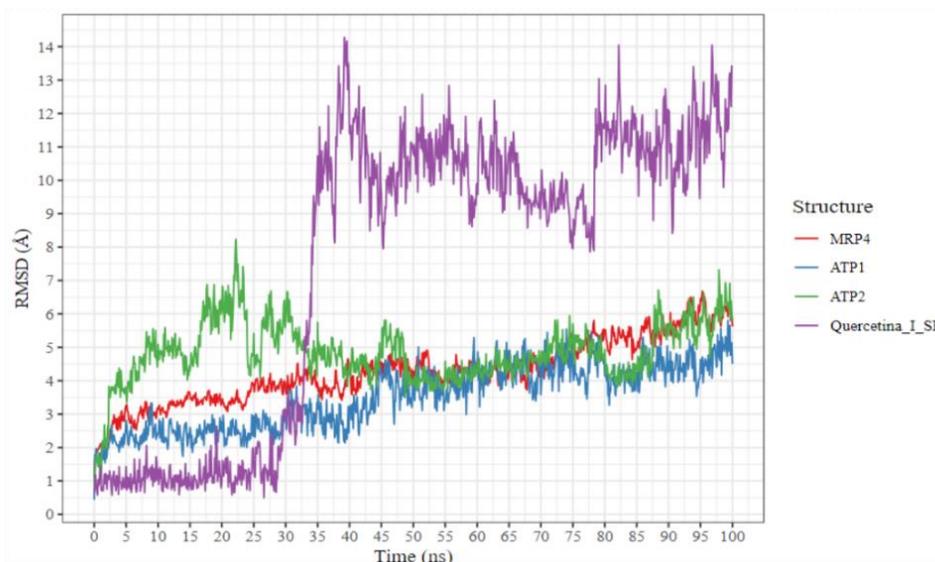


Figura 25. Dinámica molecular de quercetina en el sitio de unión sustrato fármaco. RMSD de una trayectoria de 100 ns para quercetina sustrato fármaco (Morado), MRP4 (rojo), ATP1 (azul), ATP2 (verde).

8.4.2 Complejo MRP4 C con EBD9 y EBD14

En la Figura 26 se observa que la conformación que adopta la molécula EBD9 se favorece una única interacción HBD con el residuo Arg 782 que lo otorga el grupo amida. Durante la simulación de 100 ns, por un lado, EBD9 se mantiene estable a partir de los 5 ns a los 34 ns, después hay un ligero cambio a los 40 ns hasta los 70 ns, nuevamente ocurre otro cambio a los 85 ns hasta el final de los 100 ns. Por otro lado, la proteína y el ATP1 se estabiliza a los 15 ns. Mientras que el ATP2, se mantiene con un movimiento constante (Figura 27).

Para el caso de la molécula EBD14 se indican dos interacciones de tipo HBD, uno que lo otorga la amida con el residuo Lys 329 y el amino del grupo mercaptobenzotiazol con el residuo Ser 328, como se muestra en la Figura 28. Se puede observar que EBD14 en conjunto con la proteína y los ATPs, en el gráfico de RMSD (Figura 29) se estabilizan a los 20 ns y sólo se muestra un ligero cambio al final de la simulación.

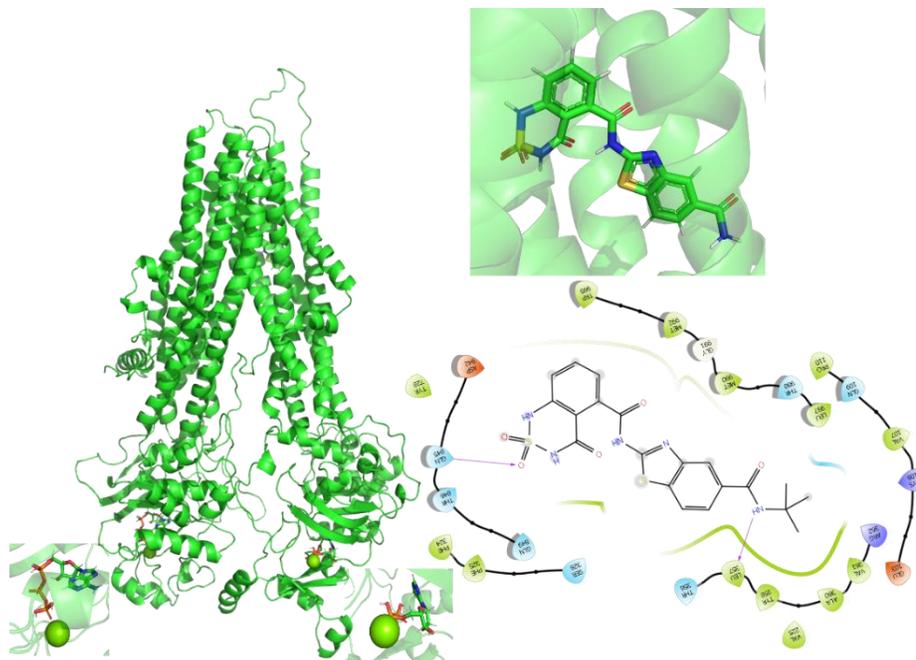


Figura 26. Acoplamiento molecular del ligando EBD9 en el sitio de unión inhibitor. A) Diagrama de interacción de EBD9 en sitio de unión sustrato inhibitor (flecha rosa: interacción HBD). B) Conformación de EBD9 en el dominio TMD y ATPs en los dominios NBDs.

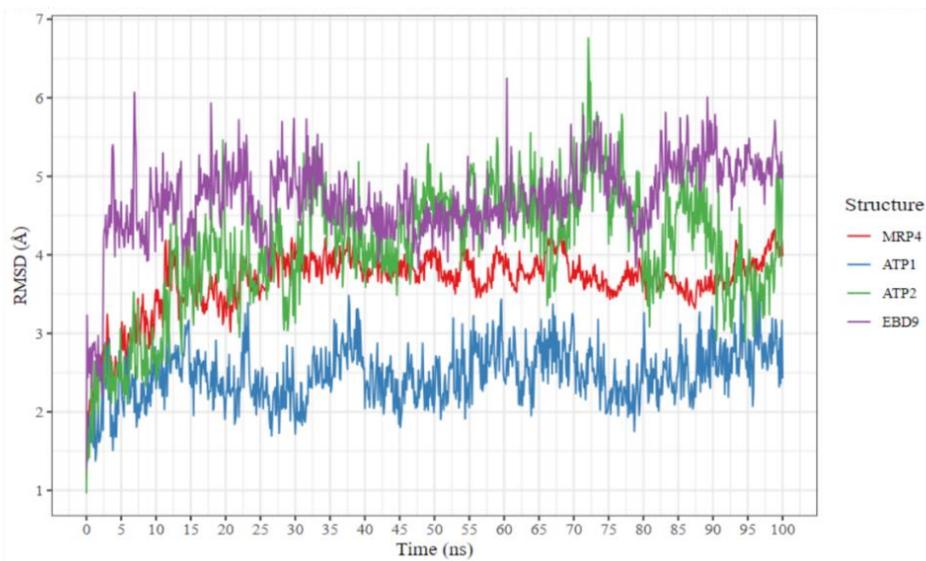


Figura 27. Dinámica molecular de EBD9 en el sitio de unión inhibitor. RMSD de una trayectoria de 100 ns para EBD9 sustrato inhibitor (Morado), MRP4 (rojo), ATP1 (azul), ATP2 (verde).

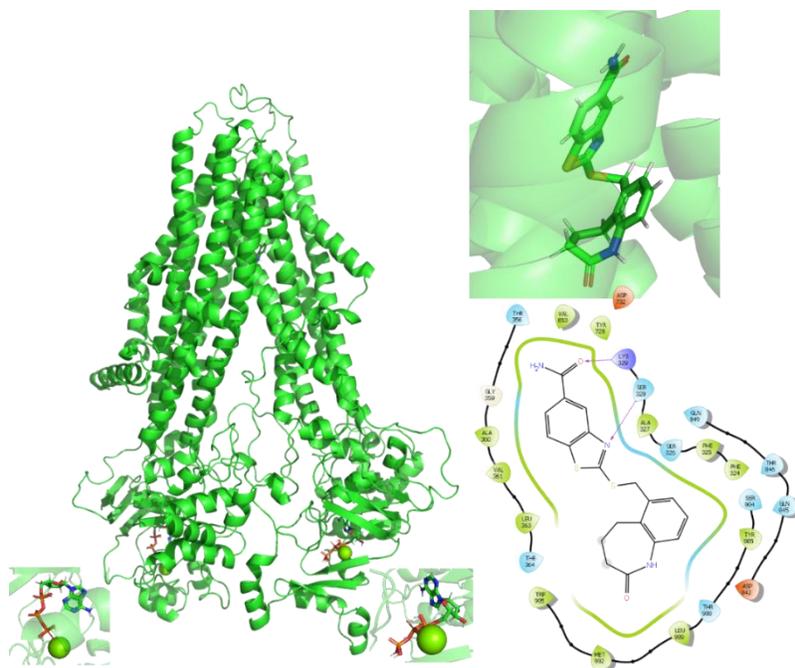


Figura 28. Acoplamiento molecular del ligando EBD14 en el sitio de unión inhibitor. A) Diagrama de interacción de EBD14 en sitio de unión sustrato inhibitor (flecha rosa: interacción HBD). B) Conformación de EBD14 en el dominio TMD y ATPs. en los dominios NBDs.

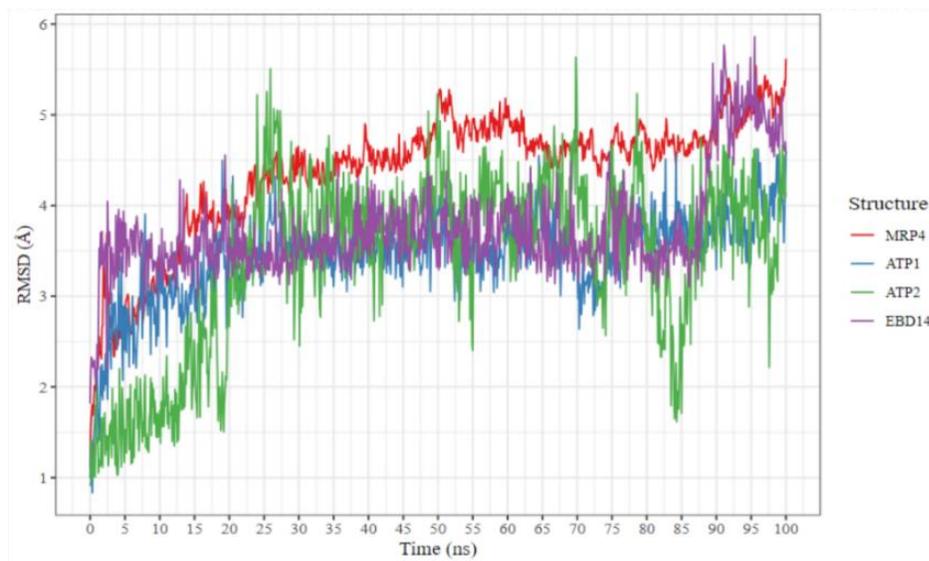


Figura 29. Dinámica molecular de EBD14 en el sitio de unión inhibitor. RMSD de una trayectoria de 100 ns para EBD14 sustrato inhibitor (Morado), MRP4 (rojo), ATP1 (azul), ATP2 (verde).

8.4.3 Complejo MRP4 C con SHC-2-1 y SHC-2-2

La molécula optimizada SHC-2-1 en el sitio de unión inhibitor (Figura 30) se muestra una interacción de tipo pi-pi entre el anillo aromático del Fragmento C y el residuo Phe 368. En el gráfico de RMSD de la Figura 31, el ligando SHC-2-1 se mantiene estable en los primeros 15 ns, después tiene un aumento en su movimiento a los 20 ns, sin embargo, el resto de la trayectoria se mantiene estable. Debido a que en este sitio de unión el *docking score* fue de -7.79 kcal/mol, menor al que se obtuvo en el sustrato endógeno, con un valor de -9.15 kcal/mol. Se optó por comparar los resultados con este nuevo sitio. En la Figura 32, se muestra el diagrama de interacción donde se observa una interacción de tipo HBD por parte del grupo de la terbutilamida (Fragmento A) con el residuo Leu 357 y otra de tipo HBA por parte del Fragmento C con el residuo Gln 845. En el gráfico de RMSD, el MRP4 en conjunto con el ATP1, se mantienen estables a partir de los 36 ns. Mientras que, el ligando se estabiliza en los primeros 11 ns hasta los 74 ns, cuando tiene un movimiento repentino a los 80 ns, sin embargo, regresa a estabilizarse lo que resta de la simulación (Figura 33).

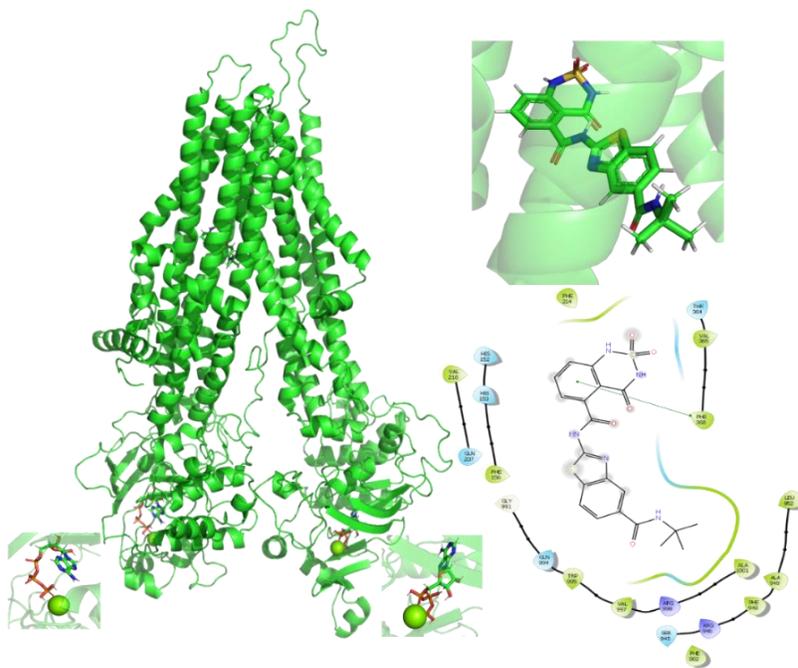


Figura 30. Acoplamiento molecular del ligando SHC-2-1 en el sitio de unión inhibitor. A) Diagrama de interacción de SHC-2-1 en sitio de unión sustrato inhibitor (punto-línea-punto verde- interacción pi-pi). B) Conformación de SHC-2-1 en el dominio TMD y ATPs en los dominios NBDs.

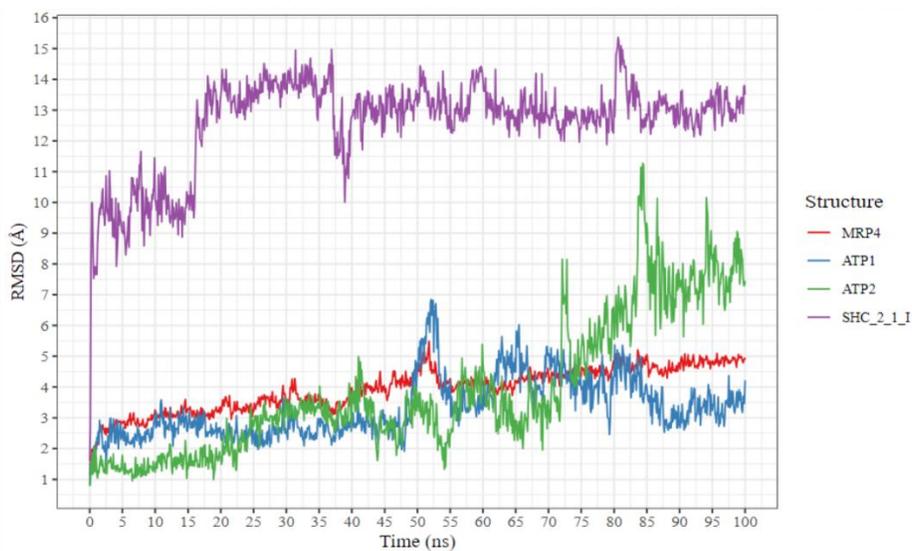


Figura 31. Dinámica molecular de SHC-2-1 en el sitio de unión inhibitor. RMSD de una trayectoria de 100 ns para SHC-2-1 sustrato inhibitor (Morado), MRP4 (rojo), ATP1 (azul), ATP2 (verde).

El diagrama que presentó un mayor número de interacciones fue la molécula SHC-2-2 (Figura 34), en el sitio de unión inhibitor como se muestra en la Figura 34. Por un lado, los anillos aromáticos que conforman el benzotiazol indican una interacción pi-pi con el residuo Trp 995 (Fragmento B). Por otro lado, el Fragmento D, la amida presente en el ciclo heptano, actúa como un HBD con el residuo Phe 325 y un HBA con el residuo Gln 725. En la Figura 35, se puede observar como el ligando al principio tiene demasiado movimiento, hasta que se estabiliza, aproximadamente a los 11 ns y se mantiene constante durante el resto de la simulación. La proteína MRP4, se estabiliza hasta los 23 ns. El ATP1, tiene un movimiento estable desde el inicio de la dinámica hasta los 25 ns, después gradualmente se va estabilizando a los 45 ns hasta el resto de la dinámica. ATP2, se estabiliza a los 7 ns y en los últimos 10 ns de la simulación se desestabiliza.

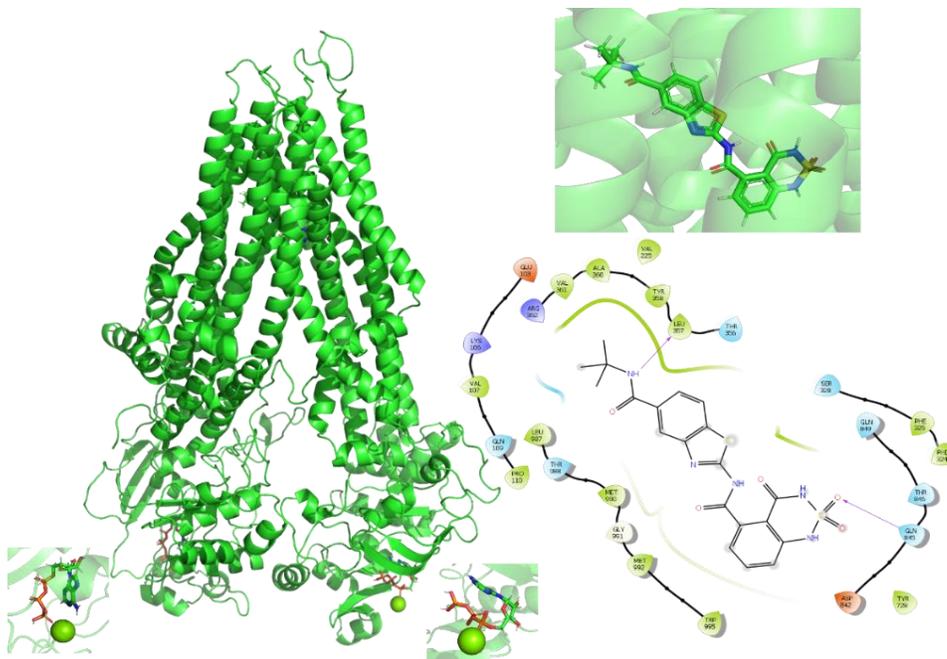


Figura 32. Acoplamiento molecular del ligando SHC-2-1 en el sitio de unión sustrato endógeno. A) Diagrama de interacción de SHC-2-1 en sitio de unión sustrato endógeno (flecha rosa: interacción HBD o HBA). B) Conformación de SHC-2-1 en el dominio TMD y ATPs en los dominios NBDs.

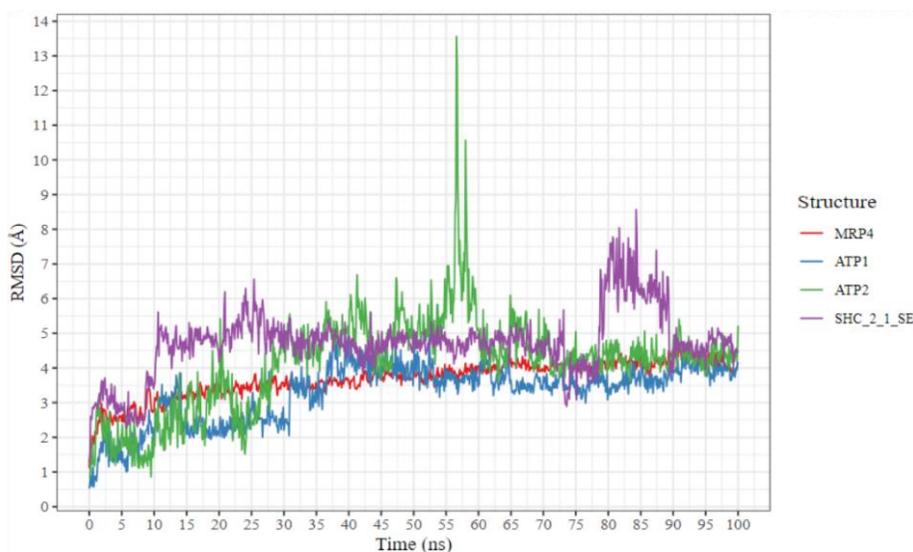


Figura 33. Dinámica molecular de SHC-2-1 en el sitio de unión sustrato endógeno. RMSD de una trayectoria de 100 ns para SHC-2-1 sustrato endógeno (Morado), MRP4 (rojo), ATP1 (azul), ATP2 (verde).

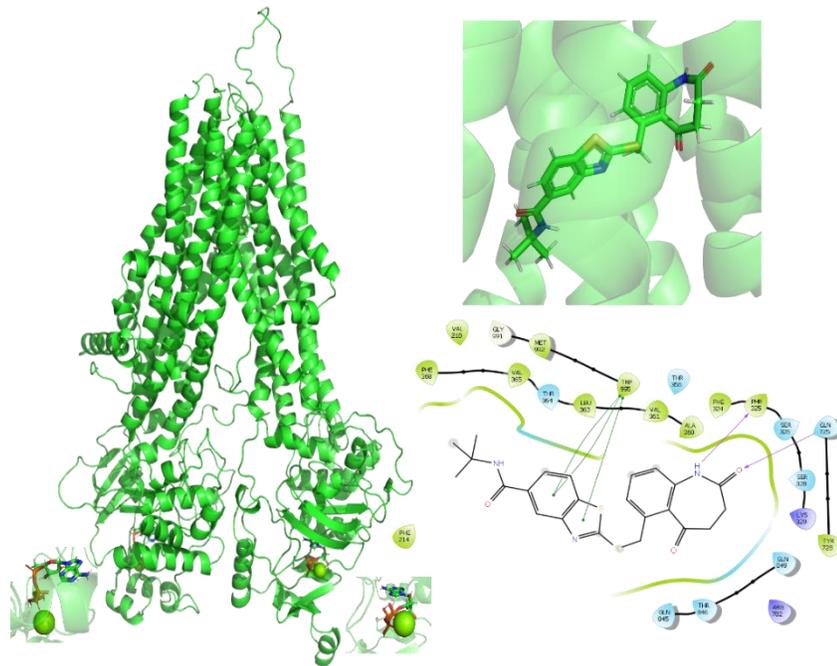


Figura 34. Acoplamiento molecular del ligando SHC-2-2 en el sitio de unión inhibitor. A) Diagrama de interacción de SHC-2-2 en sitio de unión sustrato inhibitor (punto-línea-punto verde: interacción pi-pi; flecha rosa: interacción HBD o HBA). B) Conformación de SHC-2-1 en el dominio TMD y ATPs en los dominios NBDs.

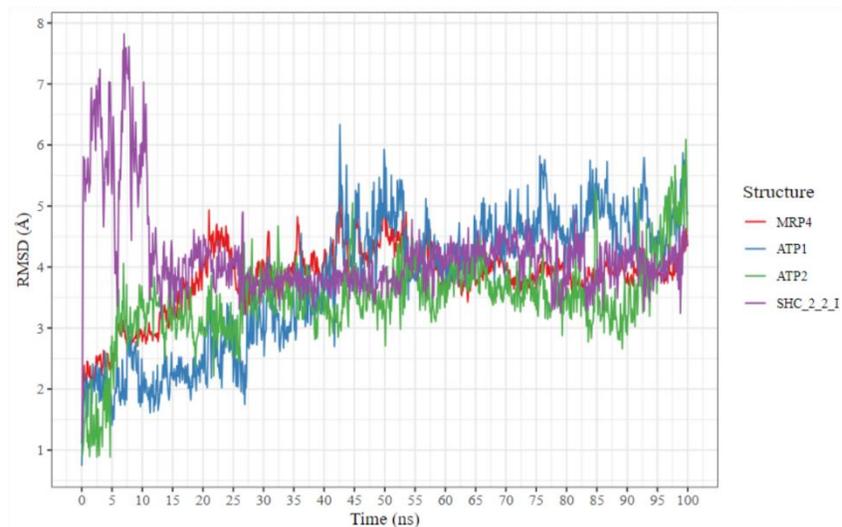


Figura 35. Dinámica molecular de SHC-2-2 en el sitio de unión inhibitor. RMSD de una trayectoria de 100 ns para SHC-2-2 en el sitio de unión inhibitor (Morado), MRP4 (rojo), ATP1 (azul), ATP2 (verde).

8.5 Propiedades fisicoquímicas de los ligandos

El diagrama SwissADME de huevo cocido es un modelo predictivo que toma en cuenta las propiedades fisicoquímicas de nuestras moléculas de interés, permite evaluar intuitivamente la absorción gastrointestinal pasiva (HIA) y si pueden atravesar la barrera hematoencefálica (BBB), y así poder predecir teóricamente su comportamiento como candidato a fármaco para el tratamiento de la LLA. Además, los puntos que aparecen en el diagrama coloreados en azul predicen si la molécula tendrá una salida activa de P-gp (PGP+) y en rojo si no es un sustrato de P-gp (PGP-). Por lo tanto, los fragmentos A, B y C, al igual que, la ceefourina-1 y la quercetina al encontrarse dentro de la región blanca, indican que son sustratos que tienen una captación gastrointestinal pasiva y adicionalmente no participan en el eflujo del transportador P-gp. El fragmento D, es el único que se encuentra dentro de la yema de huevo, es decir, que es el único que puede entrar a la barrera hematoencefálica y no indica una salida activa en P-gp. Por el contrario, las moléculas EBD9, EBD14, SHC-2-1 y SHC-2-2, no se encuentran dentro del rango de captación, es decir, que tiene baja capacidad para ser absorbido en el tracto gastrointestinal, por lo tanto, baja biodisponibilidad oral (AL-Ghulikah et al., 2022). En este caso, sólo los sustratos SHC-2-2 y EBD14 son sometidos a un eflujo activo por la P-gp (punto azul), es decir, que actúan como sustratos e inhibidores de P-gp. El fragmento A, B y C cumplen con el parámetro farmacológico (Figura 36).

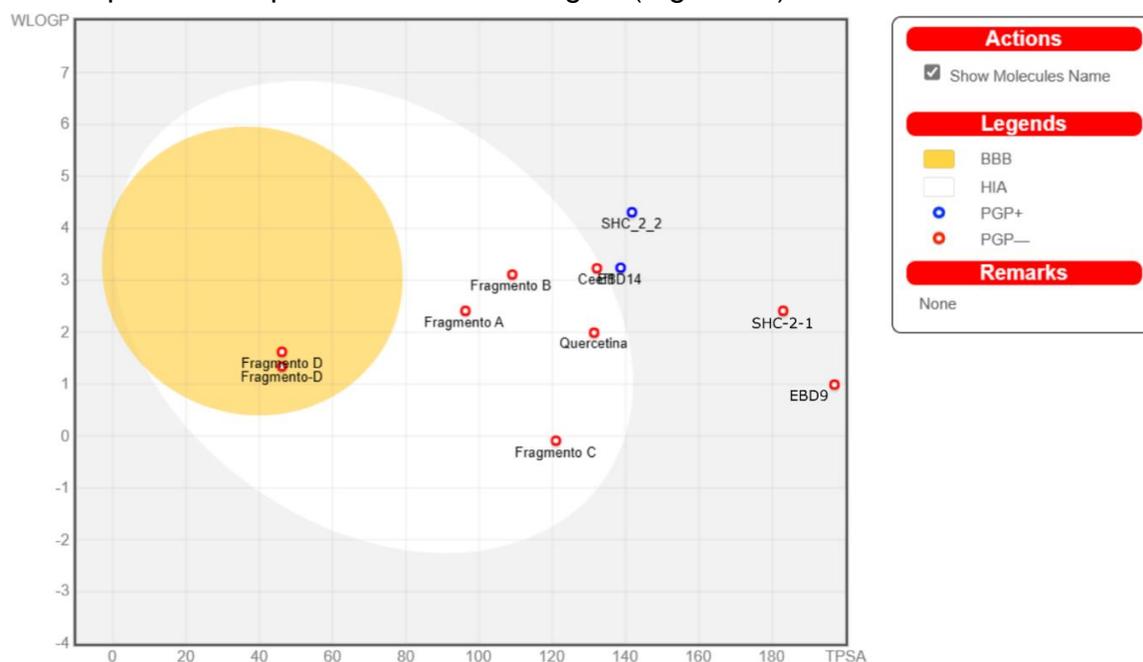


Figura 36. Diagrama de propiedades ADME-Tox de los ligandos. La región blanca indica alta probabilidad de absorción pasiva por el tracto gastrointestinal, y la región amarilla (yema) es alta probabilidad de penetración cerebral y no son mutuamente excluyentes (Daina et al., 2017).

En la literatura se ha reportado que en la llegada de un sustrato en el dominio TMD de MRP4, los principales residuos con los que interactúa son con la Phe 211, Phe 324, Leu 363, Leu 367, Phe 368, Met 990, Gly 991, Trp 995 y Arg 998. Se favorecen principalmente interacciones hidrofóbicas o pi-pi con Phe 324 y Trp 995, interacciones electroestáticas con la carga positiva de Arg 998. En cuanto a la región de los NBD, depende de las propiedades fisicoquímicas de los sustratos. Por un lado, podrían mantener más unidos a los NBDs y aumentar la actividad de los ATPs, como se ha visto para la prostaglandina E1 (PGE1) o que ocurra lo opuesto como con el antiinflamatorio, sulindac (Huang Y, 2023). Asimismo, se ha reportado la interacción hidrofóbica del sustrato inhibidor, dipiridamol con los residuos Phe 211, Leu 321, Phe 324, Leu 363, Leu 367, Leu 368, Met 992, Trp 995, y una interacción de puentes de hidrógeno con Arg 998 (Chen Y, 2022).

En los diagramas de interacción mostrados anteriormente, estas interacciones se presentan en la quercetina con el residuo Phe 324, la molécula SHC-2-1 con el residuo Phe 368 y la interacción de tipo pi-pi con el residuo Trp 995 para las moléculas de quercetina, ceefourina-1 y SHC-2-2. Por consiguiente, los sustratos inhibidores tienen mayor afinidad hacia el sitio de unión que está conformado por TM3, TM5, TM6 y TM12. Además, la optimización de las moléculas SHC-2-1 y SHC-2-2, se mantenían las interacciones con los residuos prioritarios.

En los gráficos de RMSD, la proteína es la que se mantiene con una estabilidad constante a diferencia de los ligandos. Entre el ligando ATP1 y ATP2, el ATP2 muestra mayor movimiento y a su vez influye en la estabilidad del inhibidor en su sitio de unión. Es decir que cuando el ATP2 se estabiliza en conjunto con el MRP4 y el ATP1, el sustrato inhibidor tiene mayor movimiento en su sitio de unión.

8.6 Simulaciones de Dinámica Molecular Tipo *Umbrella Sampling*

Se realizaron simulaciones tipo *Umbrella Sampling* para obtener la afinidad teórica de los compuestos y definir si las moléculas optimizadas tienen un mejor perfil *umbrella*, tomando como variable colectiva el centro de masa entre la proteína y el ligando. A partir de los valores obtenidos de la energía libre de unión (ΔG) para los ligandos se puede establecer cuáles son aquellos que se unen con mayor fuerza a un sitio de unión. Entre más negativo sea este valor, significa que es un ligando fuerte y, por lo contrario, un valor alto de ΔG se considera un ligando débil para unirse al sitio de unión.

La ceefourina-1, hasta ahora identificada como el inhibidor más selectivo para MRP4, fue previamente evaluada en un modelo de MRP4 mediante dinámica molecular de tipo *Coarse-Grained* (CG-MD). Esta evaluación se realizó sin la presencia de ATPs en la región de inhibidores, revelando que la ceefourina-1 favorece diversas interacciones ya que se encuentra rodeada por un ambiente hidrofóbico, residuos polares, negativos y cargados positivamente. Los resultados del *umbrella sampling* indicaron una mayor afinidad de la ceefourina-1 en comparación con el sustrato endógeno AMPc, sugiriendo su potencial como inhibidor competitivo (Becerra, 2021). Además, se exploró la posibilidad de un tratamiento combinado con el inmunosupresor mercaptopurina (6-MP), cuyo sitio de unión, al igual que la ceefourina-1, se localiza en TMD2, cerca de la cavidad interior. Sin embargo, en el modelo actual del MRP4 utilizado en este estudio, que incorpora sus ATP, se encuentra alejado de la cavidad inferior. Lo que sugiere que el comportamiento de los ligandos es diferente en presencia de ambas moléculas de ATP en los NBDs y su ΔG no muestra una mejora significativa; la diferencia es de tan solo 1.87 kcal/mol. (Becerra, 2022).

Sin embargo, sus subestructuras optimizadas EBD9, EBD14, SHC-2-1 y SHC-2-2 son energéticamente más estables en el sitio de unión de inhibidor de la proteína de MRP4. De acuerdo con las energías mostradas en la Tabla 8 y que se refleja en la Figura 37. De acuerdo con esta diferencia de energías, la molécula optimizada SHC-2-2, en el sitio de unión inhibidor es más estable en comparación a la molécula EBD14. Mientras que EBD9 tuvo un mejor valor contra el SHC-2-1 en el sitio de unión inhibidor. En el sitio de unión de endógenos, SHC-2-1 es aproximadamente 20 veces más significativo. Por lo tanto, aquellos ligandos que tuvieron valores más significativos fueron las moléculas optimizadas SHC-2-1 en el sitio de unión sustrato endógeno y SHC-2-2 en el sitio de unión sustrato inhibidor. Por lo tanto, se pueden considerar como posibles inhibidores de MRP4. De acuerdo, al diagrama de ADME-Tox será necesario mejorar la solubilidad de estas moléculas.

Tabla 8. Energía libre de Gibbs de los ligandos. Valor real representado en kcal/mol.	
Ligando	ΔG (kcal/mol)
Ceefourina-1	-27.99
Quercetina Inhibidor	-41.21
Quercetina SE	-12.59
EBD9	-38.29
EBD14	-39.75
SHC-2-1 Inhibidor	-31.61
SHC-2-1 SE	-66.37
SHC-2-2	-73.16

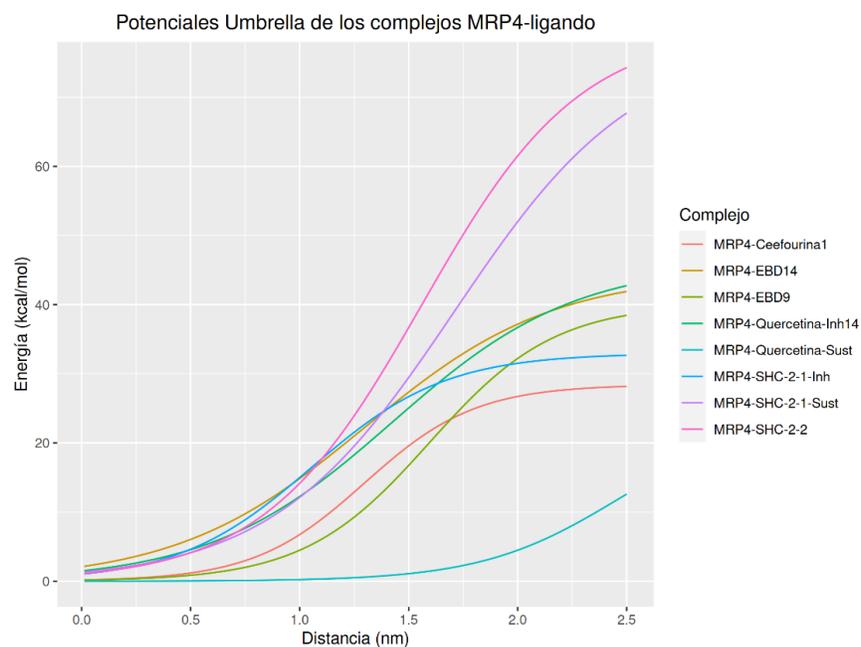
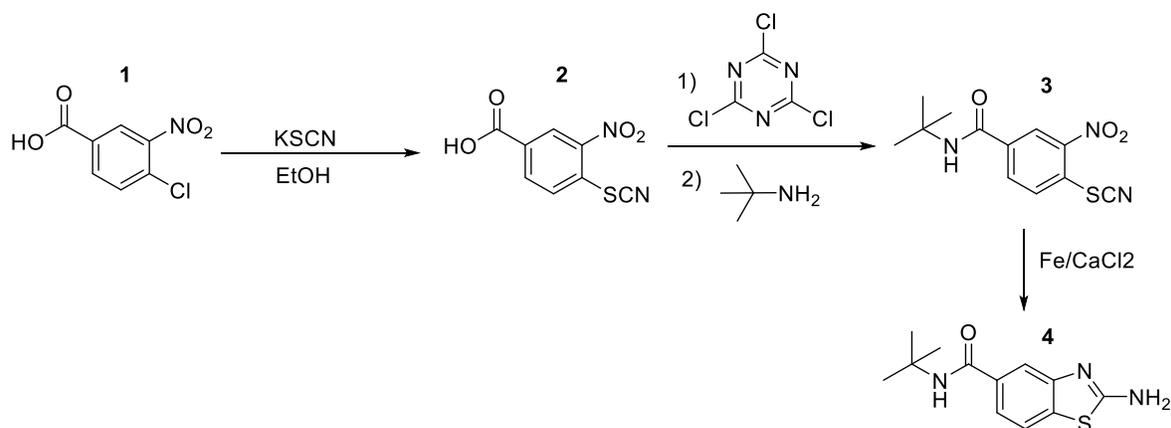


Figura 37. Gráfico del *umbrella sampling* de los ligandos. Eje de las x, distancia en nm y eje de las y, representa la energía en kcal/mol.

8.6 Síntesis por unión de fragmentos de SHC-2-1 y SHC-2-2

Síntesis de 2-amino-N-(ter-butil) benzotiazol-5-carboxamida (Fragmento A)



Todos los reactivos se adquirieron de la compañía Sigma-Aldrich y se utilizaron sin más purificación. El ácido 4-cloro-3-nitrobenzoico (2 g) se disolvió en etanol (20 mL), y se añadió tiocianato potásico (0,96 g), y la mezcla resultante se sometió a reflujo a 70 °C durante 2 horas. La reacción se terminó por control de TLC. El producto se recrystalizó en etanol/agua y el sólido se filtró al vacío con agua fría. El ácido 3-nitro-4-tiocianatobenzóico (1,95 g) se disolvió en cloroformo. Se añadió cloruro cianúrico

(0,96 mL) y el contenido de la reacción se agitó a reflujo a temperatura ambiente durante 1 hora. Se añadió ter-butilamina (1,02 mL) gota a gota al medio de reacción. El contenido de la reacción se agitó a 25 °C durante 1 día. El control de la reacción se realizó mediante TLC. El producto bruto se lavó con agua y se recristalizó de etanol. El compuesto resultante (*N*-(ter-butil)-3-nitro-4-tiocianatobenzamida (0,01 mol) se disolvió en una mezcla de EtOH (10 mL) y H₂O (0,5 mL), después añadimos polvo de hierro (0,03 mol), y CaCl₂ (0,01 mol), la suspensión resultante se agitó a 60 °C durante 4 h (Chandrappa et al., 2010). El progreso de la reacción se monitoreo mediante TLC. Una vez formado el producto, neutralizamos la reacción goteando una solución concentrada de NaOH. Para eliminar el residuo de hierro, filtramos el producto resultante en una capa de celita o sílice y se lavó con acetato de etilo. Se procedió con una recristalización etanol/H₂O y un último lavado del producto sólido con acetona. Para reducir el grupo nitro a un grupo amina y facilitar una reducción *in situ*.

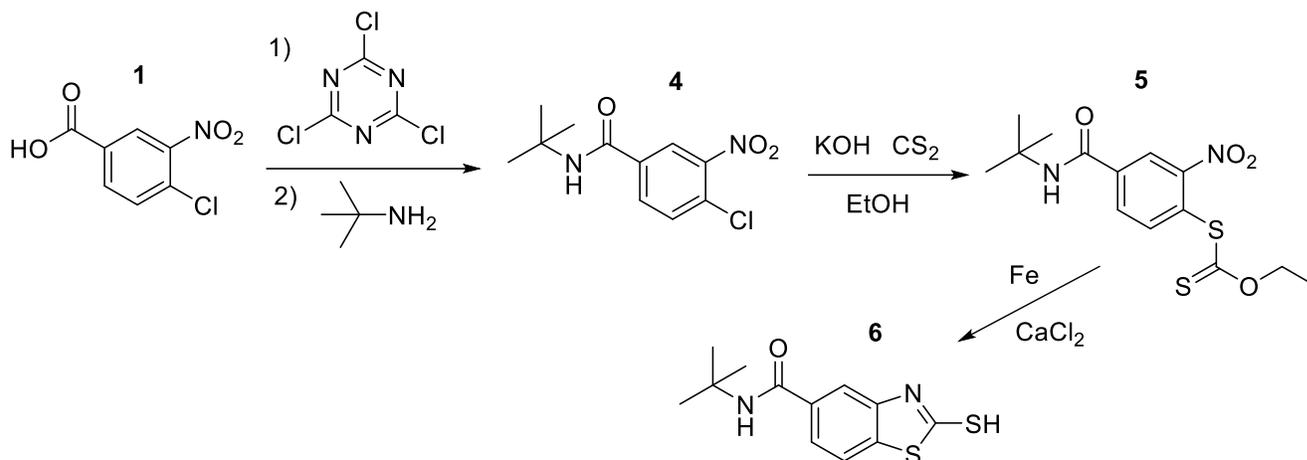
Para el intermediario de reacción 2 del fragmento A, su espectro de ¹H de RMN, se muestra en el anexo 2. Se puede observar que, en la zona aromática, hay tres señales. En la molécula está presente un grupo electroattractor, el grupo nitro y otro electrodonador, el tiocianato. Por ello, el grupo más electronegativo está más desplazado a campo alto, es decir, el grupo electrodonador. Por lo tanto, el desplazamiento en 7.58 ppm pertenece al protón del carbono 3 y el desplazamiento en 8.20 ppm es del H-6. Entre ambas señales, a 7.89 ppm es un pico con una multiplicidad de doble de dobles, esto indica que acopla con dos protones vecinos. Por consiguiente, es el H-2 quien acopla con H-3 y H-6. La señal en 1.39 ppm integra para 9 protones, por lo tanto, corresponde al grupo terbutilo, y la señal restante en 6.22 ppm es del protón del amino de la terbutilamida.

El espectro del intermediario 3 (Anexo 3) se puede observar que aún hay presencia de impurezas, tanto en la región de los alifáticos como en la región de los aromáticos. Sin embargo, la señal en aproximadamente 1.39 ppm corresponde al grupo terbutilo, esto significa que durante la reacción de reducción se pudo no haber perdido este grupo. No obstante, es necesario complementarlo con otros experimentos.

En el espectro obtenido, se observan más de tres señales en la zona de aromáticos, además la multiplicidad de las señales varía, reporta dos singuletes y tres dobletes, ello puede deberse a que aún hay impurezas en el compuesto. A campo alto, están presentes dos singuletes, que podría pertenecer al grupo terbutilo y al del amino unido al carbono 15 (Anexo 3). Por consiguiente, no se puede determinar si es la molécula, por lo que será necesario realizar más pruebas espectroscópicas y mejorar el método de purificación para el fragmento A.

Señales representativas de RMN del intermediario 2 del fragmento A: ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 8.20 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.89 (dd, $J = 8.4, 2.1$ Hz, 1H), 7.58 (d, 1H), 6.22 (s, 1H), 1.48 (s, 9H). ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO) δ 158.60, 142.79, 130.90, 127.29, 126.63, 124.80, 119.14, 47.61, 23.91.

Síntesis de N-(ter-butil)-2-mercaptobenzotiazol-5-carboxamida (Fragmento B)



Al igual que en la síntesis anterior a partir del fragmento A, repetimos el mismo proceso utilizando cloruro cianúrico y ter-butilamina en presencia del compuesto 1, previamente disuelto en etanol, para formar directamente la ter-butilamina. Para realizar la sustitución nucleofílica aromática del grupo xantato en el carbono 5 del anillo aromático, previamente se hace reaccionar en un matraz bola el hidróxido de potasio con el disulfuro de carbono en etanol durante 20 min. Enseguida, en el mismo matraz se coloca el hierro y el cloruro de calcio para formar el amino por reducción y cerrar al benzotiazol.

En su espectro de RMN ^1H a campo bajo se encuentran las señales de los protones pertenecientes al anillo aromático, a 7.86 indica al protón del carbono 3, ya que es el que se encuentra más cerca de un grupo electronegativo, el carbonilo. Enseguida, la señal en 8.11, tiene una multiplicidad de doble de dobles debido a que este protón acopla con los protones vecinos, H-3 y H-6. Por lo que, la señal restante corresponde al desplazamiento 8.47, para el H-6. Mientras que, a campo alto, en la región alifática, la señal en 1.39 ppm integra para 3 protones, por lo cual, pertenece al grupo terbutilo. En la región de los aminos, está presente en 3.33 ppm la señal del amino de la terbutilamida. A partir de este espectro, se puede afirmar que se tiene el primer intermediario 4 del fragmento B, mostrado en el Anexo 4.

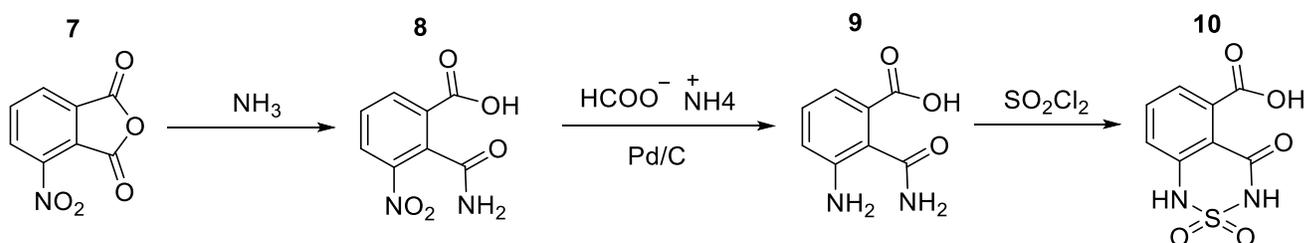
En el espectro predicho del fragmento A, mostrado en el anexo 4, podemos observar que se deberían mantener las tres señales en la zona de anillos aromáticos que pertenecen al benzotiazol, al igual que la señal de los dos singuletes, uno que

pertenece del amino de la terbutilamida y el singulete de los protones del terbutilo. Por lo tanto, la señal que nos indicaría que se logró reducir al grupo nitro y eventualmente se cerró el anillo es la señal singulete en 0.5 ppm del grupo amino posicionado en el carbono 15.

En el Anexo 6, se muestra el espectro de resonancia del producto resultante del fragmento B tras la reducción, donde se observan las tres señales representativas del anillo aromático del mercaptano, los protones H-2, H-3 y H-6. Conforme al espectro predicho, mostrado en el Anexo 7, la señal en 7.46 ppm es del H-6, 7.28 ppm del H-3 y 7.10 ppm es del H-2. Sin embargo, la presencia de señales adicionales a campo alto indica impurezas en la muestra, lo que imposibilita afirmar con certeza que se trate del fragmento B.

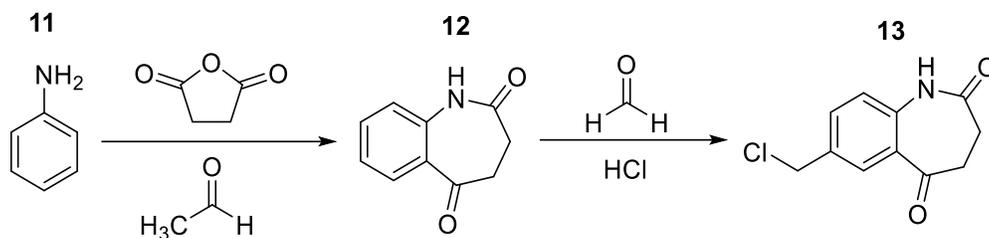
Señales representativas de RMN (Anexo 4): ^1H NMR (600 MHz, DMSO) δ 8.47 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H), 8.11 (dd, $J = 8.4, 2.0$ Hz, 1H), 7.86 (d, 1H), 3.33 (s, 1H), 1.39 (s, 9H).

Síntesis del ácido 4-oxo-3,4-dihidro-1H-benzotiadiazina-5-carboxílico 2,2-dióxido (Fragmento C)



El anhídrido 3-nitroftálico disponible comercialmente se hizo reaccionar con NH_3 en metanol para abrir el anhídrido y formar al intermediario 8. La reducción del grupo nitro presente en el intermedio 8 se realizó añadiendo formiato de amonio en Pd/C. Una vez seco el compuesto 9, se hizo reaccionar con SO_2Cl_2 para producir el intermedio 10, que se mantuvo suspendido en tolueno para su uso inmediato en la síntesis de EBD9. Debido a su complejidad para purificarlo no se logró obtener su rendimiento, por lo que, en la tabla 9 se muestra como no determinado (ND), ya que no se pudo obtener su espectro ^1H .

Síntesis de 7-(clorometil)-3,4-dihidro-1H-benzoazepina-2,5-diona (Fragmento D)

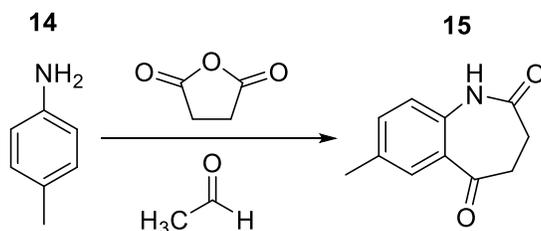


Se calentó una mezcla de anilina (2 g, 0,01 mol), anhídrido succínico y ácido acético (20 mL) a 120 °C durante 2 h (Bhusare et al., 2003). Después, la reacción se enfrió, se vertió sobre hielo picado y se dejó 1 día en refrigeración. Se formó un sólido en el fondo del matraz, que se filtró al vacío con agua fría y se secó, obteniéndose el compuesto 12. La reacción posterior se trató con formaldehído (solución al 35,5%, mL, 4,6mol) en ácido clorhídrico concentrado (6 mL, 12,2 mol), y después se agitó la mezcla durante 5 h a 50°C (Yanagi et al., 2001). Se recogió un precipitado naranja por filtración y se lavó con agua fría para dar el compuesto 13. Para el compuesto 13, no se pudo obtener el espectro, ya que aún tenía impurezas.

En cuanto al espectro de ^1H del intermediario de reacción del fragmento D tenemos tres señales en la zona de aromáticos y en los desplazamientos entre 2.5 a 3.5 ppm tenemos aquellos protones que se encuentran cercanos a los grupos aminos, los cuales podrían pertenecer a los H-9 y H-10 (Anexo 8).

No obstante, de acuerdo con el espectro predicho de este intermediario. En la zona de aromáticos, reporta cinco señales con diferentes multiplicidades. Cuatro señales pertenecen a los protones H-1, H-2, H-3 y H-6 del anillo aromático y la señal singulete es del protón del grupo amino (Anexo 9).

Síntesis de 7-metil-3,4-dihidro-1H-benzoazepina-2,5-diona (análogo del Fragmento D)



Repetimos las mismas condiciones de reacción que mencionamos para el compuesto 12, para utilizar en pruebas biológicas. Decidimos utilizar como materia prima la *p*-toluidina (2g, 0.01 mol) en lugar de la anilina y hacerla reaccionar con anhídrido succínico y ácido acético (20 mL) a 120°C durante 2 hrs (Bhusare et al., 2003).

En el espectro de ^1H del compuesto 15, en la zona del anillo aromático se muestran tres señales, los cuales pueden ser de los protones del anillo aromático. A campo alto, las tres señales que se observan pertenecen a los dos protones de la azepinona, H-9 y H-10 más la señal del protón del grupo amino. Sin embargo, como se muestra en el espectro predicho se debería tener una señal adicional entre los desplazamientos de 7.0 a 7.5 ppm del metilo que está unido al C-1 y no se observa en el espectro (Anexo 10 y 11), por lo que no se podría determinar aún que sea el compuesto.

Tabla 9. Rendimientos de la síntesis de los fragmentos		
Compuesto	Rendimiento (%)	Rendimiento (g, mmol)
Fragmento A		
Intermediario 2	94	1.95, 6.98
Intermediario 3	12.5	0.1, 0.4
Fragmento B		
Intermediario 4	92.5	1.85, 7.20
Intermediario 6	1.99	0.01, 0.037
Fragmento C		
Intermediario 8	ND	ND
Intermediario 9	ND	ND
Fragmento D		
Intermediario 12	86	1.72, 9.8
Intermediario 13	2.9	0.05, 0.236
Intermediario 15	91	1.82, 9.61
N.D: No determinado		

9. CONCLUSIONES

Mediante el uso de técnicas computacionales como dinámica y acoplamiento molecular, se obtuvo una estructura funcional de MRP4-ATPs para los estudios posteriores de unión a los ligandos de interés. Las simulaciones de dinámica molecular y *Umbrella Sampling* de los ligandos mostraron que las moléculas optimizadas SHC-2-1 y SHC-2-2 tienen un mejor perfil de unión con MRP4 que las moléculas originales EBD9 y EBD14 e inhibidores previamente reportados en la literatura como lo son la ceefourina-1 y quercetina. Asimismo, SHC-2-1 muestra una mayor afinidad por unirse al sitio de unión de endógenos, mientras que SHC-2-2 al sitio de unión de inhibidores. Por lo que, puede sugerir que podrían actuar como posibles inhibidores de MRP4.

Posteriormente, en la síntesis hubo complicaciones debido a que los compuestos no están en su totalidad puros o no se obtiene un buen rendimiento, además de que los espectros de resonancia no son concluyentes, por tanto, se requiere optimizar la ruta de síntesis y procesos de purificación para obtener mejores rendimientos, así como obtener el análisis completo de técnicas espectroscópicas y espectrométricas.

10. PERSPECTIVAS

- Obtener derivados de los compuestos SHC-2-1 y SHC-2-2 y modificar la ruta sintética.
- Purificar e identificar los derivados de SHC-2-1 y SHC-2-2 mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas.
- Evaluar el efecto apoptótico de los derivados en células *Jurkat* para determinar si SHC-2-1 y SHC-2-2 son inhibidores selectivos a MRP4.

10 REFERENCIAS

- Agathocleous M, Harris WA. (2013). Metabolism in physiological cell proliferation and differentiation. *Trends Cell Biol.* 23(10):484-92. doi: 10.1016/j.tcb.2013.05.004. Epub 2013 Jun 4. PMID: 23756093.
- Aguilera-Durán, G., & Romo-Mancillas, A. (2020). Computational Study of C-X-C Chemokine Receptor (CXCR)3 Binding with Its Natural Agonists Chemokine (C-X-C Motif) Ligand (CXCL)9, 10 and 11 and with Synthetic Antagonists: Insights of Receptor Activation towards Drug Design for Vitiligo. *Molecules*, 25(19).
<https://doi.org/10.3390/molecules25194413>
- Al-Ghulikah HA, El-Sebaey SA, Bass AKA, El-Zoghbi MS. New Pyrimidine-5-Carbonitriles as COX-2 Inhibitors: Design, Synthesis, Anticancer Screening, Molecular Docking, and In Silico ADME Profile Studies. (2022). *Molecules*. 27(21):7485. doi: 10.3390/molecules27217485.
- Ali SS, Raj R, Kaur T, Weadick B, Nayak D, No M, Protos J, Odom H, Desai K, Persaud AK, Wang J, Govindarajan R. (2022). Solute Carrier Nucleoside Transporters in Hematopoiesis and Hematological Drug Toxicities: A Perspective. *Cancers (Basel)*. 14(13):3113. doi: 10.3390/cancers14133113.
- Altharawi, A., Ahmad, S., Alamri, M. A., & Tahir ul Qamar, M. (2021). Structural insight into the binding pattern and interaction mechanism of chemotherapeutic agents with Sorcin by docking and molecular dynamic simulation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 208. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.112098>
- Aramini B, Masciale V, Grisendi G, Bertolini F, Maur M, Guaitoli G, Chrystel I, Morandi U, Stella F, Dominici M, Haider KH. (2022). Dissecting Tumor Growth: The Role of Cancer Stem Cells in Drug Resistance and Recurrence. *Cancers (Basel)*. 14(4):976. doi: 10.3390/cancers14040976.
- Baron, B., & Micallef Isaac. (2020). Doxorubicin: An Overview of the Anti-Cancer and Chemoresistance Mechanisms. In *Ann Clin Toxicol*; 3(2): 1031.
- 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).
<https://doi.org/10.3390/molecules26041051>
- Becerra, E. B., Alcocer, M. G. G., & Mancillas, A. R. (2021). *Diseño, síntesis y evaluación de inhibidores del transportador MRP4, como inductores selectivos de apoptosis, en un modelo in vitro de Leucemia Linfoblástica Aguda*. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Becerra, E., Berumen, L., Soto-Ontiveros, V., & García-Alcocer, G. (2022). Specific MRP4 Inhibitor Ceefourin-1 Enhances Apoptosis Induced by 6-Mercaptopurine in Jurkat

- Leukemic Cells, but Not in Normal Lymphoblast Cell Line CRL-1991. *Medicina (Lithuania)*, 58(6). <https://doi.org/10.3390/medicina58060695>
- 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. In *Life Sciences*. 231:116540. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.06.015>
- Jarikote, D.V., Pawar, V.G., Bhusare, S.R. et al. A Facile Synthesis of 1,3,4,6-Tetrahydro-1,6-benzodiazocine-2,5-diones. *Russian Journal of Organic Chemistry* 40, 575–577 (2004). <https://doi.org/10.1023/B:RUJO.0000036082.67132.22>
- Bruhn O, Lindsay M, Wiebel F, Kaehler M, Nagel I, Böhm R, Röder C, Cascorbi I. Alternative Polyadenylation of ABC Transporters of the C-Family (ABCC1, ABCC2, ABCC3) and Implications on Posttranscriptional Micro-RNA Regulation. *Mol Pharmacol*. 2020 Feb;97(2):112-122. doi: 10.1124/mol.119.116590.
- Cárdenas-Araujo y Gutiérrez-Aguirre. (2018). Methods for detecting minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia and its clinical application. Métodos para detectar enfermedad mínima residual en leucemia linfoblástica aguda y su aplicación clínica. In *Rev Hematol Mex*. 19(1):41-49. <https://revistadehematologia.org.mx/article/metodos-para-detectar-enfermedad-minima-residual-en-leucemia-linfoblastica-aguda-y-su-aplicacion-clinica/>
- Cheepala, S., Hulot, J. S., Morgan, J. A., Sassi, Y., Zhang, W., Naren, A. P., & Schuetz, J. D. (2013). Cyclic nucleotide compartmentalization: Contributions of phosphodiesterases and ATP-binding cassette transporters. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 53, 231–253. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010611-134609>
- Chen, X., Chen, S., & Yu, D. (2020). Metabolic reprogramming of chemoresistant cancer cells and the potential significance of metabolic regulation in the reversal of cancer chemoresistance. In *Metabolites*. 10(7):289. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/metabo10070289>
- 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), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205175>
- Chen, Y., Wang, L., Hou, WT. et al. Structural insights into human ABCC4-mediated transport of platelet agonist and antagonist. *Nat Cardiovasc Res* 2, 693–701 (2023). <https://doi.org/10.1038/s44161-023-00289-9>
- Cheung, L., Flemming, C. L., Watt, F., Masada, N., Yu, D. M. T., Huynh, T., Conseil, G., Tivnan, A., Polinsky, A., Gudkov, A. V., Munoz, M. A., Vishvanath, A., Cooper, D. M. F., Henderson, M. J., Cole, S. P. C., Fletcher, J. I., Haber, M., & Norris, M. D. (2014). High-

- throughput screening identifies Ceefourin 1 and Ceefourin 2 as highly selective inhibitors of multidrug resistance protein 4 (MRP4). *Biochemical Pharmacology*, 91(1), 97–108. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2014.05.023>
- Cheung, L., Yu, D. M. T., Neiron, Z., Failes, T. W., Arndt, G. M., & Fletcher, J. I. (2015). Identification of new MRP4 inhibitors from a library of FDA approved drugs using a high-throughput bioluminescence screen. *Biochemical Pharmacology*, 93(3), 380–388. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2014.11.006>
- Crans-Vargas HN, Landaw EM, Bhatia S, Sandusky G, Moore TB, Sakamoto KM. Expression of cyclic adenosine monophosphate response-element binding protein in acute leukemia. *Blood*. 2002 Apr 1;99(7):2617-9. doi: 10.1182/blood.v99.7.2617.
- Daina, A., Michielin, O., & Zoete, V. (2017). SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific Reports*, 7:42717. <https://doi.org/10.1038/srep42717>
- Ding, J., Fishel, M. L., Reed, A. M., McAdams, E., Czader, M. B., Cardoso, A. A., & Kelley, M. R. (2017). Ref-1/APE1 as a transcriptional regulator and novel therapeutic target in pediatric T-cell leukemia. *Molecular Cancer Therapeutics*, 16(7), 1401–1411. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-17-0099>
- Dong, Y., Shi, O., Zeng, Q., Lu, X., Wang, W., Li, Y., Wang, Q., Wang, Q., & Wang, Q. (2020). Leukemia incidence trends at the global, regional, and national level between 1990 and 2017. *Experimental Hematology and Oncology*, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s40164-020-00170-6>
- Döring, H., Kreutzer, D., Ritter, C., & Hilgeroth, A. (2021). *Discovery of Novel Symmetrical 1,4 - Dihydropyridines as In - hibitors of Multidrug - Resistant Protein (MRP4) Efflux Pump for Anticancer Therapy*. 1–13.
- Elfadadny, A., El-Husseiny, H. M., Abugomaa, A., Ragab, R. F., Mady, E. A., Aboubakr, M., Samir, H., Mandour, A. S., El-Mleeh, A., El-Far, A. H., Abd El-Aziz, A. H., & Elbadawy, M. (2021). Role of multidrug resistance-associated proteins in cancer therapeutics: past, present, and future perspectives. In *Environmental Science and Pollution Research*, 28(36):49447-49466. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-15759-5>
- Galán Gómez, V., De La, L., Regaño, F., Rodríguez Villa, A., Díaz De Heredia Rubio, C., González Vicent, M., Serra, I. B., María Fernández, J., Pascual Martínez, A. I., María, J., Hurtado, P., Duarte, M. L., Soledad, M., Regalado, M., & Pérez-Martínez, A. (2022). Experience of the Spanish Group for Hematopoietic Transplantation (GETMON-GETH) in allogeneic Hematopoietic stem cell Transplantation in Philadelphia acute lymphoblastic leukemia. In *Anales de Pediatría*, 96(4):309-318. doi: 10.1016/j.anpede.2021.02.016.

- Giddings EL, Champagne DP, Wu MH, Laffin JM, Thornton TM, Valenca-Pereira F, Culp-Hill R, Fortner KA, Romero N, East J, Cao P, Arias-Pulido H, Sidhu KS, Silverstrim B, Kam Y, Kelley S, Pereira M, Bates SE, Bunn JY, Fiering SN, Matthews DE, Robey RW, Stich D, D'Alessandro A, Rincon M. Mitochondrial ATP fuels ABC transporter-mediated drug efflux in cancer chemoresistance. *Nat Commun.* 2021 May 14;12(1):2804. doi: 10.1038/s41467-021-23071-6. PMID: 33990571; PMCID: PMC8121950.
- Hernández-Martínez, A., Roldán-Tabares, M. D., Herrera-Almanza, L., Villegas-Alzate, J. D., Álvarez-Hernandez, L. F., Hernández-Restrepo, F., & Martín-Sánchez, L. M. (2019). Leukemia of acute presentation and the new therapeutic alternatives. *Medicina Interna de Mexico*, 35(4), 553–563. <https://doi.org/10.24245/mim.v35i4.2548>
- Huang Y, Xue C, Wang L, Bu R, Mu J, Wang Y, Liu Z. Structural basis for substrate and inhibitor recognition of human multidrug transporter MRP4. *Commun Biol.* 2023 May 22;6(1):549. doi: 10.1038/s42003-023-04935-7.
- Hunger SP, Mullighan CG. Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. *N Engl J Med.* 2015 Oct 15;373(16):1541-52. doi: 10.1056/NEJMra1400972. PMID: 26465987.
- Jaramillo, A. C., Cloos, J., Lemos, C., Stam, R. W., Kaspers, G. J. L., Jansen, G., & Peters, G. J. (2019). Ex vivo resistance in childhood acute lymphoblastic leukemia: Correlations between BCRP, MRP1, MRP4 and MRP5 ABC transporter expression and intracellular methotrexate polyglutamate accumulation. *Leukemia Research*, 79, 45–51. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2019.02.008>
- Johnson, Z. L., & Chen, J. (2017). Structural Basis of Substrate Recognition by the Multidrug Resistance Protein MRP1. *Cell*, 168(6), 1075-1085.e9. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.01.041>
- Juárez-Avendaño, G., Luna-Silva, N. C., Chargoy-Vivaldo, E., Juárez-Martínez, L. A., Martínez-Rangel, M. N., Zárate-Ortiz, N., Martínez-Valencia, E., López-Martínez, B., Pelayo, R., & Balandrán, J. C. (2020). Poor Prognosis Biomolecular Factors Are Highly Frequent in Childhood Acute Leukemias From Oaxaca, Mexico. *Technology in Cancer Research & Treatment*, 19(512), 1–10. <https://doi.org/10.1177/1533033820928436>
- Kamath, A., Srinivasamurthy, S. K., Chowta, M. N., Ullal, S. D., Daali, Y., & Chakradhara Rao, U. S. (2022). Role of Drug Transporters in Elucidating Inter-Individual Variability in Pediatric Chemotherapy-Related Toxicities and Response. In *Pharmaceuticals*, 15(8):990. <https://doi.org/10.3390/ph15080990>
- Kim, E. K., Jang, M., Song, M. J., Kim, D., Kim, Y., & Jang, H. H. (2019). Redox-mediated mechanism of chemoresistance in cancer cells. In *Antioxidants*, 8(10):471. <https://doi.org/10.3390/antiox8100471>
- Kong, Q., Xu, L. H., Xu, W., Fang, J. P., & Xu, H. G. (2015). HMGB1 translocation is involved in the transformation of autophagy complexes and promotes chemoresistance in

- leukaemia. *International Journal of Oncology*, 47(1), 161–170.
<https://doi.org/10.3892/ijo.2015.2985>
- Kroll, T., Prescher, M., Smits, S. H. J., & Schmitt, L. (2021). Structure and Function of Hepatobiliary ATP Binding Cassette Transporters. In *Chemical Reviews*, 121(9):5240-5288. American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00659>
- Kuek, V., Hughes, A. M., Kotecha, R. S., & Cheung, L. C. (2021). Therapeutic targeting of the leukaemia microenvironment. In *International Journal of Molecular Sciences*, 22(13):6888. <https://doi.org/10.3390/ijms22136888>
- Lacava, J., Bruno Presidentes Luis Fein Emilio Batagelj Secretarios Cristian Micheri Dra Janeth Lara Alcántara, M., Rosso, D., Mercedes García Lombardi Biología molecular, D., Lina Núñez, D., Luisina Bruno, D., Luisa Rafailovici, D., Carolina Chacón, D., Mabel Sardi, D., Romero Acuña, J., Di Vita Editores César Blajman Dra Socorro Castillo Ódena Juan Sade Nicolás Minatta Dra Marta Bader Ángel Dannunzio, E. M., Pi, F., Zhang, H., & Guo, P. (2019). Estudio de expresión y prevalencia del transportador MRP4/ABCC4 en cáncer de vesícula biliar y vías biliares en pacientes del noroeste argentino. *Oncología Clínica*, 24(2), 35–42.
- Laosai y Chamnongthai. (2018). Classification of acute leukemia using medical-knowledge-based morphology and CD marker. *Biomedical Signal Processing and Control*, 44, 127–137. <https://doi.org/10.1016/j.bspc.2018.01.020>
- Lineweaver, C. H., Bussey, K. J., Blackburn, A. C., & Davies, P. C. W. (2021). Cancer progression as a sequence of atavistic reversions. *BioEssays*, 43(7), 1–12. <https://doi.org/10.1002/bies.202000305>
- Magnus Bloch, A., Raj, I., Pape, T., & Taylor, N. M. (2022). Structural and Mechanistic Basis of Substrate Transport by the Multidrug Transporter MRP4. *Structure*, 31(11):1407-1418. <https://doi.org/10.1101/2022.12.12.520055>
- Malard y Mohty. (2020). Acute lymphoblastic leukaemia. In *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)
- Santos-Martins D, Solis-Vasquez L, Tillack AF, Sanner MF, Koch A, Forli S. Accelerating AutoDock4 with GPUs and Gradient-Based Local Search. *J Chem Theory Comput*. 2021 Feb 9;17(2):1060-1073. doi: 10.1021/acs.jctc.0c01006.
- Morrison, A. J. (2022). Cancer cell metabolism connects epigenetic modifications to transcriptional regulation. In *FEBS Journal*, 289(5):1302-1314. John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/febs.16032>
- Mukherjee, S., & Sekeres, M. A. (2019). Novel Therapies in Acute Myeloid Leukemia. *Seminars in Oncology Nursing*, 35(6). <https://doi.org/10.1016/j.soncn.2019.150955>

- Murray, F., & Insel, P. A. (2013). Targeting cAMP in chronic lymphocytic leukemia: A pathway-dependent approach for the treatment of leukemia and lymphoma. In *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 17(8):937-49. <https://doi.org/10.1517/14728222.2013.798304>
- Oevermann, L., Scheitz, J., Starke, K., Kathleen, K., Kiefer, T., Gottfried, D., Nießen, J., Greinacher, A., Siegmund, W., Zygmunt, M., Kroemer, H. K., Jedlitschky, G., & Ritter, C. A. (2009). Hematopoietic stem cell differentiation affects expression and function of MRP4 (ABCC4), a transport protein for signaling molecules and drugs. *Int J Cancer*, 124(10):2303-11. <https://doi.org/10.1002/ijc.24207>
- Oliveira, T. T., Coutinho, L. G., de Oliveira, L. O. A., Timoteo, A. R. de S., Farias, G. C., & Agnez-Lima, L. F. (2022). APE1/Ref-1 Role in Inflammation and Immune Response. In *Frontiers in Immunology*, 13:793096. Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.793096>
- Perez, D. R., Sklar, L. A., Chigaev, A., & Matlawska-Wasowska, K. (2021). Drug repurposing for targeting cyclic nucleotide transporters in acute leukemias - A missed opportunity. In *Seminars in Cancer Biology*, 68:199-208. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.semcan.2020.02.004>
- 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>
- Pocock, R., Farah, N., Richardson, S. E., & Mansour, M. R. (2021). Current and emerging therapeutic approaches for T-cell acute lymphoblastic leukaemia. In *British Journal of Haematology*, 194(1):28-43. <https://doi.org/10.1111/bjh.17310>
- Qi, Y., Ingólfsson, H. I., Cheng, X., Lee, J., Marrink, S. J., & Im, W. (2015). CHARMM-GUI Martini Maker for Coarse-Grained Simulations with the Martini Force Field. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 11(9), 4486–4494. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00513>
- Raetz y Gojo. (2018). Leucemia linfoblástica aguda. *The Leukemia & Lymphoma Society*, 64.
- Raimondi, L., De Luca, A., Giavaresi, G., Raimondo, S., Gallo, A., Taiana, E., Alessandro, R., Rossi, M., Neri, A., Viglietto, G., & Amodio, N. (2020). Non-Coding RNAs in multiple myeloma bone disease pathophysiology. *Non-Coding RNA*, 6(3), 1–22. <https://doi.org/10.3390/NCRNA6030037>
- Reid, G., Wielinga, P., Zelcer, N., De Haas, M., Van Deemter, L., Wijnholds, J., Balzarini, J., & Borst, P. (2003). Characterization of the transport of nucleoside analog drugs by the human multidrug resistance proteins MRP4 and MRP5. *Molecular Pharmacology*, 63(5), 1094–1103. <https://doi.org/10.1124/mol.63.5.1094>

- Rey-Caro, L. A., Pinzón, P., & Cruz-Rodríguez, N. (2020). Mecanismos moleculares emergentes y células madre leucémicas en la quimiorresistencia de tumores hematológicos. *Revista de La Universidad Industrial de Santander. Salud*, 52(2), 129–144. <https://doi.org/10.18273/revsal.v52n2-2020007>
- Ritter, C. A., Jedlitschky, G., Meyer, H., Grube, M., & Kroemer, H. K. (2005). *CELLULAR EXPORT OF DRUGS AND SIGNALING MOLECULES BY THE ATP-BINDING CASSETTE* Kathleen Ko. 253–278. <https://doi.org/10.1081/DMR-200047984>
- Roufayel, R., Younes, K., Al-Sabi, A., & Murshid, N. (2022). BH3-Only Proteins Noxa and Puma Are Key Regulators of Induced Apoptosis. In *Life*, 12(2):256. MDPI. <https://doi.org/10.3390/life12020256>
- Santos, L. H. S., Ferreira, R. S., & Caffarena, E. R. (2019). Integrating molecular docking and molecular dynamics simulations. In *Methods in Molecular Biology*, 2053:13-34. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9752-7_2
- Santos-Martins, D., Solis-Vasquez, L., Tillack, A. F., Sanner, M. F., Koch, A., & Forli, S. (2021). Accelerating AutoDock 4 with GPUs and Gradient-Based Local Search. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 17(2), 1060–1073. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.0c01006>
- Schrödinger Release 2020-1: Desmond Molecular Dynamics System, D. E. Shaw Research,* (2020). Maestro-Desmond Interoperability Tools.
- Senft, D., & Jeremias, I. (2019). A rare subgroup of leukemia stem cells harbors relapse-inducing potential in acute lymphoblastic leukemia. In *Experimental Hematology*, 69:1-10. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2018.09.006>
- Shahverdi, E., Shahriari, M., Zare, S., Rahiminejad, M.S., Soleimani, F.H., Maki, M., Manouchehri, R., & Abdo, M.H. (2020). Common Presenting Signs and Symptoms in Children with Acute Lymphoblastic Leukemia. *Basic and Clinical Cancer Research*, 12(1), 26–33. <https://doi.org/10.18502/bccr.v12i1.5727>
- Sharma, P., Singh, N., & Sharma, S. (2021). ATP binding cassette transporters and cancer: Revisiting their controversial role. In *Pharmacogenomics*, 22(18):1211-1235. Future Medicine Ltd. <https://doi.org/10.2217/pgs-2021-0116>
- Sobolev OV, Afonine PV, Moriarty NW, Hekkelman ML, Joosten RP, Perrakis A, Adams PD. A Global Ramachandran Score Identifies Protein Structures with Unlikely Stereochemistry. *Structure*. 2020 Nov 3;28(11):1249-1258.e2. doi: 10.1016/j.str.2020.08.005.
- Soares-Lima, S. C., Pombo-de-Oliveira, M. S., y Carneiro, F. R. G. (2020). The multiple ways Wnt signaling contributes to acute leukemia pathogenesis. *Journal of Leukocyte Biology*, 108(4), 1081–1099. <https://doi.org/10.1002/JLB.2MR0420-707R>

- Szerémy, P., Tauberné Jakab, K., Baráth, S., Apjok, A., Filkor, K., Holló, Z., Márki-Zay, J., Kappelmayer, J., Sipka, S., Krajcsi, P., & Toldi, G. (2019). Determination of Reference Values of MDR-ABC Transporter Activities in CD3+ Lymphocytes of Healthy Volunteers Using a Flow Cytometry Based Method. *Cytometry Part B - Clinical Cytometry*, *96*(6), 469–474. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21729>
- Teachey y Pui. (2019). Comparative features and outcomes between paediatric T-cell and B-cell acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet Oncology*, *20*(3), e142–e154. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(19\)30031-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(19)30031-2)
- Thapa y Farber. (2019). The Role of the Thymus in the Immune Response. In *Thoracic surgery clinics*, *29*(2):123-131. NLM (Medline). <https://doi.org/10.1016/j.thorsurg.2018.12.001>
- The R Core Team. (2018). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. <https://www.gnu.org/copyleft/gpl.html>.
- Tian, Q., Zhang, J., Tan, T. M. C., Chan, E., Duan, W., Sui, Y. C., Boelsterli, U. A., Ho, P. C. L., Yang, H., Bian, J. S., Huang, M., Zhu, Y. Z., Xiong, W., Li, X., & Zhou, S. (2005). Human multidrug resistance associated protein 4 confers resistance to camptothecins. *Pharmaceutical Research*, *22*(11), 1837–1853. <https://doi.org/10.1007/s11095-005-7595-z>
- Valenzuela-Vazquez, L., Núñez-Enríquez, J. C., Sánchez-Herrera, J., Jiménez-Hernández, E., Martín-Trejo, J. A., Espinoza-Hernández, L. E., Medina-Sanson, A., Flores-Villegas, L. V., Peñaloza-González, J. G., Torres-Nava, J. R., Espinosa-Elizondo, R. M., Amador-Sánchez, R., Santillán-Juárez, J. D., Flores-Lujano, J., Pérez-Saldívar, M. L., García-López, L. R., Castañeda-Echevarría, A., Rodríguez-Leyva, F., Rosas-Vargas, H., ... Cruz-Munoz, M. E. (2020). Functional characterization of NK cells in Mexican pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia: Report from the Mexican Interinstitutional Group for the Identification of the Causes of Childhood Leukemia. *PLoS ONE*, *15*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227314>
- Van Der Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B., Groenhof, G., Mark, A. E., & Berendsen, H. J. C. (2005). GROMACS: Fast, flexible, and free. In *Journal of Computational Chemistry*, *26*(16):1701-18. <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>
- Wang y Zhong. (2018). Roles of the bone marrow niche in hematopoiesis, leukemogenesis, and chemotherapy resistance in acute myeloid leukemia. *Hematology*, *23*(10), 729–739. <https://doi.org/10.1080/10245332.2018.1486064>
- Wang, J. Q., Wu, Z. X., Yang, Y., Teng, Q. X., Li, Y. D., Lei, Z. N., Jani, K. A., Kaushal, N., & Chen, Z. S. (2021). ATP-binding cassette (ABC) transporters in cancer: A review of recent

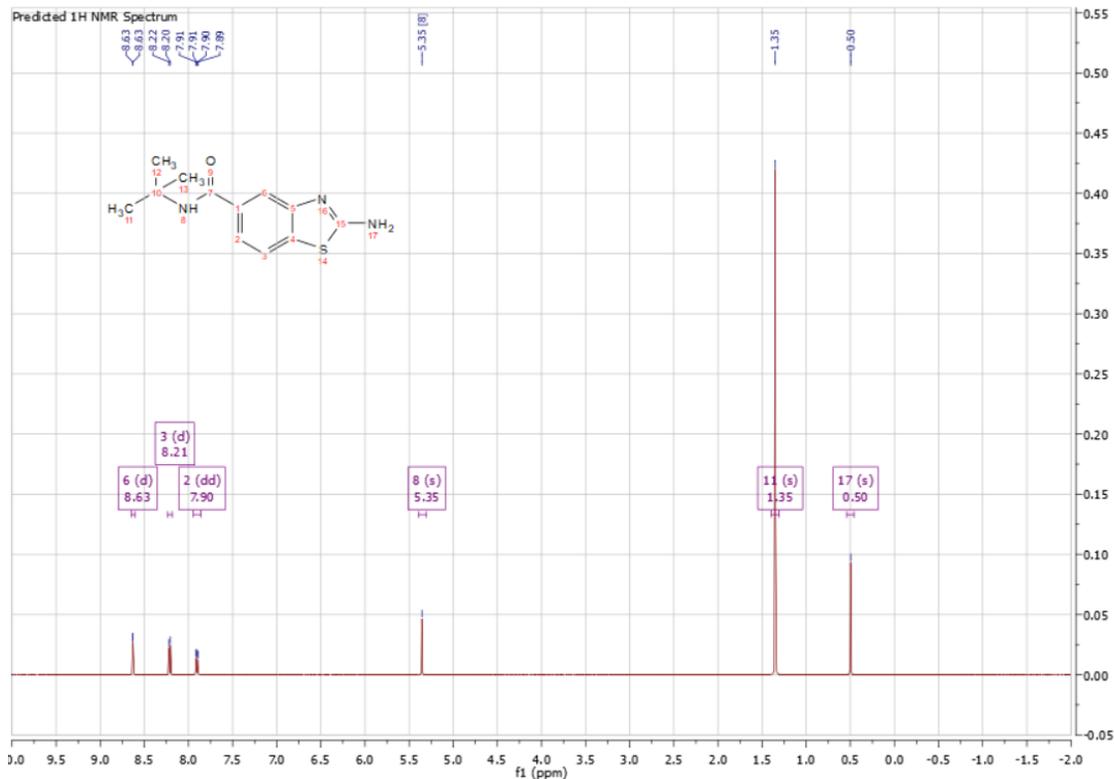
- updates. In *Journal of Evidence-Based Medicine*, 14(3):232-256 . John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/jebm.12434>
- Wang, J. Q., Yang, Y., Cai, C. Y., Teng, Q. X., Cui, Q., Lin, J., Assaraf, Y. G., & Chen, Z. S. (2021). Multidrug resistance proteins (MRPs): Structure, function and the overcoming of cancer multidrug resistance. *Drug Resistance Updates*, 54(December 2020). <https://doi.org/10.1016/j.drug.2021.100743>
- Wen, J., Luo, J., Huang, W., Tang, J., Zhou, H., & Zhang, W. (2015a). The pharmacological and physiological role of multidrug-resistant protein 4. In *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 354(3):358-75. American Society for Pharmacology and Experimental Therapy. <https://doi.org/10.1124/jpet.115.225656>
- Wen, J., Luo, J., Huang, W., Tang, J., Zhou, H., & Zhang, W. (2015b). The pharmacological and physiological role of multidrug-resistant protein 4. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 354(3), 358–375. <https://doi.org/10.1124/jpet.115.225656>
- Xiao, H., Zheng, Y., Ma, L., Tian, L., & Sun, Q. (2021). Clinically-Relevant ABC Transporter for Anti-Cancer Drug Resistance. In *Frontiers in Pharmacology*, 12. Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.648407>
- Yanagi T, Kikuchi K, Takeuchi H, Ishikaw T, Nishimura T, Kamijo T, Yamamoto I. The practical synthesis of (2S)-7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydro-2-naphthylamine via optical resolution of 2-(3-methoxybenzyl)succinic acid. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2001 Mar;49(3):340-4. doi: 10.1248/cpb.49.340.
- Yanef A, Sahores A, Gómez N, Carozzo A, Shayo C, Davio C. MRP4/ABCC4 As a New Therapeutic Target: Meta-Analysis to Determine cAMP Binding Sites as a Tool for Drug Design. *Curr Med Chem*. 2019;26(7):1270-1307. doi: 10.2174/0929867325666171229133259.
- Zhang H, Kong Q, Wang J, Jiang Y, Hua H. Complex roles of cAMP-PKA-CREB signaling in cancer. *Exp Hematol Oncol*. 2020 Nov 24;9(1):32. doi: 10.1186/s40164-020-00191-1.
- Zhou, S.-F., Wang, L.-L., Di, Y., Xue, C., Duan, W., Li, C., & Li, Y. (2008). Substrates and Inhibitors of Human Multidrug Resistance Associated Proteins and the Implications in Drug Development. *Current Medicinal Chemistry*, 15(20), 1981–2039. <https://doi.org/10.2174/092986708785132870>

ANEXOS

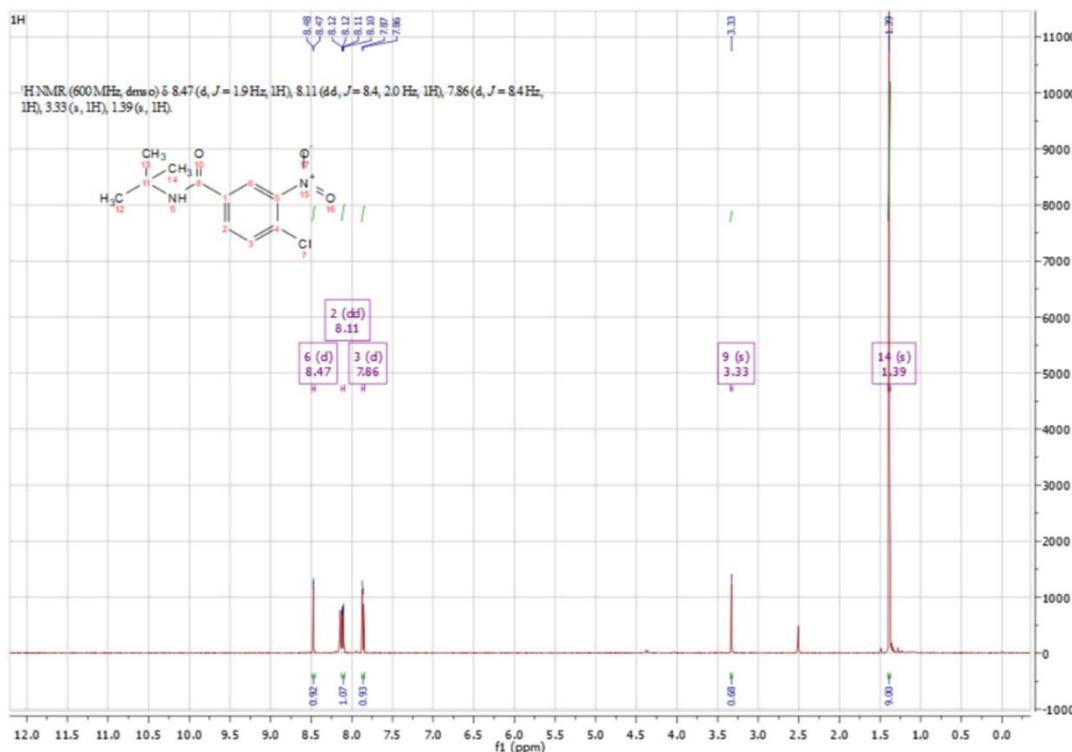
Anexo 1. Resultados del alineamiento entre la proteína MRP4 M y MRP4 C1 (ATPs).

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
859 bits(2220)	0.0	Compositional matrix adjust.	495/1354(37%)	774/1354(57%)	100/1354(7%)
Query 196	PLFSETINDPNPCPESSASFLSRITFWITGMMVQGYRQPLESTDLSLNKEDTSEQVVP				255
Sbjct 3	P++ E PNP + A+ SR+ FW+ + G+++ LE D++S+ ED S+ + PVYQEV--KPNPLQD--ANLCSRFFFWLNPLFKIGHKRRLEEDDMYSVLPEDRSQHLGE				58
Query 256	VLVKNWKKCEAKSRKQPKVIVYSKDPKPKGSKVDVNEEAEALIVKCPQKERDPSLFK				315
Sbjct 59	L W KE ++++++ PSL + ELQGFWDKE-----VLRAENDAQKPSLTR				82
Query 316	VLYKTFGPYFLMSFLKAVHDLMMFAGPEILKLLINFVNDKKAPEW---QGYFYTALLF				371
Sbjct 83	+ K + +L+ +F + + P L +IN+ + + Y Y +L AIIKCYWKSYLVLGIFTLIEESAKVIQPIFLGKIINYFENYDPMDSVALNTAYAYATVLT				142
Query 372	ISACLQTLVLHQYFHICFVSGMRIKTAVIGAVYRKALVITNAARKSSTVGEIVNLSVDA				431
Sbjct 143	+ ++ H YF+ +GMR++ A+ +YRKAL ++N A +T G+IVNLS D FCTLLIALLHLLHYFYHVQCAGMLRVAMCHMIYRKALRLSNMAMGKTTTGQIVNLLSNDV				202
Query 432	QRFMDLATYINMINSAPLQVILALYLLWNLGPSVLGAVAVMLVPLNAVMAKTKTYQ				491
Sbjct 203	+F + +++ +W+ PLQ I LLW+ +G S LAG+AV++++PL + + + NKFQDQVTVLHFLWAGPLQAIATVALLWMEIGTISCLAGMAVLIILLPLQSCFCGKLFSSLR				262
Query 492	VAHMKSDNRILMNEILNGIKVLYAWELAFKDKVLAIRQELKVLKKSAYLAAVGTG				551
Sbjct 263	D RI+ MNE++ GI+++K+YAW E +F + + +R++E+ + +S+ L + SKTATFTDARIRTMNEVITGIRIIMYAWEKSFNLI TNLRKKEISKILRSCLRGMNLA				322
Query 552	TWCTPFLVALSTFAVYVTDENNILDAQAFVSLALFNILRFPLNI-LPMVISSIVQAS				610
Sbjct 323	++ ++ TF YV + +++ A + FV++ L+ +R + + P I + +A SFFSASKIIVFVFTTYVLL--GSVITASRVFVAVTLYGAVRLVTLLFFPSAIERVSEAI				380
Query 611	VSLKRLRVFLSHEDLPDPSIQRRPKDAGATNSITVKNATFTWAR-NDPPTLHGITFSVP				669
Sbjct 381	VS++R++ FL LD S + R + G + V++ T W + ++ PTL G++F+V VSIRRIQTFL--LDEISQRNRQLPSDGK-KMVHVQDFAFWDKASETPTLQGLSFTVR				436
Query 670	EGSLVAVVGQVCGKSSLLSALLAEMDKVEGHVTVKGSVAVPQQAQWISLRENILFG				729
Sbjct 437	G L+AVVG VG GKSSLLSA+L E+ G V+V G +AVY QQ W+ + +LR NILFG PGEILLAVVGPVAGKSSLLSAVLGELAPSHGLVSHGRIAYVQQPWFSGTLRSNILFG				496
Query 730	RQLQERYKAVVEACALLPDLEILPSGDRTEIGEKGVNLGGQKQVRSLARAVYCDSDVY				789
Sbjct 497	++ ++ Y+ V++ACAL DL++L GD T IG++G LSGGQK RV+LARAVY D+D+Y KRYEKERYEKVAKACALKKDLQLLEDGDLTVIGDRGTTLSGGQKARVNLARAVYQDADIY				556
Query 790	LLDDPLSAVDAHVGHKHFENVIGPKGLLNKTRLLVTHAISYLPQMDVIVVSGGKISEM				849
Sbjct 557	LLDDPLSAVDA V +H+FE I +L K +LVTH + YL I+++ GK+ + LLDDPLSAVDAEVSRLHFLCICQ--ILHEKITILVTHQLQYLKAASQILILKDGKMWQK				614
Query 850	GSYQELLARDGAFAEFLRTYASAEQEQGQPEDGLAGVGGPGKVEKQMGMLVTDTAGKQ				909
Sbjct 615	G+Y E L F L+ +E QP P + N GTYTEFLKSGIDFGSLK--KDNEEQP-----PVPGTPTRLN-----				651
Query 910	MQRQLSSSSYSRDSVQHHTSTAELRKPPTETEHWLVEADKAQTQVKLSVYWDYMKAI				969
Sbjct 652	R S SS +S+ S+ L L E +++ G+V Y +Y +A --RTFSESSVWSQSSRPSLKDGALESQDTENVPVTLSEENRSE-GKVGQAYKNYFRAG				708
Query 970	GLFISFLSIFLFCN--HVASLVSNYWLSDWTD----DPVINGTQEHQVRLSVYGAL				1021
Sbjct 709	+I F IFL L N VA ++ +NLS W + + VNG T+ +L + L AHWIVF--IFLILLNTAAQVAVYVLDWNLVSYWANKQSMNLVTVNGGGNVTE-KLDLHWYL				765
Query 1022	GISQGITV---FGYMAVSIIGGIF--ASRRLHDLHLNWRSPISFFERTPSGNLNRFR				1075
Sbjct 766	GI G+TV FG + ++ + + +S+ LH + ++L++P+ FF+R P G +NRFR GIYSGLTVATVLFGIARSLLVFYVLVNSQTLHNKMFESILKAPVLFDRNPGRILNRFR				825
Query 1076	SKELDTVDSMIPQVIKMFMSLNFVIGACIIILLATPMAAVIPPLGLIYFFVQRFYVAS				1135
Sbjct 826	SK++ +D ++P F+ +L V+G + + P A+ + PLG+I+ F++R+++ + SKDIGHLDLPLPLTFLDFITQLLQVGVVSAVAVIPWIAIPLVPLGIIFILRRYFLET				885
Query 1136	SRQLKRLESVSRSPVYSHFNETLLGVSVIRAFEEQERFIRQSDLKVDENQKAYPSIVAN				1195
Sbjct 886	SR +KRLES +RSPV+SH + +L G+ IRA++ +ER D D + +A++ + + SRDVKRLESTTRSPVSHLSSSLQGLWTIRAYKAEEERCQELFDAHQDLHSEAWFLFTTS				945
Query 1196	RWLAVRLECVGNLIVLFAVFAVSRHSLSAGLVGLSVSLSQVTTYLNWLVRMSSEMET				1255
Sbjct 946	RW AVRL+ + V+ + ++I +L AG VGL++SY+L + W VR S+E+E RWFVAVRLDAICAMFVIIVAFGSLILAKTLDAGQVGLALSYALTLMGMFQWCVRQSAEVEN				1005
Query 1256	NIVAVERLKEYSETEKEAPWQIQDMAPPKDWPQVGRVEFRDYGLRYREDLVLKHINVT				1315
Sbjct 1006	+++VER+ EY++ EKEAPW+ Q PP WP G + F + Y LVLKH+ MMISVERVIEYTDLEKEAPWEYQKRPPPA-WPHEGVIIIFDNVFMYSPPGGLVLKHTAL				1064
Query 1316	IDGGEKVGIVGRTGAGKSSLTLGLFRIKESAEIEIIDINIAGLHDLRFKTIIPQD				1375
Sbjct 1065	I EKVIGVGRGAGKSSL LFR+ E EG+I ID I +IGLHDLR K++IIPQ+ IKSQKVGIVGRTGAGKSSLISALFRLSE-PEGKIWDKILTTEIGLHDLRKKMSIIPQ+				1123
Query 1376	PVLFSGSLRMLNDPFSQYSDEEVTSLLELAHLKGFVSALPDKLNHECAEGGENLSVGRQ				1435
Sbjct 1124	PVLF+G++R NLDPF++++DEE+W +L+ LK + LP K++ E AE G N SVGRQ PVLFTGTRMKNLDPFNEHTDEELWALQEVQLKETIEDLPKMDTELAESGSNFSVGRQ				1183
Query 1436	LVCLARALLRKTILVLDEATAAVDLETDLIQSTIRTQFDDCTVLTIAHRLNTIMDYTR				1495
Sbjct 1184	LVCLARA+LRK +IL++DEATA VD TD+LIQ IR +F CTVLTIAHRLNTI+D + LVCLARAILRKNQILIDEATANVDPRTDELIQKIREKFAHCTVLTIAHRLNTIIDS				1243
Query 1496	VIVLDKGEIQEWGSPDLLQQR-GLFYMAKDSG 1528				
Sbjct 1244	++VLD G ++E+ P LLQ + LFY M + G IMVLDSGRLKEYDEPVYVLLQNKESLFYKMQQLG 1277				

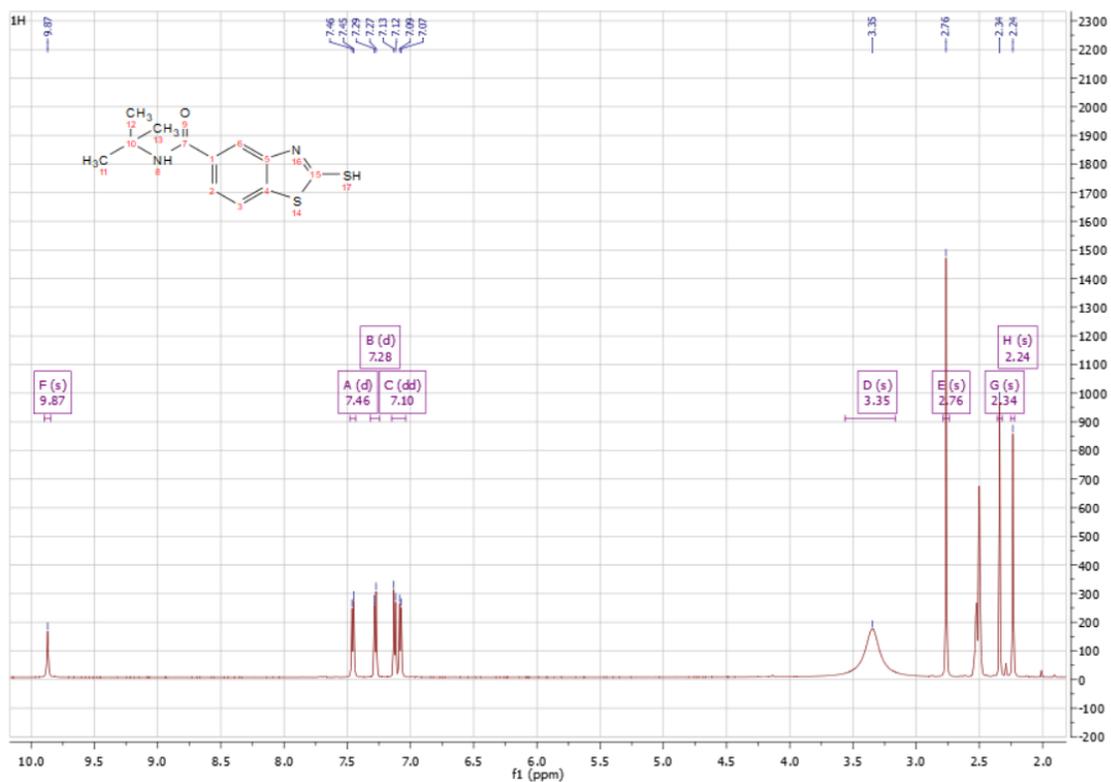
Anexo 4. Espectro predicho de RMN de ^1H del compuesto 4, fragmento A.



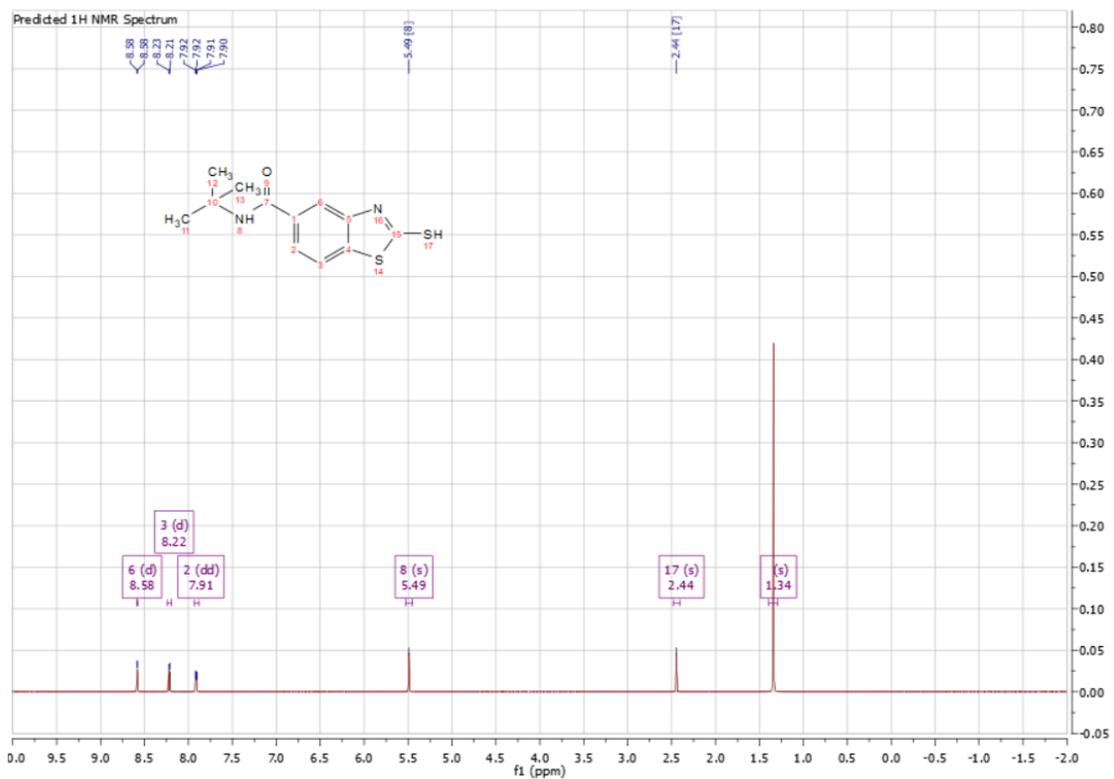
Anexo 5. Espectro de RMN ^1H del intermediario 4 de la síntesis del fragmento B.



Anexo 6. Espectro de RMN 1H del compuesto 5, fragmento B.



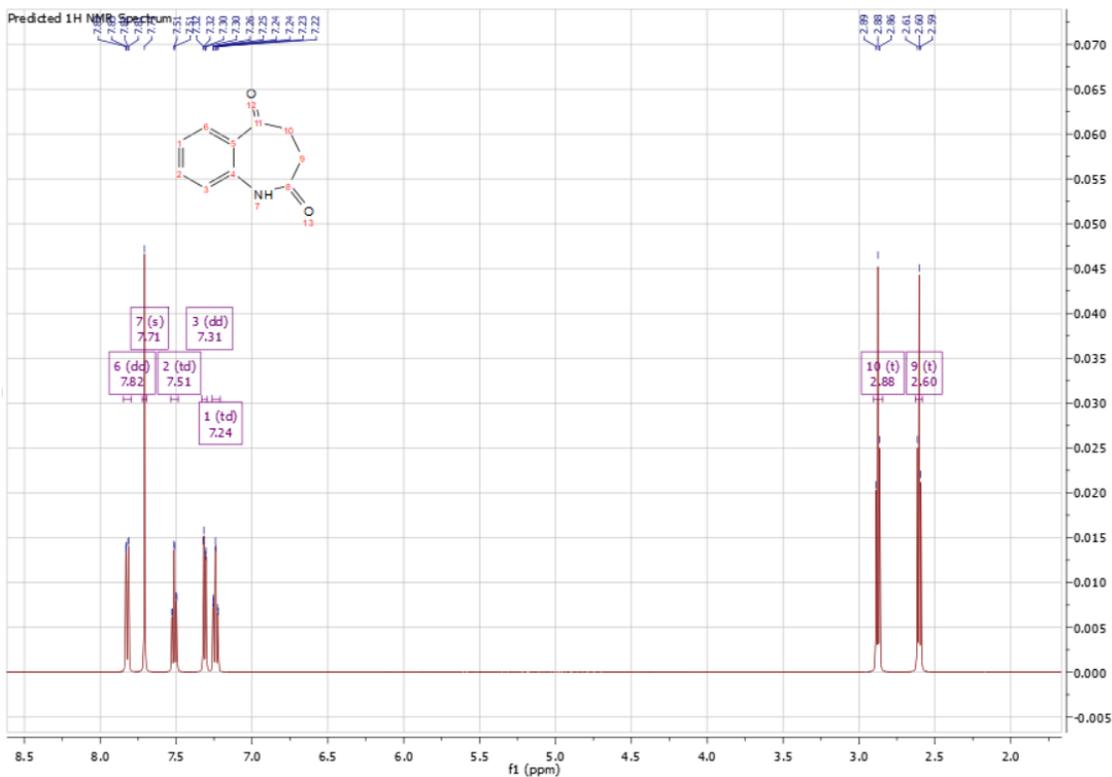
Anexo 7. Espectro predicho de ¹H RMN del compuesto 5, fragmento B.



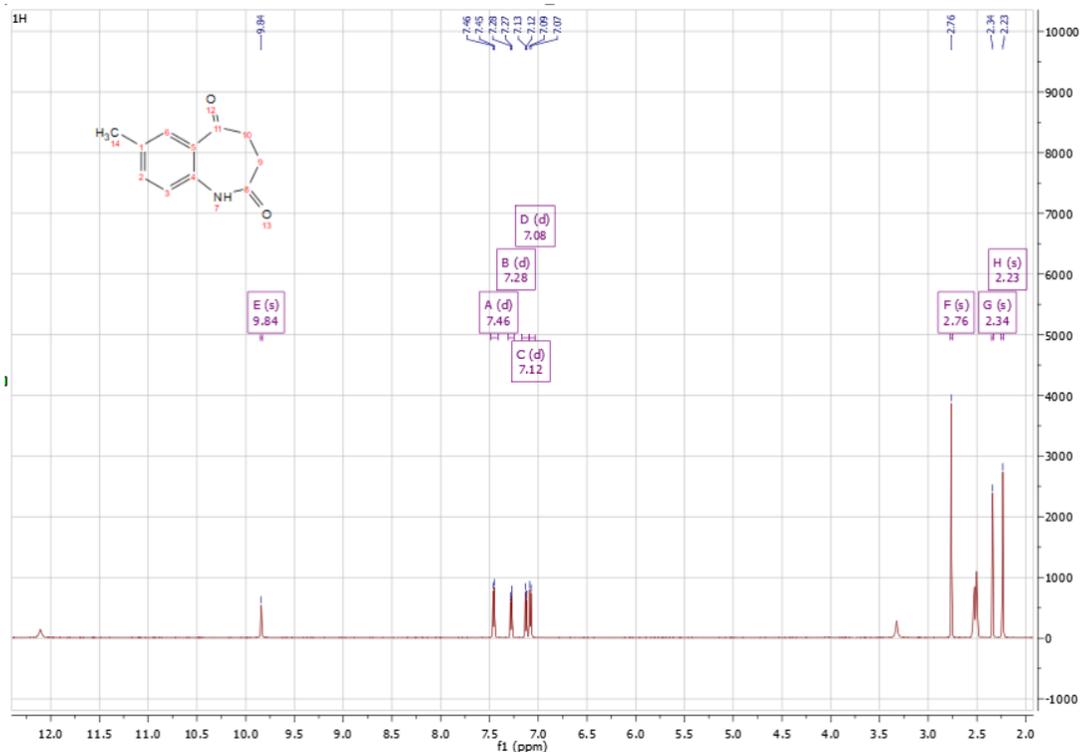
Anexo 8. Espectro de RMN 1H del intermediario 11 del fragmento D.



Anexo 9. Espectro predicho de ¹H RMN del intermediario 11 del fragmento D.



Anexo 10. Espectro de RMN 1H del compuesto 14, fragmento D metilado.



Anexo 11. Espectro predicho de RMN 1H del compuesto 14, fragmento D metilado.

