



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Química  
Doctorado en Ciencias Químico Biológicas

**“DISEÑO, SÍNTESIS Y EVALUACIÓN DE INHIBIDORES  
DEL TRANSPORTADOR MRP4, COMO INDUCTORES  
SELECTIVOS DE APOPTOSIS, EN UN MODELO *IN VITRO*  
DE LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS**

**PRESENTA**

**M. en C. EDGARDO BECERRA BECERRA  
DIRIGIDA POR  
Dra. MARÍA GUADALUPE GARCÍA ALCOCER**

**QUERÉTARO  
CENTRO UNIVERSITARIO  
JULIO DE 2021  
MÉXICO**



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Química  
Doctorado en Ciencias Químico Biológicas

“DISEÑO, SÍNTESIS Y EVALUACIÓN DE INHIBIDORES DEL TRANSPORTADOR  
MRP4/ABCC4, COMO INDUCTORES SELECTIVOS DE APOPTOSIS, EN UN  
MODELO *IN VITRO* DE LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA”

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de Doctor en Ciencias  
Químico Biológicas

Presenta

M. en C. Edgardo Becerra Becerra

Dirigido por:

Ma. Guadalupe García Alcocer

Dra. Ma. Guadalupe García Alcocer  
Director

Dr. Antonio Romo Mancillas  
Asesor

Dr. Jaime Pérez Villanueva  
Asesor

Dr. Mamadou Moustapha Bah  
Asesor

Dra. Laura Cristina Berumen Segura  
Asesor

Centro Universitario  
Querétaro, Qro  
Julio, 2021

## Agradecimientos

- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca de doctorado (335389) que me fue otorgada y mediante la cual pude dedicar tiempo completo a mis estudios doctorales.
- A la Universidad Autónoma de Querétaro por el apoyo del Fondo para el Fortalecimiento de Investigación (FOFI-UAQ), FCQ2018-39.
- Agradezco a todos mis sinodales, ya que en todo momento tuve su apoyo pronto y certero, en especial en esta temporada de pandemia que ha sido difícil para todos.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## ÍNDICE GENERAL

| Contenido   | Página |
|---|--------|
| ÍNDICE GENERAL  | i      |
| ÍNDICE DE FIGURAS   | ii     |
| ÍNDICE DE TABLAS  | iii    |
| RESUMEN   |        |
| SUMMARY   |        |
| <br>  |        |
| 1. Introducción   | 1      |
| 2. Antecedentes   | 3      |
| 2.1 Leucemia linfoblástica aguda  | 3      |
| 2.2 Fisiopatología de la LLA  | 4      |
| 2.3 Resultados generales de supervivencia para LLA  | 5      |
| 2.4 Quimiorresistencia en células leucémicas  | 6      |
| <br>  |        |
| 2.5 Transportadores de eflujo –Transportadores de cassette de unión a ATP- mediadores de quimiorresistencia | 7      |
| 2.5.1 Proteínas de resistencia a múltiples fármacos (MRP/ABCC)  | 10     |
| 2.5.2 MRP4 en LLA   | 12     |
| 2.5.2.1 Vía de señalización apoptótica de AMPc en leucemia  | 13     |
| 2.5.3 Estructura del MRP4 y sus interacciones intermoleculares con inhibidores                              | 17     |
| 2.6 Inhibidores del MRP4 y del eflujo de AMPc   | 22     |
| <br>  |        |
| 3. Hipótesis  | 30     |
| 4. Objetivos  | 30     |
| 4.1 General   | 30     |
| 4.2 Específicos   | 30     |
| 5. Materiales y métodos   | 31     |
| 6. Resultados y discusión   | 36     |
| 7. Conclusión   | 61     |
| 8. Referencias  | 62     |

## ÍNDICE DE FIGURAS

| Figura |   | Página |
|--------|---|--------|
| 1      | Arreglo general de los dominios de los transportadores ABC, tales como ABCB1, ABCC4 y ABCC5.                      | 8      |
| 2      | Mecanismo de transporte de sustratos mediado por transportadores ABC.   | 9      |
| 3      | Modelos de topología de la membrana en dos dimensiones, para glicoproteína-P, MRP1 y MRP5.                        | 11     |
| 4      | Vía de señalización apoptótica mediada por AMPc.  | 15     |
| 5      | Trazo-Ca de la columna vertebral del MRP4, visto desde el plano de la membrana.                                   | 19     |
| 6      | Moléculas con potencial inhibitorio sobre el transportador glicoproteína-P (alta homología con MRP4).             | 21     |
| 7      | Modelo farmacofórico de inhibidores del MRP4.   | 22     |
| 8      | Efecto del inhibidor específico de MRPs sobre el eflujo de F-AMPc.  | 23     |
| 9      | Efecto de diferentes fármacos inhibidores del eflujo de AMPc sobre la viabilidad en líneas celulares de leucemia. | 25     |
| 10     | Efecto de tirfostina, glafenina, prazosina, dantroleno y ácido nalidíxico sobre la inhibición de MRP4.            | 26     |
| 11     | Modelo 1 obtenido en I-TASSER que representa la estructura 3D de MRP4.  | 38     |
| 12     | Gráfico de Ramachandran del modelo MRP4 3D ejecutado en el servidor de validación Procheck.                       | 38     |
| 13     | Clusters de dinámica molecular a través de 19 ns de simulación en GROMACS.  | 40     |
| 14     | Conformación del cluster 2 del complejo MRP4-membrana a 8,2 ns de SDM.  | 41     |

|    |   |    |
|----|---|----|
| 15 | Identificación de los fragmentos de cefourina-1 y quercetina relevantes para la interacción con el MRP4.        | 46 |
| 16 | Espectro RMN del fragmento 1.   | 50 |
| 17 | Espectro RMN del fragmento 2.   | 51 |
| 18 | Espectro RMN de EBD9.   | 52 |
| 19 | Estructuras de los fragmentos 1 y 2 y de EBD9 esperadas vs estructuras obtenidas.                               | 53 |
| 20 | Diagramas de interacción de la estructura de EBD9 esperada vs la estructura de EBD9 obtenida (mezcla-EBD9).     | 56 |
| 21 | Curva concentración-respuesta de EBD9 sobre el eflujo de AMPc en células Jurkat.                                | 56 |
| 22 | Efecto de los distintos tratamientos sobre los niveles de AMPc en células Jurkat.                               | 57 |
| 23 | Inducción de apoptosis por los distintos tratamientos sobre células Jurkat en comparación con células CRL-1991. | 60 |

#### ÍNDICE DE TABLAS

| Tabla |  | Página |
|-------|--|--------|
| 1     | Miembros de la subfamilia MRP/ABCC y su porcentaje de homología.   | 11     |
| 2     | Fármacos con potencial inhibitorio sobre el T-MRP4.  | 24     |
| 3     | Fármacos inhibidores de MRP4.  | 27     |
| 4     | Grupos de moléculas evaluadas mediante docking molecular   | 33     |
| 5     | Diseño experimental para el tratamiento de células Jurkat y CRL-1991 para la evaluación del efecto apoptótico. | 35     |
| 6     | Estrategia del diseño de las moléculas de la serie A a D.  | 43     |
| 7     | Principales residuos de MRP4 para la interacción con los 3 grupos de moléculas estudiados.                     | 44     |

|   |  |    |
|---|--|----|
| 8 | Diagramas de interacción y DSs de quercetina, cefourina-1 y EBD9 con MRP4. | 46 |
| 9 | Estructura de las 3 moléculas diseñadas con mejor DS con MRP4              | 47 |

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## **DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DE ESTUDIANTE**

Declaro que los datos 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.

Dirección General de Bibliotecas UJCV

## RESUMEN

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es un tipo de cáncer desarrollado a partir de progenitores linfoides en la médula ósea. Se presenta principalmente en niños de 0 a 14 años y su incidencia disminuye conforme aumenta la edad. El tratamiento de elección es la quimioterapia y se usan dosis elevadas de quimioterapéuticos, lo cual es tóxico para el paciente debido a que afectan tanto a células sanas como a células cancerosas. El desarrollo de quimiorresistencia está dado, entre otros factores, por transportadores de cassette de unión a ATP (transportadores ABC), los cuales favorecen el transporte de fármacos y otras moléculas al exterior de la célula. En leucemia, se ha estudiado ampliamente la subfamilia C de transportadores ABC, en especial la proteína de resistencia a múltiples fármacos (MRP4, por sus siglas en inglés). El transportador MRP4 favorece el eflujo de AMPc como un mecanismo para evitar apoptosis y asegurar la supervivencia de células leucémicas. En el presente trabajo se utilizaron herramientas como el modelado por homología, docking molecular y dinámica molecular para realizar un diseño basado en fragmentos de 3 moléculas (EBD1, EBD9, EBD14) con potencial inhibitorio sobre MRP4, con el objetivo de modificar el eflujo de AMPc e inducir apoptosis en células Jurkat de LLA. La molécula EBD9 presentó una mejor afinidad hacia MRP4, se sintetizó y evaluó su efecto inhibitorio sobre MRP4 mediante la medición de los niveles intracelulares de AMPc. EBD9 inhibió el eflujo de AMPc con una  $IC_{50}$  de 1.35  $\mu$ M, con un efecto dependiente de la concentración. Así mismo, se evaluaron los fragmentos 1 y 2, teniendo, por separado, un efecto inhibitorio menor a EBD9. EBD9 presentó un efecto apoptótico significativamente mayor en células Jurkat que en células hematopoyéticas normales CRL-1991, lo cual indica una apoptosis selectiva. Debido a que la identificación del compuesto EBD9 no fue concluyente y se presenta contaminación en la muestra se requiere continuar la investigación para comprobar el efecto específico de EBD9 en células leucémicas, así como su seguridad en modelos *in vivo*.

Palabras clave: Leucemia linfoblástica aguda, quimiorresistencia, MRP4, AMPc, apoptosis, inhibidores de MRP4.

## SUMMARY

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is a type of cancer that develops from lymphoid progenitors in the bone marrow. It occurs mainly in children from 0 to 14 years old and its incidence decreases with increasing age. The treatment of choice is chemotherapy and high doses of chemotherapeutics are used, which is toxic to the patient due to their non-specificity. The development of chemoresistance is given, among other factors, by ATP-binding cassette transporters (ABC transporters), which favor the transport of drugs and other molecules outside the cell. In leukemia, the subfamily C of ABC transporters, especially the transporter ABCC4 or multidrug resistance protein (MRP4), has been extensively studied. The MRP4 transporter promotes cAMP efflux as a mechanism to prevent apoptosis and ensure the survival of leukemic cells. In the present work, tools such as homology modeling, molecular docking and molecular dynamics were used to carry out a design based on fragments of 3 molecules (EBD1, EBD9, EBD14) with inhibitory potential on MRP4, with the aim of modify the cAMP efflux and inducing apoptosis in ALL Jurkat cell. The EBD9 molecule was synthesized and its inhibitory effect on MRP4 was evaluated by measuring the levels of cAMP. EDD9 inhibited cAMP efflux with an IC50 of 1.35  $\mu$ M in a concentration-dependent manner. Likewise, fragments 1 and 2 were evaluated, showing separately, a lower inhibitory effect than EBD9. EBD9 exhibited a significantly greater apoptotic effect in Jurkat cells than in normal CRL-1991 hematopoietic cells, indicating selective apoptosis. Since the identification of the EBD9 compound was not conclusive and contamination is present in the sample, further research is required to verify the specific effect of EBD9 on leukemic cells, as well as its safety in *in vivo* models.

Key words: Acute lymphoblastic leukemia, chemorresistance, MRP4, cAMP, apoptosis, MRP4 inhibitors.

## 1. Introducción

La leucemia es un tipo de cáncer en las células hematopoyéticas en desarrollo. Dicho cáncer puede clasificarse de acuerdo con el linaje de la célula afectada y a la velocidad con la que prolifera. Los linajes pueden ser mieloide o linfoide, y de acuerdo con la velocidad de proliferación la leucemia puede ser aguda; rápida proliferación, crónica; lenta proliferación comparada con la aguda, pero rápida proliferación celular comparada con células hematopoyéticas normales.

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) se deriva de un progenitor linfoide y, a su vez, puede subdividirse en LLA de células B y LLA de células T (LLA-T). La LLA-T es agresiva y progresa rápidamente. Se presenta de un 10-15% de los casos en niños y en 25% en adultos; hasta antes de 1980 se consideraba incurable porque no había tratamientos eficaces. Las tasas de cura, actualmente son de 75% en niños y 50% en adultos. Sin embargo, el pronóstico de supervivencia es malo para pacientes con LLA-T resistente o con recaídas. El tratamiento de elección para la leucemia es la quimioterapia y consta de tres fases: inducción, consolidación y mantenimiento. Las dos primeras fases tienen una duración de aproximadamente dos meses cada una, mientras que la fase de mantenimiento puede prolongarse hasta los dos años. Las dosis de quimioterapéuticos que se utilizan son muy altas y esto representa una alta toxicidad para el paciente. Las altas dosis de quimioterapéuticos a los que son expuestos los pacientes pueden, además, favorecer el desarrollo de quimiorresistencia. La quimiorresistencia puede estar influenciada por factores extrínsecos, como el microambiente en la médula ósea. Esto favorece el crecimiento y supervivencia de las células leucémicas. Sin embargo, también existen factores intrínsecos y los más estudiados son los transportadores de cassette de unión a ATP (transportadores ABC). Éstos tienen la habilidad de transportar moléculas endógenas, xenobióticos y fármacos hacia el exterior de la célula; debido a que transportan fármacos, las células son resistentes a éstos y, por lo tanto, las dosis requeridas son mayores. Las proteínas de resistencia a múltiples fármacos (MRP, por sus siglas en inglés), pertenecen a la subfamilia C de transportadores ABC, y

están implicadas en la quimiorresistencia en leucemia. El transportador MRP4 ha sido ampliamente estudiado en leucemia mieloide, ya que representa un blanco terapéutico altamente selectivo sobre células leucémicas. El transportador MRP4 favorece el eflujo de fármacos como las tiopurinas, las cuales son indispensables en el tratamiento de la LLA. El AMPc es la principal molécula transportada por el MRP4, y es de vital importancia, ya que participa en procesos de diferenciación hematopoyética, proliferación celular y apoptosis. Se ha reportado que la acumulación de AMPc en la célula, por inhibición de su eflujo, favorece procesos pro-apoptóticos exclusivamente en células leucémicas; por lo tanto, la inhibición del transportador MRP4 podría ser una novedosa estrategia terapéutica. En este trabajo se realizará el diseño y síntesis de moléculas con potencial inhibitorio sobre el transportador MRP4, con el objetivo de inhibir el eflujo de AMPc y favorecer la apoptosis de una manera selectiva sobre un modelo de LLA.

## **2. Antecedentes**

### **2.1 Leucemia linfoblástica aguda**

La leucemia es un tipo de cáncer de las células sanguíneas en desarrollo. La mayoría de las leucemias son derivadas de los leucocitos (glóbulos blancos), aunque en algunos casos se derivan, también, de eritrocitos (glóbulos rojos) y plaquetas [1].

El tipo de leucemia depende del tipo de células afectadas y de la velocidad en la que ésta prolifere; de acuerdo con el tipo de linaje celular, pueden ser leucemias mieloblásticas o mielocíticas y leucemias linfoblásticas o linfocíticas, y de acuerdo a la velocidad de proliferación, se clasifican en: leucemias agudas; proliferación rápida, leucemias crónicas: proliferación lenta pero superior a las células sanguíneas normales.

Las leucemias difieren en cuanto a su agresividad, características clínicas y respuesta al tratamiento[2]. La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es la más común y, a su vez puede subdividirse en LLA de células B y LLA de células T (LLA-T). La LLA-T es agresiva y progresa rápidamente. Se presenta de un 10-15% de los casos, en niños y en 25% en adultos[3]. La incidencia a nivel mundial es de 4 a 5 por cada millón de niños de 0 a 14 años, mientras que en adolescentes de 15 a 19 años es de 2 por cada millón[4]. Desde 1975, la incidencia de LLA se ha ido incrementando a nivel mundial, principalmente en países en vías de desarrollo. Sin embargo, en México y otros países hispanos, la incidencia promedio, en todas las edades es de 5 por cada millón de habitantes y no disminuye [5]. La incidencia en niños de 2 a 3 años es mayor a 90 casos por millón de habitantes y ésta decrece a 30 casos por cada millón de habitantes, en niños de 8 a 10 años, mientras en la población hispana la incidencia es significativamente mayor en todos los casos. Los pacientes con LLA presentan infiltración difusa de linfoblastos en la médula ósea, alto

recuento de glóbulos blancos, masas mediastinales con efusiones pleurales y frecuente infiltración en el sistema nervioso central al momento del diagnóstico[6].

## 2.2 Fisiopatología de la LLA

La transformación de una célula linfoide precursora a un linfoblasto T leucémico es un proceso de múltiples pasos. En dicho proceso, diferentes alteraciones genéticas cooperan para alterar el mecanismo de crecimiento celular, proliferación, supervivencia y diferenciación, ésta última dando origen a una clona de células linfoides con la capacidad de proliferar de manera no regulada [7]. La mayoría de los genes relacionados con LLA codifican proteínas relacionadas con el desarrollo linfoide, lo que favorece el arresto en el desarrollo celular linfoide, y un evento secundario en la regulación del ciclo celular, supresión de tumores, lo que dará lugar al establecimiento de la clona leucémica [8].

La activación constitutiva de la vía de señalización NOTCH es la predominante en LLA-T. Por otro lado, las deleciones en el locus CDKN2A en la banda del cromosoma 9p21, la cual engloba a los genes supresores de tumores p16/INK4A y p14/ARF, están presentes en más del 70% de los casos de LLA-T[9]. Así, la activación constitutiva de la vía de señalización NOTCH y la pérdida de p16/INK4A y p14/ARF constituyen el núcleo oncogénico en la patogénesis de LLA-T. Además, las LLAs-T presentan translocaciones y expresión anormal de factores de transcripción para oncogenes. Los rearrreglos cromosómicos (translocaciones) ponen a los factores de transcripción bajo el control de potenciadores que son específicos de linfoblastos T, los cuales están localizados en los loci TCRB (7q34) y TCRA-TCRD (14q11), lo que resulta en su expresión aberrante en las células progenitoras linfoides T. Los factores de transcripción oncogénicos son de estructura hélice-bucle-hélice como TAL1, TAL2, LYL1 y BHLBHB1, de dominios LIM como: LMO1 y LMO2, otros tales como TLX1/HOX11, TLX3/HOX11L2, NKX2.1, NKX2.2, NKX.5. Otros factores de transcripción oncogénicos son los genes HOX:

MYC, MYB y TAN1, formas truncadas del receptor NOTCH activada constitutivamente[10].

Los estudios de perfiles de expresión génica han revelado que un número limitado de LLAs han sido diferenciadas adecuadamente y éstas comparten un patrón de expresión de genes que reflejan los distintos estados de arresto en la diferenciación de las LLAs-T. Las distintas lesiones genéticas involucradas en la patogénesis de LLA-T son más complicadas por la interacción de alteraciones moleculares y citogenéticas, las cuales son comunes entre todos los subtipos moleculares y causan la desregulación en procesos celulares específicos como la señalización del ciclo celular, crecimiento y proliferación, remodelado de la cromatina, diferenciación de progenitores linfoides T y autorrenovación[11].

Los factores de riesgo además de los factores génicos, para el desarrollo de LLA, son: exposición prenatal a rayos-X, exposición postnatal a radiación, condiciones genéticas como: síndrome de Down, neurofibromatosis, ataxia telangiectasia , anemia de Falconi, síndrome de Bloom, síndrome de Li-Fraumeni (TP53)[12], deficiencias en los sistemas de reparación de mal apareamiento de bases portadores de translocaciones Robertsonianas que incluyen a los cromosomas 15 y 21 [13], así como la alta o baja penetrancia de las variaciones o alteraciones genéticas de cada paciente [14].

### **2.3 Resultados generales de supervivencia para LLA**

La LLA es agresiva y tiene altas tasas de recaídas, aunque el pronóstico ha mejorado gracias a la quimioterapia intensificada. Las tasas de cura son 75% en niños y 50% en adultos [15]. Sin embargo, el pronóstico de supervivencia es malo para pacientes con LLA resistente o con recaídas[6].

Los avances en el tratamiento de la LLA infantil son prometedores; sin embargo, aún quedan muchas preguntas biológicas y terapéuticas importantes por responder,

antes de fijarse la meta de curar la LLA con una menor toxicidad. Los ensayos clínicos, en la actualidad, están enfocados en comparar el tratamiento que se considera estándar, con aquellos regímenes de investigación, con la finalidad de lograr un aumento en las tasas de curación y disminuir la toxicidad, ya que en los casos en que las tasas de curación son altas, la dosis del tratamiento se disminuye y así, la toxicidad. Esto con la finalidad de ofrecer nuevas estrategias de tratamiento, más eficaces y que no comprometan la salud del paciente, ya que en las etapas de tratamiento quimioterapéutico son muy tóxicas, debido a la inespecificidad del tratamiento. Es importante definir e identificar los grupos de riesgo[16].

El tratamiento quimioterapéutico de la LLA se divide en tres fases, con el objetivo de estratificar los diferentes grupos por el porcentaje de células leucémicas y así modificar la dosis y los medicamentos administrados. La primera fase es la inducción y tiene como objetivo lograr la remisión de la enfermedad, y la segunda fase es la consolidación de la remisión; se usan los mismos medicamentos, pero a una dosis mayor. Ambas etapas son muy tóxicas y es en este punto cuando la mayor parte de los pacientes fallece. Algunas de las razones por las cuales se utilizan dosis tan altas son: la inespecificidad del tratamiento, la cantidad de células cancerosas y la resistencia que presentan las células leucémicas al tratamiento[17]. Así que una de las interrogantes es: ¿De qué manera las células desarrollan resistencia a fármacos?

#### **2.4 Quimiorresistencia en células leucémicas**

El tratamiento quimioterapéutico implica altas dosis de diferentes medicamentos, ya que siempre se utilizan dos o más, lo que representa una alta toxicidad para el paciente. El motivo por el cual se utilizan altas dosis es por la elevada población de células leucémicas (CCLL) y por la quimiorresistencia que éstas presentan; este proceso es mediado por diferentes vías. Por ejemplo, se sugiere que factores

solubles y contacto célula-célula pueden afectar la respuesta quimioterapéutica, lo cual puede contribuir, de manera potencial, a las recaídas leucémicas [18].

La quimiorresistencia se clasifica en dos, en CCLL: mediada por factores intrínsecos, como vías de señalización, y la mediada por factores extrínsecos entre los que se encuentran los componentes generados en la médula ósea[19]. El estatus del ciclo celular es uno de los factores más importantes en la regulación de la quimiorresistencia, ya que la mayoría de fármacos están dirigidos a éste. Sin embargo, las CCLL, se encuentran a menudo en estado de quiescencia, lo que implica que la célula no está proliferando, y por tal motivo se ve una reducción en el efecto quimioterapéutico[20]. La vía NF- $\kappa$ B, la cual se mantiene activada constitutivamente, está desregulada en LLA, lo que indica el cumplimiento de un rol en la supervivencia de las CCLL, motivo por lo que se desarrollan fármacos inhibidores de esta vía. Así como las vías intrínsecas, los factores extrínsecos, aportados por el microambiente, favorecen la quimiorresistencia mediante el efecto protector contra la apoptosis; favoreciendo un incremento en la expresión de proteínas antiapoptóticas. Estas proteínas participan en vías de señalización como Akt/PI3K, NOTCH y Wnt/ $\beta$ -catenina [21], y se desarrollan fármacos inhibidores de dichas vías, pero, a pesar del efecto positivo en cuanto al control de la leucemia, la exposición de las células a fármacos puede dar lugar al desarrollo de quimiorresistencia, mediante la inducción de cambios genéticos y epigenéticos. Por otro lado, una de las principales causas de quimiorresistencia es la función de los transportadores de eflujo (TE) que favorecen el eflujo de moléculas al exterior de la célula. Los TE son capaces de transportar fármacos quimioterapéuticos, además de sobreexpresarse en cáncer.

## **2.5 Transportadores de eflujo – Transportadores de casete de unión a ATP- mediadores de quimiorresistencia**

Los transportadores de eflujo pertenecen a la superfamilia de transportadores de casete de unión a ATP (transportadores ABC), los cuales son proteínas

membranales que funcionan con la energía de la hidrólisis de ATP para el transporte de xenobióticos, metabolitos y moléculas de señalización a través de la membrana. Los transportadores ABC comprenden una familia de proteínas estructuralmente relacionadas en el dominio intracelular, que une e hidroliza ATP para así, inducir la actividad ATPasa y mover moléculas desde las regiones de baja concentración a regiones de alta concentración (Figura 2). Dichos transportadores tienen dos dominios transmembranales (TMDs, por sus siglas en inglés) y dominios de unión a nucleótidos (NBDs, por sus siglas en inglés), y generalmente el arreglo de dominios en estos transportadores es TMD-NBD-TMD-NBD (figura 1) [22].

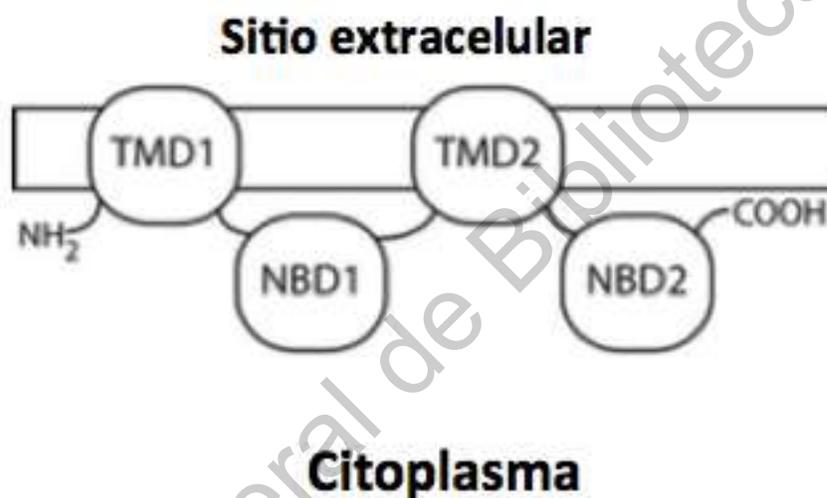


Figura 1. Arreglo general de los dominios de los transportadores ABC, tales como ABCB1, ABCC4 y ABCC5 [22].

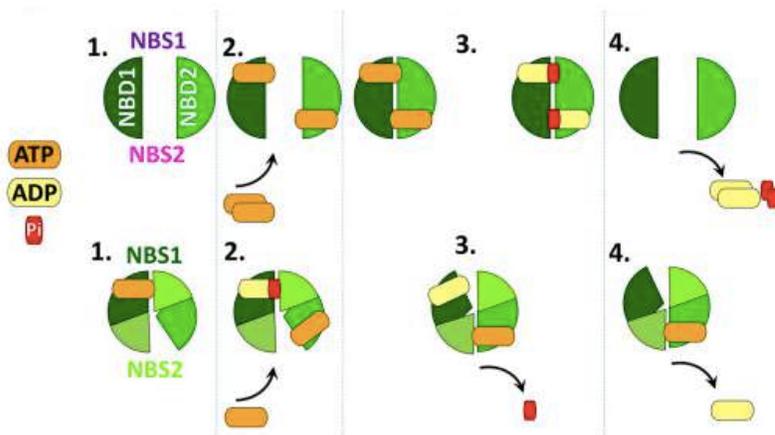


Figura 2. Mecanismo de transporte de sustratos mediado por transportadores ABC. Se muestra el ejemplo del modelo "ATP switch"[23].

La superfamilia de transportadores ABC está compuesta por 48 genes subdivididos en cinco subfamilias: ABCA, ABCB, ABCC, ABCD y ABCG. Las subfamilias ABCE y ABCF están relacionadas con los transportadores ABC, pero no tienen los dominios transmembranales[24]. Ha sido reportado que la familia de transportadores ABC, está implicados en el transporte de quimioterapéuticos, lo cual contribuye significativamente en el fracaso del tratamiento de quimioterapia[25].

Las CCLL y las células madre emplean, como mecanismo de protección, la expresión de transportadores ABC, para favorecer la excreción activa de múltiples fármacos[26], de esta manera, las CCLL que continúan proliferando dan lugar a clones resistentes a múltiples fármacos. La excreción de fármacos no es la única vía por la cual los transportadores ABC favorecen la resistencia a fármacos, también favorecen un fenómeno de reducción del ingreso de fármacos, desbalance en crecimiento, supervivencia y señalización apoptótica[27]. La comprensión del rol de los transportadores ABC en la resistencia a fármacos se ha convertido en una prioridad y, por tal motivo es un importante blanco terapéutico, al ser un problema importante en la quimioterapia.

Szczepansky y colaboradores reportaron en 2011 que existe una relación entre el microambiente tumoral y la resistencia a fármacos, la cual es mediada por la sobreexpresión de una gran variedad de transportadores ABC. El microambiente tumoral induce la expresión de altos niveles de miembros de la subfamilia ABCC y ABCB mediante mecanismos como señalización de la matriz extracelular, adhesión célula-célula y reducción de los niveles de oxígeno por estrés oxidativo[28]. Ejendal y Hryeyna reportan que los miembros de las subfamilias ABCA, ABCB, ABCC y ABCG están implicados en la resistencia a múltiples fármacos[25].

### **2.5.1 Proteínas de resistencia a múltiples fármacos (MRP/ABCC)**

Las proteínas de resistencia a múltiples fármacos (MRPs, por sus siglas en inglés), o también llamadas ABCC, es una de las subfamilias de los transportadores ABC más estudiadas en leucemia, principalmente en la leucemia mieloblástica aguda. La identificación y caracterización de MRPs fue iniciado por la clonación del MRP1 (ABCC1) en 1992 [29], y por su caracterización funcional como un transportador unidireccional dependiente de ATP, para conjugados aniónicos[30]. El término de “proteína de resistencia a múltiples fármacos” se relaciona con la sobreexpresión de MRP1 y la resistencia a fármacos de producto natural, tales como alcaloides de la vinca y antraciclinas. Este mecanismo de eflujo está conjugado con el glutatión reducido (GSH), el cual es necesario para el co-eflujo fármaco-GSH[31].

Los laboratorios de amplios grupos de investigación han contribuido a la caracterización de la subfamilia MRP. Los miembros individuales de esta subfamilia se muestran en la Tabla 1. Los miembros MRP1, MRP2, MRP3 y MRP6 han sido ampliamente caracterizados. Tienen un dominio *N*-terminal extra (TMD<sub>0</sub>) que falta en la región de la glicoproteína-P. MRP4 y MRP5 tienen mayor homología con otros MRP que con la glicoproteína-P u otros miembros de la familia de transportadores ABC (figura 3). MRP4 y MRP5 comparten casi un 40% de homología con MRP1, y los estudios de función realizados, indican que el TMD<sub>0</sub> no es necesario para la

actividad de transporte, y ambos grupos de MRPs comparten la región esencial L<sub>0</sub>[32].

Tabla 1. Miembros de la subfamilia MRP/ABCC y su porcentaje de identidad de secuencia[33].

|      | MRP1<br>1531aa | MRP2<br>1545aa | MRP3<br>1527aa | MRP4<br>1325aa | MRP5<br>1437aa | MRP6<br>1503aa | MRP7 |
|------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|------|
| MRP1 | 100            |                |                |                |                |                |      |
| MRP2 | 49             | 100            |                |                |                |                |      |
| MRP3 | 58             | 48             | 100            |                |                |                |      |
| MRP4 | 39             | 37             | 36             | 100            |                |                |      |
| MRP5 | 34             | 35             | 33             | 36             | 100            |                |      |
| MRP6 | 45             | 38             | 43             | 34             | 31             | 100            |      |
| MRP7 | 35             | 32             | 34             | 38             | 31             | 37             | 100  |

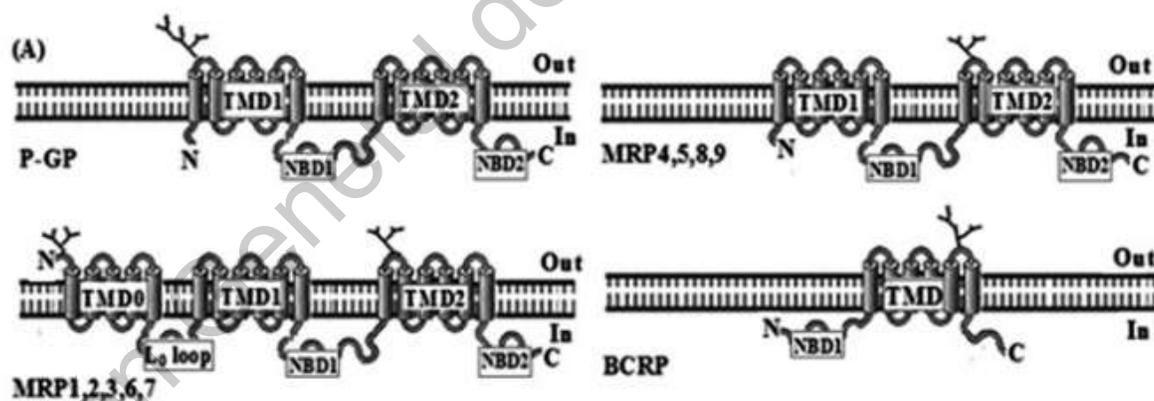


Figura 3. Modelos de topología de la membrana en dos dimensiones, para glicoproteína-P y MRPs[33].

El microambiente tumoral favorece la sobreexpresión de MRPs. El estudio realizado por Bakker y colaboradores, en 2015, indica que en líneas celulares de LLA, los MRP4 y MRP5 se encuentran sobreexpresados, por lo que se les presta atención especial como un blanco terapéutico [18].

### 2.5.2 Transportador MRP4 en LLA

El transportador MRP4 exporta aniones orgánicos, incluyendo sustancias endógenas y exógenas, y está involucrado en la resistencia a fármacos. La correlación entre MRP4 y la resistencia a fármacos fue observada por primera vez en 1999 en líneas celulares linfoides T, en donde se relacionó la sobreexpresión de este transportador con la ineficacia del tratamiento antiviral y un aumento del eflujo de nucleósidos antivirales [34]. El gen que codifica para MRP4, el miembro más corto de la familia de los transportadores ABC, se encuentra localizado en el cromosoma 13q32.1 y se expresa en la mayoría de los tejidos del cuerpo humano, incluido el cerebro, riñones, hígado, eritrocitos, plaquetas, páncreas, glándula adrenal, linfocitos, etc. MRP4 está estructuralmente relacionado con los demás miembros en el dominio intracelular, que exhibe la actividad ATPasa. Su topología es TMD-NBD-TMD-NBD, y cada TMD tiene seis hélices transmembranales [22]. Tiene dos dominios transmembranales y dos dominios de unión a nucleótido, así como dos dominios citosólicos de unión a ATP en los cuáles éste se hidroliza y provee la fuerza de transporte de sustratos [35].

Las moléculas endógenas transportadas, al menos *in vitro* por MRP4 son nucleótidos cíclicos, eicosanoides, ADP, uratos y hormonas esteroideas conjugadas; las cuales juegan un rol clave en la señalización y comunicación celular[36]. Los folatos, ácidos biliares y glutatión son sustratos fisiológicos importantes de MRP4. MRP4 destaca por su amplia especificidad de sustratos, entre los que incluye antivirales (adefovir, tenofovir, ganciclovir), antibióticos (cefalosporinas), cardiovasculares (diuréticos, tiazidas, antagonistas del receptor a angiotensina II) y citotóxicos (metotrexato, 6-tioguanina, 6-mercaptopurina, topotecan) [35]. Es importante señalar la relevancia del transporte de 6-mercaptopurina y 6-tioguanina, ya que son unos de los fármacos más importantes en el tratamiento de la LLA[37]. La resistencia clínica a 6-MP se ha observado frecuentemente y, si bien los mecanismos subyacentes no están bien

comprendidos, éstos se han relacionado con la sobreexpresión de transportadores ABC, especialmente a MRP4[38].

El AMP cíclico (AMPc) es una molécula relevante en las vías de señalización implicadas en proliferación, diferenciación, apoptosis y en el desarrollo hematopoyético[39]. Las CCLL están reguladas por los niveles de AMPc, los cuales potencian la proliferación, diferenciación y citotoxicidad, y dado que MRP4 es el principal transportador y regulador de los niveles intracelulares de AMPc en varios tipos de leucemia, como la LLA, se ha propuesto como un nuevo y potencial blanco terapéutico [40]. Por otro lado, se sugiere que el AMPc juega un rol importante en el crecimiento tumoral cuando se encuentra en bajas concentraciones intracelulares. Sin embargo, cuando las concentraciones intracelulares de AMPc aumentan, ejerce un efecto apoptótico; que se ha sugerido como el mecanismo quimioterapéutico más viable [41].

#### **2.5.2.1 Vía de señalización apoptótica de AMPc en leucemia**

El AMPc es un importante segundo mensajero, que posee la habilidad de transferir información en las células, y existe ubicuamente en tejidos y células de mamíferos. La vía de señalización de AMPc está involucrada en muchas vías metabólicas, regula procesos fisiológicos; como proliferación, muerte celular, memoria y aprendizaje. La señalización mediada por AMPc puede ejercer efectos opuestos en cuanto a supervivencia, de acuerdo a los subtipos de células mieloides o linfoides, pudiendo tener un efecto pro-apoptótico o anti-apoptótico dependiendo de diferentes factores como: la naturaleza del estímulo, la predominancia de los efectores de AMPc en la célula, la localización particular en la que se produce la señalización de AMPc y la fuerza de la señalización[42]. La regulación aberrante de la señalización de AMPc se ha observado en células cancerosas humanas. El incremento de los niveles de AMPc induce arresto en el ciclo celular y apoptosis en linfocitos cancerosos sensibles a este incremento. Por lo tanto, esta vía puede ser manipulada y convertirse en una nueva estrategia terapéutica[41].

Las células linfoides pueden regular la síntesis (en procesos como la diferenciación celular) y catabolismo de AMPc (en procesos como la proliferación celular) a partir de la estimulación e inhibición de adenilato ciclasa y fosfodiesterasa (AC y PDE, por sus siglas en inglés, respectivamente). Los tres diferentes efectores proteínicos de AMPc son la proteína cinasa A (PKA), factor de intercambio de nucleótidos de guanina (EPAC, por sus siglas en inglés) y canales dependientes de nucleótidos cíclicos [43]. La PKA es una serina/treonina cinasa que cataliza la fosforilación de proteínas funcionales y proteínas reguladoras para controlar el metabolismo celular. La vía AMPc-PKA regula la transcripción de genes diana como P21, P29, ciclina D3 y otros reguladores del ciclo celular[44]. La familia de las PDEs puede hidrolizar AMPc, controlando así, los niveles intracelulares de éste, así como su cinética y localización y, de esta manera, las PDEs modulan todas las vías de señalización de AMPc y consecuentemente sus efectos fisiológicos[45].

La apoptosis es un importante mecanismo para la quimioterapia. La apoptosis puede inducirse mediante agentes físicos, químicos o biológicos. Los fármacos que puedan favorecer el incremento de los niveles de AMPc inducen arresto en el ciclo celular en G1 y apoptosis. La apoptosis mediada por la vía AMPc-PKA induce una alteración de la expresión de muchos genes, alteración del potencial transmembranal de la mitocondria; favoreciendo la liberación de citocromo C y activación de la caspasa 3 efectora[46].

La figura 4 muestra los mecanismos mediante los cuales AMPc regula la muerte celular. El AMPc es producido por ambas, AC soluble (ACs) y AC anclada a la membrana. Por otro lado, el bloqueo del eflujo de AMPc incrementa significativamente la señalización que modula eventos pro-apoptóticos tales como: la fosforilación de CREB/ATF-1, despolarización de la membrana mitocondrial y activación de caspasas. La elevación de los niveles intracelulares de AMPc, en CLL mieloides, ejerce un efecto pro-apoptótico mediante las proteínas Bim/BCL2L11, las cuales se expresan en respuesta a la vía de CRE/CREB en una

manera dependiente de AMPc. La Figura 4 muestra la relocalización de la ACs hacia la mitocondria, dando lugar a la activación de PKA mediante AMPc, la cual fosforila a la proteína pro-apoptótica Bax, que activa la vía apoptótica mitocondrial [41].

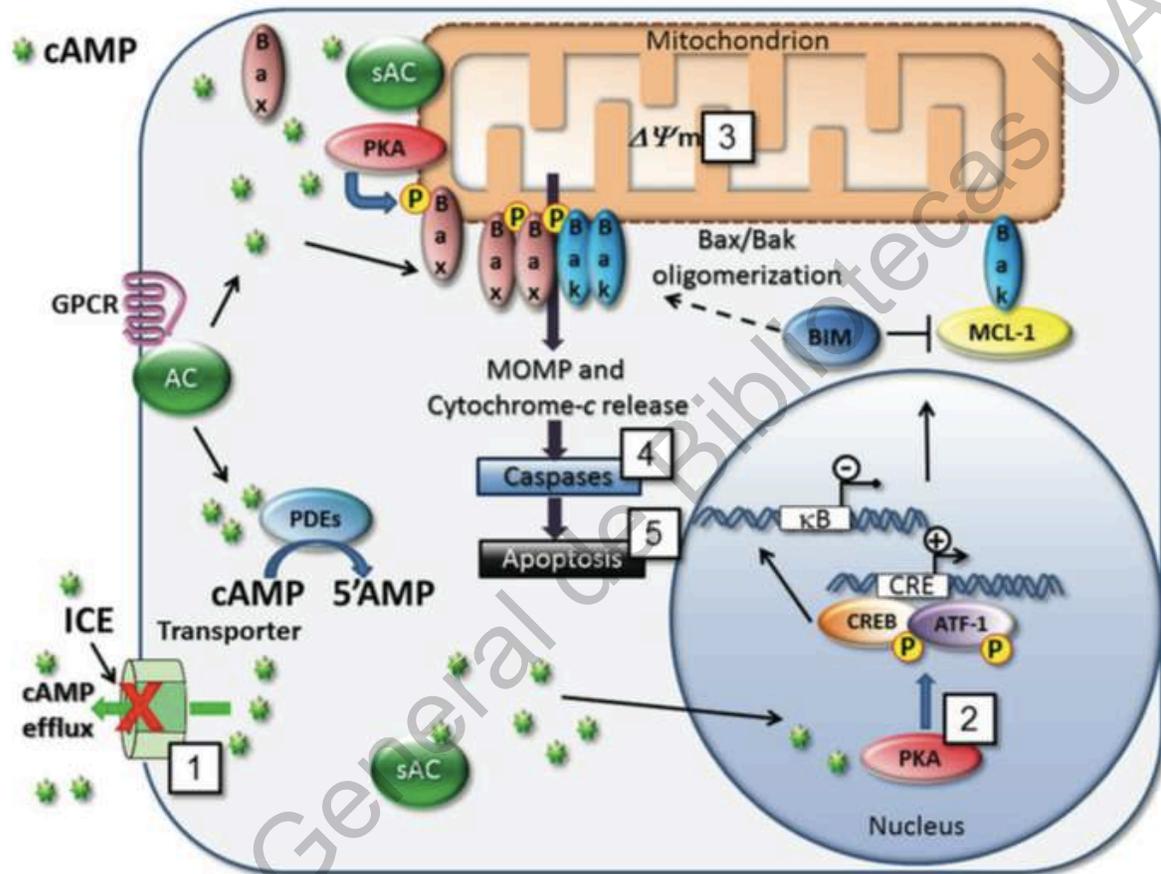


Figura 4. Vía de señalización apoptótica mediada por AMPc. 1) inhibición de los transportadores de eflujo. 2) Activación del factor de transcripción CREB mediante PKA. 3) Modificación del potencial de membrana mitocondrial. 4) Activación de caspasas. 5) Apoptosis. [41].

La elevación de los niveles de glucocorticoides (GC) puede inducir apoptosis en algunos tipos de leucemias linfoides, y la vía de señalización de AMPc puede aumentar, específicamente, la apoptosis inducida por GC. En linfocitos B, los inhibidores de la PDE4 incrementan los niveles intracelulares de AMPc, dando lugar

a un incremento de expresión de los receptores de GC, lo cual no se observa en células hematopoyéticas normales. El efecto apoptótico sinérgico de GC y la señalización de AMPc puede ser el resultado de una elevada estabilidad del RNA mensajero del receptor de GC o una potenciación de la transcripción[47]. Los subtipos de células linfoides que son sensibles a la apoptosis inducida por AMPc tienden a ser sensibles a la apoptosis inducida por GC. Las células CEM, de LLA, sufren apoptosis al ser tratadas con análogos de AMPc, siempre y cuando tengan un receptor de GC funcional, mientras que las células ICR 27 con un receptor de GC deficiente son insensibles al incremento de AMPc. El fenómeno de apoptosis inducida por GC aumentada es importante, porque el tratamiento con GC es clave en LLA[48].

El mecanismo por el cual los inhibidores de PDEs y AMPc aumentan la apoptosis mediada por GC no es del todo clara, sin embargo, puede deberse a un efecto sinérgico de los GC en la expresión y regulación de las PDEs; disminuyendo actividad o niveles de PDEs para incrementar niveles de AMPc[49]. El enfoque consistente en la elevación de los niveles intracelulares de AMPc, es una novedosa estrategia terapéutica para LLA. En dicho enfoque se considera la síntesis, degradación y señalización de AMPc. Los análogos del AMPc y moléculas con efecto sobre la elevación de los niveles de éste, han sido evaluados para el tratamiento de leucemias, sin embargo, se ha observado una modesta eficacia y una elevada toxicidad en tejidos no cancerosos; por esta razón, se busca inhibir el eflujo de AMPc mediante la inhibición de MRP4, su principal transportador. Así, el tratamiento sería más específico, ya que el mecanismo de eflujo de AMPc no es propio de células normales normales con una baja expresión del MRP4 mientras que en CCLL hay una sobreexpresión de esta proteína [41].

### 2.5.3 Estructura MRP4 y sus interacciones intermoleculares con inhibidores

La resistencia a múltiples fármacos es un reto en el tratamiento del cáncer. Las células expuestas a quimioterapéuticos y antibióticos desarrollan resistencia por diversos mecanismos, incluyendo la excreción de los fármacos mediante transportadores de eflujo. MRP4 está involucrado en la resistencia a fármacos en leucemia[50]. Sin embargo, el conocimiento acerca de las interacciones farmacológicas, biológicas y estructurales de este transportador es limitado, ya que no existe aún una estructura cristalográfica. Debido a esto, se han desarrollado modelos moleculares de MRP4 por homología. El modelo molecular de MRP4 fue construido a partir de la estructura cristalográfica del transportador ABC Sav1866 de la bacteria *Staphylococcus aureus*. Dicho transportador tiene un 24 % de homología con MRP4. En la figura 5 se muestra el modelo molecular de MRP4, así como la identificación, en color verde, de los residuos de aminoácidos que pueden interactuar con los sustratos en la vía de translocación. La información acerca de las propiedades de la vía de translocación de sustratos de MRP4 puede usarse para el diseño de agentes terapéuticos que inhiban dicha actividad [22].

MRP4 tiene dos dominios transmembranales y dos dominios de unión a nucleótido y cada dominio transmembranal tiene seis hélices transmembranales (TMHs). La vía de translocación de sustratos se formó como una cavidad central perpendicular a la membrana celular entre los TMD1 y TMD2, y las TMHs 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 11 y 12 contribuyen al revestimiento de dicha cavidad. El TMH5 y TMH2 del TMD1 fueron colocados contra el TMH8 y TMH11 del TMD2, respectivamente. Los TMDs se torcieron en relación con los NBDs, y la cámara de translocación de sustratos se cerró hacia el lado intracelular. Los TMHs divergen en dos partes simétricas, una parte que consiste en los TMHs 1 y 2 del TMD1 y los TMHs 9-12 del TMD2, y una parte que consiste en los TMHs 7 y 8 del TMD2 y los TMHs 3-6 del TMD1. Los detalles estructurales para la proteína diana de un fármaco, como cristalografía de rayos-X, pueden proveer información en estructuras 3D de los complejos proteína-

fármaco y de los criterios energéticos de la unión del fármaco. El modelo molecular presentado previamente puede ser considerado como una herramienta para la generación de hipótesis sobre posibles fármacos moduladores de MRP4. Los estudios de mutagénesis dirigida al sitio en el transportador ABCB1, útiles para la identificación de sitios de unión de los fármacos, el cual tiene homología estructural con MRP4, sugieren que los sitios de unión a fármacos pueden ser en los residuos Leu65 (TMH1), Ile306 (TMH5), Ile340 (TMH6), Phe343 (TMH6), Phe728 (TMH7) y Val982 (TMH12). Los residuos correspondientes en el T-MRP4 son Glu103 (TMH1), Ser328 (TMH5), Gly359 (TMH6), Arg362 (TMH6), Val726 (TMH7) y Leu987 (TMH12), lo anterior fue determinado mediante el software ICMPocketFinder. La estructura de rayos-X de Sav1866 puede servir como un templete para el moldeado molecular de MRP4, pudiendo ser un paso hacia la elucidación de los mecanismos de su interacción con sustratos e inhibidores [22].

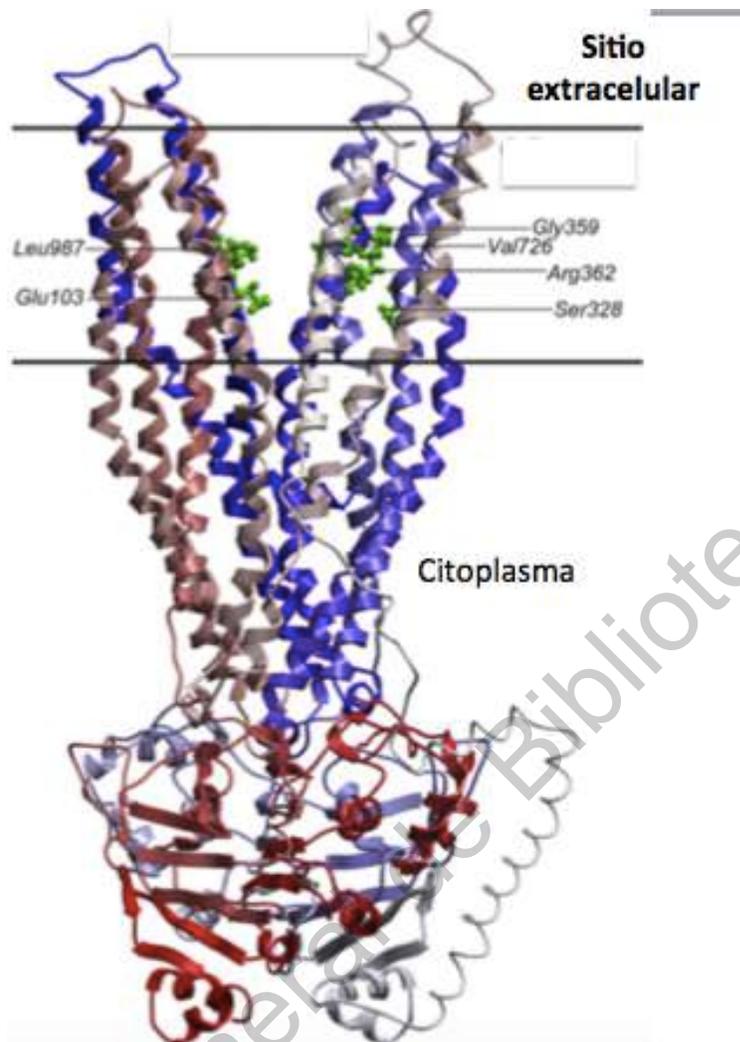


Figura 5. Trazo-Ca de la columna vertebral del MRP4, visto desde el plano de la membrana. Los residuos de aminoácidos en verde indican interacción con los sustratos (Modificado de [22]).

Las estructuras de alta resolución y cristalográficas de MRP4 no están disponibles, por lo tanto, el diseño de inhibidores ha tomado un enfoque basado en ligandos mediante el uso de estudios de relaciones cuantitativas estructura-actividad (QSAR). Estos estudios utilizan la homología estructural entre la familia de transportadores ABC. Las moléculas como análogos de apamil, triazinas, acridonecarboxamidas, fenotiazinas, tioxantenos, flavonas, dihidropiridinas,

propafenonas y derivados de ciclosporinas han sido evaluados en cuanto a su efecto inhibitorio sobre MRP4. Estos estudios indican que los parámetros fisicoquímicos globales (lipofilicidad, refractividad molar), la fuerza de donadores de H y el arreglo de los aceptores de H se correlaciona con la actividad inhibitoria. Los análisis de lipofilicidad han permitido determinar que la interacción del fármaco con el transportador se lleva a cabo dentro de la bicapa lipídica. Así, la lipofilicidad de los compuestos puede favorecer su concentración hacia el sitio de unión más que influenciar la unión con la proteína. La información de los análisis QSAR indica que el patrón general de los inhibidores fuertes es su alta lipofilicidad (y/o refractividad molar) y poseen al menos dos aceptores de puentes de hidrógeno. Las interacciones puentes de hidrógeno y apilamientos  $\pi$ - $\pi$  favorecen el efecto inhibidor de las moléculas. Además, algunas restricciones estéricas parecen aplicarse en la proximidad de las estructuras farmacofóricas. Estos requisitos están apoyados por diversos estudios de moldeado de farmacóforos y dinámica molecular [51].

Los métodos computacionales han permitido proponer un patrón de reconocimiento general para inhibidores del transportador ABCB1, el cual comparte una alta homología con MRP4. Didziapetris y colaboradores propusieron “la regla de los 4”, esta regla indica que los compuestos con un número mayor o igual a 4 átomos de O o N, peso molecular > 400g/mol,  $pK_a < 4$  son moléculas con alta probabilidad de ser inhibidores de este transportador [52]. Se ha propuesto que el bloqueo de los sitios de unión en el NBD puede disminuir la actividad ATPasa y, por ende, inhibir la actividad de transporte de sustratos. Sin embargo, dada la lipofilicidad requerida de las moléculas, éstas interaccionarán únicamente dentro de la capa bilipídica, y los NBDs se encuentran en la parte citosólica[51].

En la figura 6 se muestran moléculas tipo propiofenona con potencial inhibitorio sobre el transportador glicoproteína-P, el cual tiene una alta homología con MRP4.

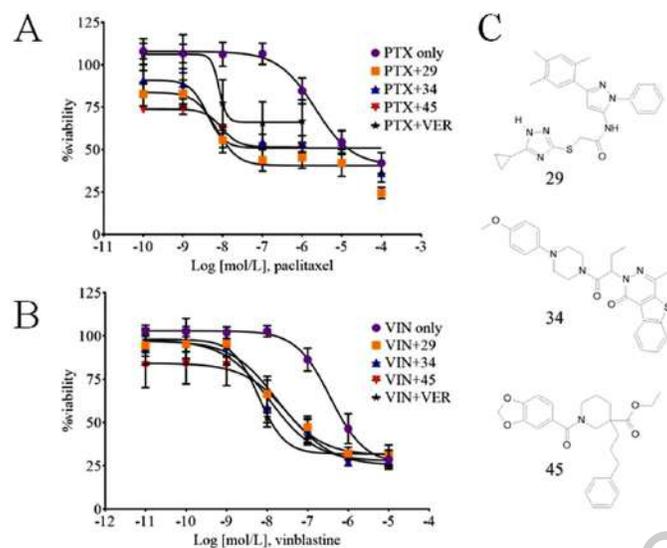


Figura 6. Moléculas 29, 34 y 45 con efecto inhibitorio sobre glicoproteína-P [53]

El estudio realizado por Fukuda y colaboradores en 2013 determinó los farmacóforos de fármacos antivirales con efecto inhibidor de MRP4. Los cinco fármacos que exhibieron actividad inhibitoria tuvieron interacciones en común. Los elementos farmacóforicos identificados fueron cuatro aceptores de H, un donador de H y tres grupos hidrófobos (Figura 7) [54].

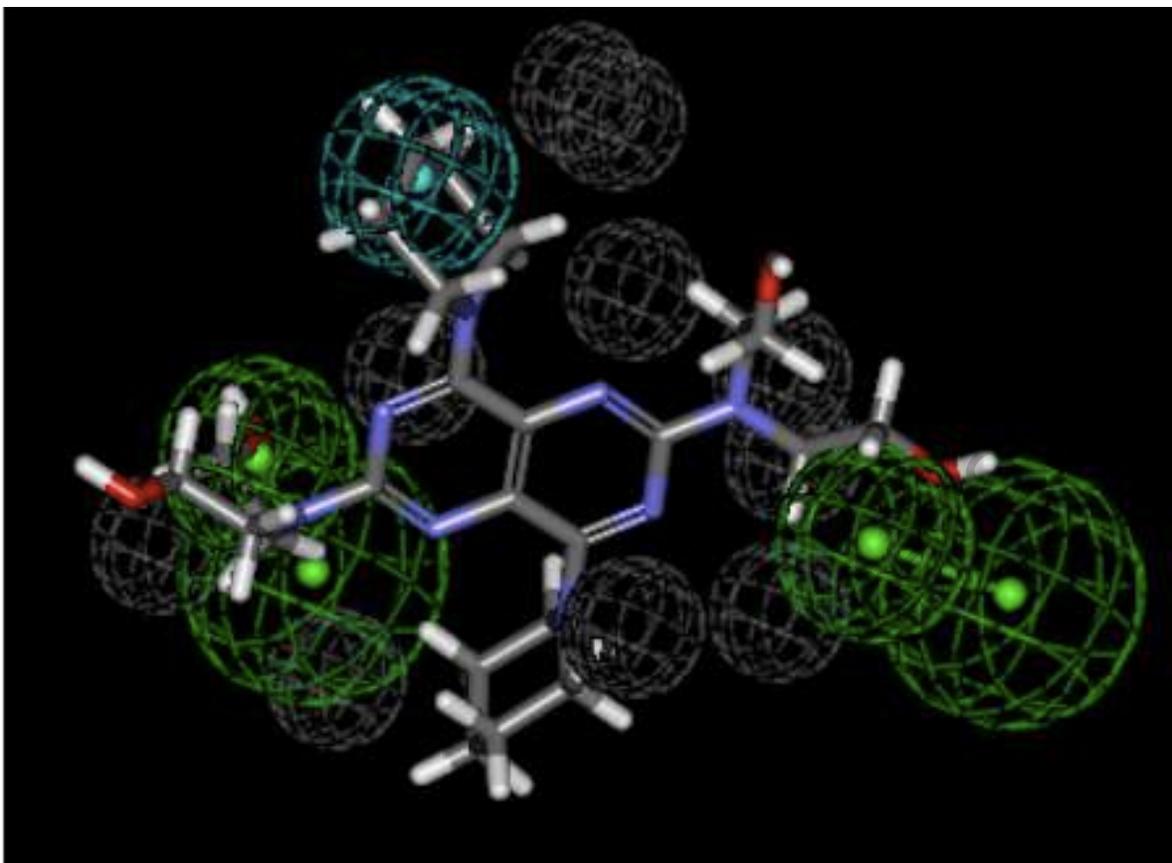


Figura 7. Modelo farmacofórico de inhibidores de MRP4. En verde se muestran los aceptores de H, azul representa interacciones hidrofóbicas, púrpura representa donadores de H, gris representa exclusión por volumen (efecto restrictivo que se tiene que evitar) [54].

## 2.6 Inhibidores de MRP4 y del eflujo de AMP

Las estrategias más novedosas de tratamiento para la LLA están enfocadas en la especificidad y la efectividad. Un tratamiento ideal sería aquel que ofrezca un efecto apoptótico y mejore la actividad de otros quimioterapéuticos. MRP4 favorece la quimiorresistencia a tiopurinas y la inhibición de la actividad de éste tiene un efecto pro-apoptótico, lo que ha dado lugar al diseño y reposicionamiento de fármacos con potencial inhibidor de MRP4. La identificación de inhibidores de MRP4 se evalúa mediante inhibición del eflujo de AMPc [41], midiendo la eficacia de cada fármaco

para bloquear el flujo de F-AMPc (AMPc conjugado a Alexa Fluor). Este ensayo consiste en evaluar la fluorescencia, ya que si la fluorescencia disminuye se determina la ineficacia del fármaco, mientras que el mantenimiento de la fluorescencia indica que el F-AMPc se está quedando en la célula, por efecto de la inhibición de MRP4.

El gráfico de la figura 8 muestra el efecto del MK-571 sobre la inhibición del flujo del AMPc, la cual es dependiente de la concentración. En este experimento, realizado por Pérez y colaboradores en 2016[41], se determinó la  $IC_{50}$  del MK-571 y de otros fármacos, mostrados en la tabla 2. Además de evaluar la inhibición del flujo de AMPc, se evaluó por la fosforilación del factor de transcripción CREB/ATF-1, como indicativo de la acumulación de AMPc y la activación de PKA-1.

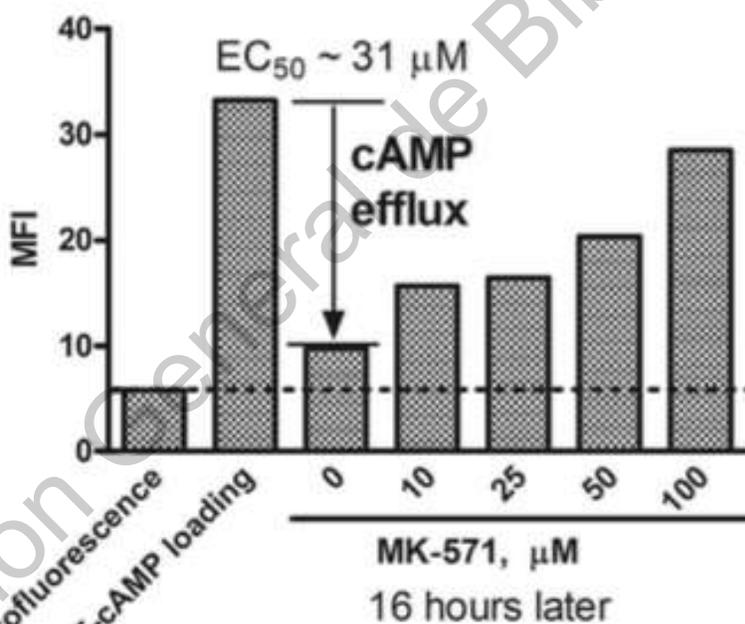


Figura 8. Efecto del inhibidor específico de MRPs sobre el flujo de F-AMPc [41].

Tabla 2. Fármacos con actividad inhibitoria sobre MRP4 [41].

| Fármaco           | Descripción   |
|-------------------|---|
| Artesunato        | Aprobado por la FDA en 2007 para el tratamiento de malaria severa en Estados Unidos de América                              |
| Dihidroartemisina | Es hidrolizado a su metabolito activo, usado para el tratamiento de la malaria en Asia                                      |
| Clioquinol        | Fármaco aprobado por la FDA como antifúngico y antiprotozoario.   |
| Criptotansinona   | Ha mostrado efecto sobre la inhibición de la proliferación celular  |
| Partenólido       | Es una lactona sesquiterpénica, con efecto anticancerígeno selectivo sobre leucemia mieloblástica aguda                     |
| Patulin           | Es una micotoxina producida por <i>Penicillium</i> y <i>Aspergillus</i> . Induce apoptosis vía mitocondrial en CCLL humanas |

El efecto de las moléculas inhibitoras de MRP4 es favorecer la apoptosis, tal y como se muestra en la figura 4. Por lo tanto, la apoptosis dependerá de la inhibición de MRP4 y la consecuente acumulación intracelular de AMPc. En la figura 9 se muestra el efecto de los fármacos mostrados en la tabla 2, sobre la viabilidad de varias líneas de LLA-B y leucemia mieloide. Todos los fármacos con actividad inhibitoria del eflujo de AMPc disminuyeron la viabilidad celular, y como se demostró en el mismo experimento, indujeron apoptosis intrínseca. Sin embargo, se requiere de una mayor variabilidad de estructuras moleculares con actividad inhibitoria sobre MRP4, para favorecer el desarrollo de una mayor cantidad de fármacos más potentes y selectivos, idealmente, como lo proponemos en el presente trabajo.

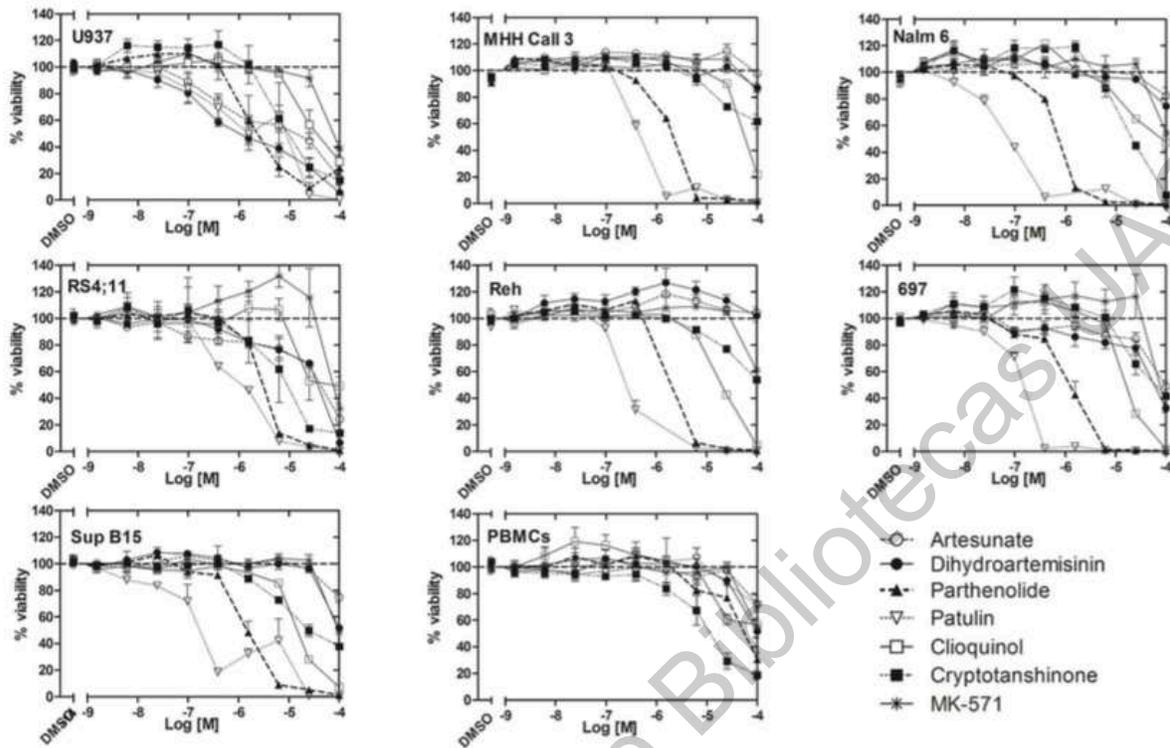


Figura 9. Efecto de diferentes fármacos inhibidores del eflujo de AMPc sobre la viabilidad en líneas celulares de leucemia mieloide (U937) y de LLA-B (MHH Call 3, Nalm 6, RS4;11, Reh, 697, Sup B15) y normales PBMCs [41].

Las quimiotecas combinadas de fármacos han sido utilizadas para identificar inhibidores de MRP4, para su posible reposicionamiento. Para realizar un rastreo de alta eficacia de estas librerías se utiliza el método de la bioluminiscencia, ya que MRP4 es capaz de transportar al exterior de la célula a la D-luciferina. Cheung y colaboradores, en 2014, evaluaron la actividad inhibidora de MRP4 de 3600 fármacos, y los 5 fármacos con la mayor eficacia fueron: tirfostina, glafnina, prazosina, dantroleno y ácido nalidíxico (Figura 10). Estos fármacos favorecieron la sensibilización de las células HEK293 hacia la tiopurina 6-MP. Siendo éste un hallazgo importante en el que los inhibidores de MRP4 pueden favorecer la eficacia de las tiopurinas [50].

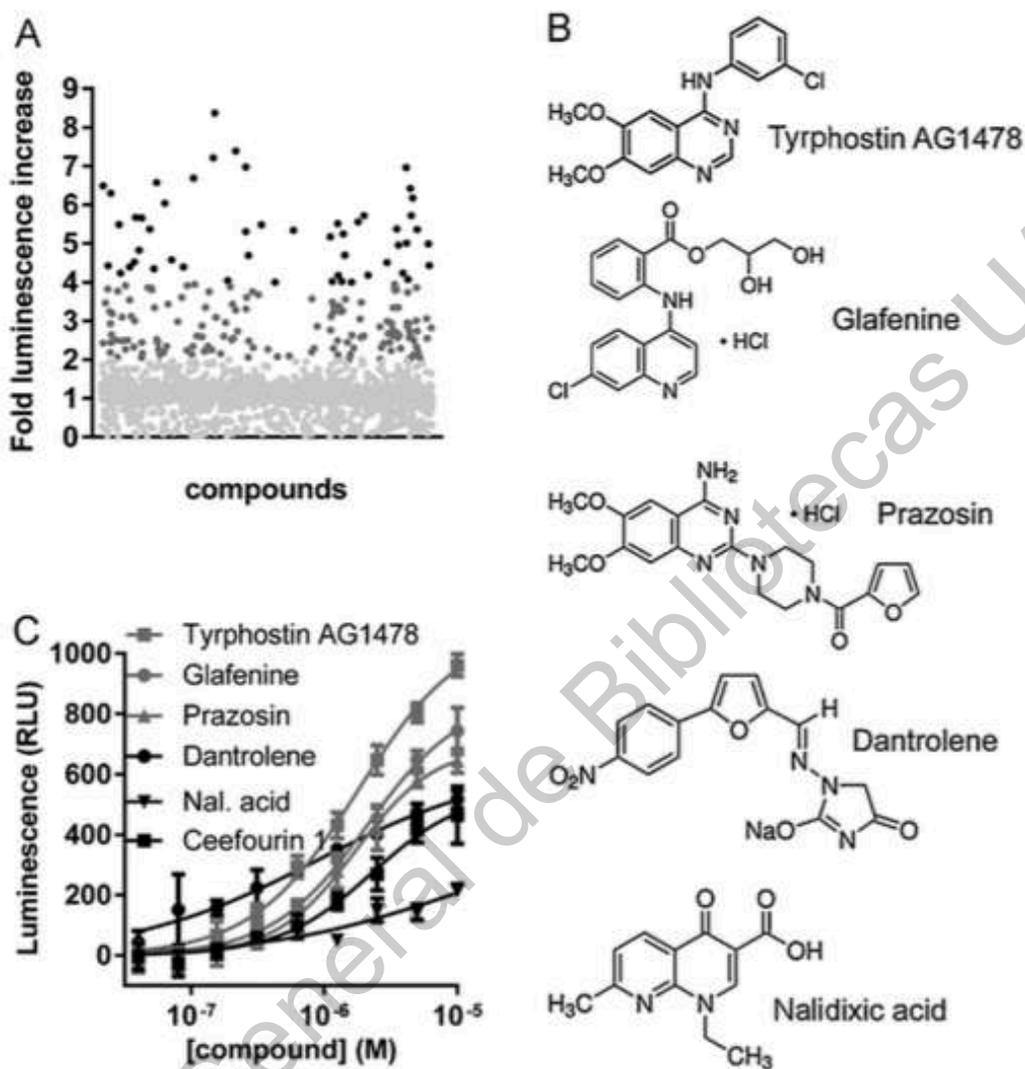
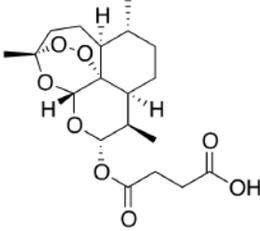
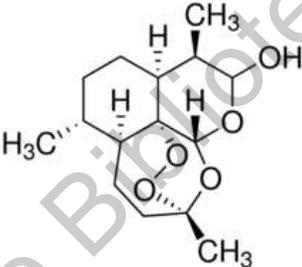
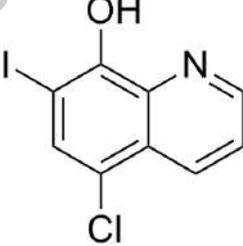
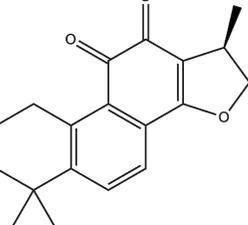
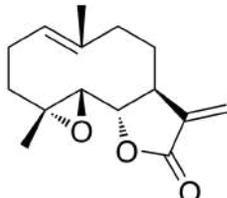


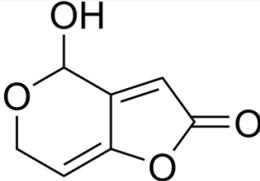
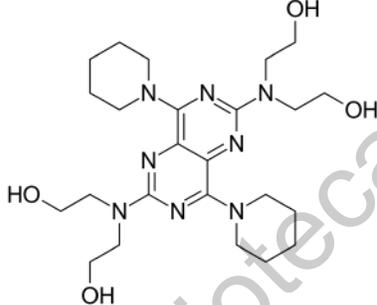
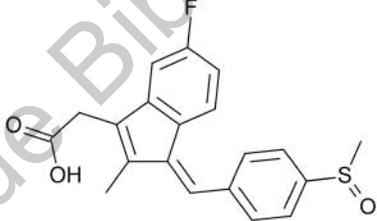
Figura 10. Efecto de tirstostina, glafenina, prazosina, dantroleno y ácido nalidíxico sobre la inhibición de MRP4. Se evaluó el efecto sobre el mantenimiento de la fluorescencia, indicativo de la acumulación de D-luciferina por inhibición de MRP4 [50].

Para el diseño por fragmentos de nuevas moléculas con potencial inhibitorio de MRP4 es importante conocer las estructuras de los fármacos ya identificados y basarse en las interacciones intermoleculares fármaco-MRP4. A continuación,

se presentan las estructuras de algunos fármacos inhibidores de MRP4, además de los presentados en las figuras 6 y 10.

Tabla 3. Fármacos inhibidores de MRP4

|                   |  |
|-------------------|--|
| Artesunato        |  <p>The chemical structure of Artesunate is a complex polycyclic molecule. It features a central bicyclic core with multiple stereocenters indicated by wedged and dashed bonds. A side chain is attached to the core, ending in a carboxylic acid group (-COOH).</p>                      |
| Dihidroartemisina |  <p>The chemical structure of Dihydroartemisinin is a complex polycyclic molecule. It features a central bicyclic core with multiple stereocenters indicated by wedged and dashed bonds. It has several methyl groups (CH<sub>3</sub>) and a hydroxyl group (OH) attached to the core.</p> |
| Clioquinol        |  <p>The chemical structure of Clioquinol is a quinoline derivative. It consists of a benzene ring fused to a pyridine ring. The benzene ring has a hydroxyl group (OH) at the 8-position, an iodine atom (I) at the 6-position, and a chlorine atom (Cl) at the 7-position.</p>          |
| Criptotansinona   |  <p>The chemical structure of Cryptotanshinone is a complex polycyclic molecule. It features a central bicyclic core with multiple stereocenters indicated by wedged and dashed bonds. It has a carbonyl group (C=O) and a hydroxyl group (OH) attached to the core.</p>                 |
| Partenólido       |  <p>The chemical structure of Partenolide is a complex polycyclic molecule. It features a central bicyclic core with multiple stereocenters indicated by wedged and dashed bonds. It has a carbonyl group (C=O) and a hydroxyl group (OH) attached to the core.</p>                      |

|            |   |
|------------|---|
| Patulin    |   |
| Dipramidol |   |
| Sulindac   |  |

Los fármacos inhibidores de MRP4 son usados en otro tipo de patologías, y fueron probados debido a su estructura. Sin embargo, no existen fármacos, aprobados por la FDA, diseñados específicamente para inhibir a MRP4. Debido a que se ha determinado que MRP4 juega un rol importante en la quimiorresistencia y que la inhibición de su actividad induce apoptosis en células leucémicas, es importante el desarrollo de nuevas moléculas con efecto inhibitorio. El diseño racional de moléculas inhibitorias de MRP4, mediante técnicas computacionales, podría tener una mayor eficacia y ser más específico.

La estructura cristalográfica de MRP4 no ha sido elucidada, por lo tanto, se recurre a la construcción de un modelo de enhebrado de proteínas basado en la homología

de plantilla y la construcción de *loops* mediante servidores como I-TASSER que se basa en la identificación de plantillas estructurales del *Protein Data Bank* (PDB) utilizando un servidor de metahilos local, un método para la predicción de la estructura de proteínas. Los modelos tridimensionales se generan para una secuencia determinada mediante la recopilación de plantillas estructurales de alta puntuación de los programas de subprocesamiento instalados localmente[55]. La obtención del modelo por homología no es suficiente, pero se puede refinar mediante cálculos de mecánica molecular, como minimización de energía y simulaciones de dinámica molecular. Los modelos construidos por homología se consideran herramientas de trabajo que pueden utilizarse para generar hipótesis relacionadas con la estructura de las proteínas, la función de las proteínas y las interacciones proteína-ligando. Posteriormente, el acoplamiento molecular de las moléculas del fármaco en sus sitios de unión, permite identificar los aminoácidos relevantes para las interacciones ligando-proteína con el fin de seleccionar dichos aminoácidos para estudios adicionales de mutagénesis dirigida al sitio. En el presente estudio se hizo uso de las herramientas *in silico* de modelado por homología, dinámica molecular y *docking* molecular para la construcción del modelo 3D de MRP4 y el posterior diseño de moléculas inhibidoras de MRP4.

### 3. Hipótesis

La molécula, EBD9 diseñada y sintetizada en este trabajo, ejerce un efecto inhibitorio sobre MRP4, favoreciendo el incremento de los niveles intracelulares de AMPc, lo cual favorecerá la inducción selectiva de apoptosis en un modelo *in vitro* de LLA.

### 4. Objetivos

#### 4.1 General

- Diseñar 3 moléculas con potencial inhibitorio sobre MRP4 y sintetizar la molécula con mayor afinidad para evaluar su efecto apoptótico selectivo en un modelo *in vitro* de de LLA y linfoblastos normales CRL-1991.

#### 4.2 Específicos

- Construir el modelo por homología de MRP4 en el servidor I-TASSER, a partir de la secuencia primaria obtenida en la base de datos Uniprot, con código O-15439-1 y determinar las conformaciones más representativas de MRP4 mediante dinámica molecular, con el programa GROMACS.
- Determinar y analizar las interacciones intermoleculares entre el MRP4 y a) fármacos sustrato, b) inhibidores y c) sustratos endógenos, mediante acoplamiento molecular (docking) con el programa Autodock 4 y realizar un diseño basado en fragmentos de moléculas con potencial inhibitorio sobre el MRP4.

- Sintetizar la molécula con mayor afinidad a MRP4, y caracterizarla por RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  y espectrometría de masas.
- Estandarizar el cultivo de las líneas celulares Jurkat y CRL-1991, para evaluar el efecto de la molécula sintetizada sobre la inhibición del eflujo de AMPc en la línea celular Jurkat, mediante inmunoensayo competitivo.
- Evaluar el efecto apoptótico de la molécula sintetizada en las líneas celulares CRL-1991 (linfoblastos B y T normales) y Jurkat *in vitro*, mediante citometría de flujo.

## 5. Materiales y métodos

### 5.1 Líneas celulares

Las líneas celulares CRL-1991 y Jurkat clona E6-1 número TIB-152 se obtuvieron de la compañía ATCC. Las líneas celulares fueron cultivadas en medio RPMI-1640 con 10% de suero fetal bovino. Se mantuvieron a 37°C y con 5% CO<sub>2</sub>. Se realizaron lavados cada tercer día y se hicieron dos pases semanales. Las células se mantuvieron a una densidad máxima de 1 x 10<sup>6</sup> células/mL.

### 5.2 Construcción del modelo por homología de MRP4

La estructura tridimensional de MRP4 3D construyó en el servidor web I-TASSER [55] utilizando la estructura primaria MRP4 de la base de datos UniProt [56] (código UniProt O15439), donde I-TASSER identifica primero las plantillas estructurales de la base de datos del Protein Data Bank (PDB) mediante un enfoque de subprocesos múltiples en el algoritmo LOMETS, con

modelos atómicos completos construidos mediante simulaciones iterativas de ensamblaje de fragmentos de plantilla. Los modelos MRP4 se calcularon utilizando un regulador de conductancia transmembrana de fibrosis quística (CFTR) de pez cebra (código Uniprot Q1LX78), CFTR humano (código Uniprot Q20BH0), la estructura Cryo-EM del canal de K<sup>+</sup> pancreático sensible a ATP SUR1 / Kir6.2 en presencia de ATP y glibenclamida de *Rattus norvegicus* (código Uniprot P70673), entre otras siete plantillas. Una vez construido, el diagrama de Ramachandran se utilizó para evaluar la calidad del modelo MRP4 en el servidor web Procheck, examinando las regiones permitidas y no permitidas del diagrama [57]. El complejo proteína-membrana se realizó utilizando el servidor web Charmm-Gui (Universidad de Lehigh, Pensilvania) [58], y la membrana se construyó con POPC. Para determinar la conformación MRP4 más frecuente y realizar la minimización de energía, se realizaron simulaciones de movimiento molecular utilizando dinámica molecular (DM) mediante el software GROMACS 2018.7 (Universidad de Groningen, Real Instituto de Tecnología de la Universidad de Uppsala, Suecia, 2001-2016)[59]. La DM se corrió a presión, temperatura y partículas constantes (conjunto NPT, 310.15K y 1 atm); hasta 20 ns de tiempo de simulación; utilizando el campo de fuerza charmm36. [60] Los ligandos para los estudios de acoplamiento se dividieron en tres grupos diferentes: sustratos endógenos, sustratos de fármacos e inhibidores. Todos los ligandos se prepararon mediante la adición de cargas de Gasteiger, la asignación de tipos de átomos y la definición de enlaces rotativos utilizando el software Chimera (Universidad de California, San Francisco) [61].

### 5.3 Acoplamiento molecular

Para determinar el tipo de interacciones entre el transportador y determinada molécula, se realizó un acoplamiento molecular. De esta manera se tienen más herramientas para diseñar una molécula *de novo*. Se utilizó el programa

Autodock 4.2.6 (The Scripps Research Institute, San Diego, CA, USA)[62]. La estructura de MRP4 resultante se utilizó como entrada para el Autogrid 4.2.6, que realiza un mapa de cuadrícula de afinidad atómica precalculado para cada tipo de átomo en el ligando más un mapa electrostático y un mapa de desolvatación separado presente en la molécula de sustrato. Los mapas se calcularon con un espaciado de 0.375 Å entre los puntos de la cuadrícula. [22]. Las dimensiones de la caja del sitio activo se establecieron en 40 × 60 × 80 puntos, con base en aminoácidos reportados como sitios de unión de sustratos[63]. Se realizó un acoplamiento rígido-flexible para los compuestos y cada sistema acoplado se realizó usando Autodock 4.2.6, con 25 corridas usando el algoritmo genético Lamarckiano con 5 millones de evaluaciones de energía máxima por corrida. Se utilizaron tres grupos de moléculas: a) inhibidores del transportador MRP4, b) fármacos sustrato y c) sustratos endógenos.

Tabla 4. Grupos de moléculas evaluadas mediante docking molecular

| Sustratos endógenos   | Fármacos sustrato | Inhibidores  |
|-----------------------|-------------------|--------------|
| AMPC                  | 6-MP              | ABSF         |
| Ácido cólico          | Adefovir          | Artesunato   |
| Ácido fólico          | Cefazolina        | Cefourina-1  |
| Ácido glicólico       | Cefotaxima        | Dipiridamol  |
| Leucotrieno B4        | Ceftizoxima       | Glafenina    |
| PGE1                  | Furosemida        | Indometacina |
| PGE2                  | Hidroclorotiazida | Losartan     |
| Sulfato de prasterona | Leucovorina       | MK-571       |
| Ácido taurocólico     | Metotrexato       | Partenolide  |
| Ácido úrico           | Olmesartan        | Prazosina    |
|                       | Tenofovir         | Probenecid   |
|                       | Topotecan         | Quercetina   |
|                       |                   | Sildenafil   |

|            |
|------------|
| Sulindaco  |
| Tirfostina |

#### 5.4 Síntesis de EBD9

El procedimiento general para la síntesis de EBD9 se detalla en el apartado 6.5 de resultados, así como en los esquemas 1 a 3 del mismo apartado. El procedimiento consistió en sintetizar los fragmentos 1 y 2 por separado, para posteriormente hacerlos reaccionar en un mismo tubo de reacción en microondas. La síntesis del fragmento 1 partió del ácido 4-amino-3-nitrobenzónico para la posterior formación del tiocianato a partir de la formación de una sal de diazonio; luego, se realizó la formación del cloruro de ácido para formar la amina y finalmente formar el benzotiazol mediante hidrogenación catalítica y ciclación simultánea. La síntesis del fragmento 2 partió del anhídrido 3-nitroftálico para formar un esqueleto de benzotiadiazina mediante la aminólisis del anhídrido, para posteriormente someter el producto a hidrogenación catalítica y formación del anillo de benzotiadiazina y cloruro de ácido de forma simultánea utilizando  $\text{SO}_2\text{Cl}_2$ .

#### 5.5 Medición del eflujo de AMPc

Los niveles de AMPc se determinaron mediante con el kit de inmunoensayo competitivo directo de AMPc (fluorométrico) (Abcam®, número de cat. ab138880) en la línea celular Jurkat. El kit utiliza un anticuerpo policlonal para unirse al AMPc, de manera competitiva, que está presente en la muestra o una molécula de fosfatasa alcalina que tiene AMPc unido covalentemente. Las células ( $5 \times 10^5$ ) se trataron con diferentes concentraciones de DMSO (control -) o vincristina (control +) o cefourina-1 o benzotiazol (fragmento 1) o

benzotiadiazina (fragmento 2) o EBD9 por 12h. Los patrones o las muestras problema, el conjugado de fosfatasa alcalina y el anticuerpo se incubaron simultáneamente a temperatura ambiente en una placa de pocillos múltiples revestida con anticuerpo secundario. A continuación, se eliminó el exceso de reactivos y se añadió sustrato. Después de 5 minutos, se detuvo la reacción enzimática añadiendo la solución de parada (fosfato trisódico en agua) y se leyó el color amarillo de cada muestra en un lector de placas multipocillo (equipo) a 405 nm. La intensidad del color amarillo es inversamente proporcional a la concentración de AMPc en los estándares o en las muestras.

Tabla 5. Diseño experimental para el tratamiento de células Jurkat y CRL-1991 para la evaluación del efecto apoptótico

|                                  | Control | Control + | Grupo 1 | Grupo 2 | Grupo 3 | Grupo 4 |
|----------------------------------|---------|-----------|---------|---------|---------|---------|
|                                  | -       |           |         |         |         |         |
| RPMI                             | √       | ---       | ---     | ---     | ---     | ---     |
| Vincristina 10<br>μM             | ---     | √         | ---     | ---     | ---     | ---     |
| IC <sub>50</sub> mezcla-<br>EBD9 | ---     | ---       | √       | ---     | ---     | ---     |
| IC <sub>50</sub> cefourina-1     | ---     | ---       | ---     | √       | ---     | ---     |
| IC <sub>50</sub> Fragmento<br>1  | ---     | ---       | ---     | ---     | √       | ---     |
| IC <sub>50</sub> Fragmento<br>2  | ---     | ---       | ---     | ---     | ---     | √       |

## 5.6 Evaluación del efecto apoptótico de las moléculas sintetizadas

El ensayo de apoptosis se realizó con el FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD, No. 556547), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, se trataron  $1 \times 10^6$  células (CRL-1991 o Jurkat) con diferentes concentraciones de RPMI (control -) o vincristina (control +) o benzotiazol o benzotiadiazina o EBD9. Después de 24 h de tratamiento, las células se lavaron dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) fría y luego se resuspendieron en tampón de unión 1x a una concentración de  $1 \times 10^6$  células / mL. Se transfirieron 100  $\mu$ L ( $1 \times 10^5$  células) a un tubo de cultivo de 5 mL. A continuación, las células se tiñeron con 5  $\mu$ L de FITC Annexin V y 5  $\mu$ L de yoduro de propidio. La suspensión celular se mezcló suavemente con un vortex y se incubó durante 15 min a temperatura ambiente. Después de la incubación, se agregaron 400  $\mu$ L de  $1 \times$  *binding buffer* a cada tubo y las células se analizaron mediante citometría de flujo en un sistema BD FACSVerse™ (BD Biosciences, MH, México) y el software BD FACSuite™, en 1 h.

## 5.7 Estadística

Los resultados del eflujo de AMPc y apoptosis fueron presentados como la media +/- la desviación estándar de tres repeticiones en tres experimentos independientes. Para determinar si existe diferencia significativa, entre al menos uno de los grupos se utilizó ANOVA de una vía. Para determinar diferencias significativas entre grupos, se utilizó el análisis *post hoc* de Tukey[64].

## 6. Resultados y discusión

### 6.1 Modelado molecular

El mejor modelo generado en I-TASSER fue el modelo número 1 (figura 11) según el C-score (-0.33, con un rango de -5 a 2 donde valores más altos representan mayor confianza) y TM score 0.67 +/- 0.13 (valores mayores de 0.5 se consideran modelos con topología correcta) y RMSD fue 10.4 +/- 4.6. Además, se utilizó el servidor Procheck para obtener el gráfico de Ramachandran, con el fin de validar el modelo 1. El porcentaje de residuos en las regiones más favorecidas en el gráfico de Ramachandran fue del 92,1% (figura 12) lo que se considera una calidad estereoquímica correcta del modelado por homología. Según esta métrica, el modelo de MRP4 de I-TASSER era adecuado, aunque todavía no se realizaba la MD para el proceso de relajación del modelo. Después de la visualización del modelo 3D MRP4 en Pymol, fue fácil apreciar la topología y configuración correctas de los dominios transmembrana y los NBDs: TMD1-NBD1-TMD2-NBD2, así como los seis pasos transmembranales abarcando hélices  $\alpha$  (TMHs) en cada TMD. La presencia de los motivos Walker A, Walker-B, A-loop, H-loop, D-loop, Q-loop también están presentes, lo cual es característico de los NBD debido a su estructura altamente conservada en todos los transportadores ABC. La conformación del modelo MRP4 por I-TASSER está en un estado orientado hacia adentro y es coherente con que la ausencia de ATP mantiene los NBD separados entre sí, lo que lleva a una conformación abierta, pero una vez que ocurre la unión de ATP, los NBD se acercan para formar un emparedado con el ATP y completar la dimerización[33,65]. Se llevó a cabo una relajación adicional del modelo 1 mediante DM.

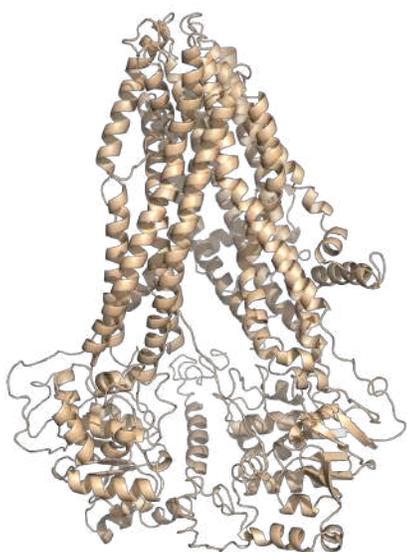


Figura 11. Modelo 1 obtenido en I-TASSER que representa la estructura 3D de MRP4.

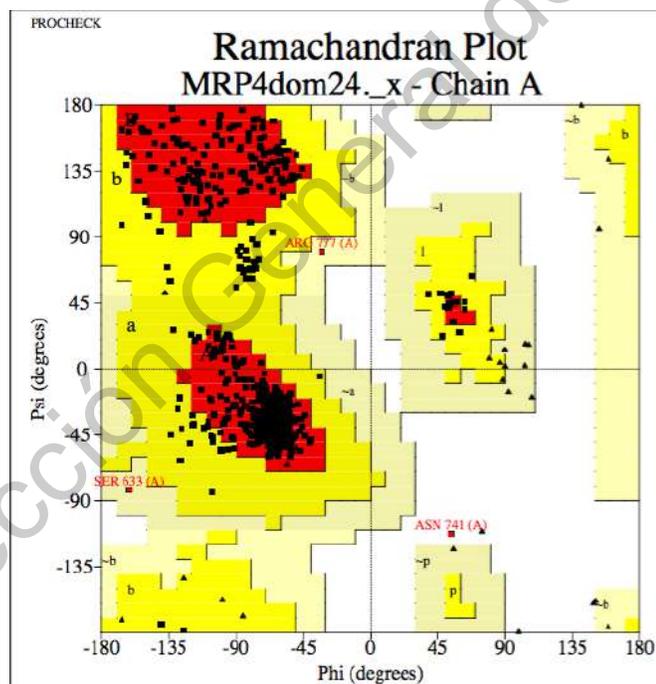


Figura 12. Gráfico de Ramachandran del modelo MRP4 3D ejecutado en el servidor de validación Procheck.

## 6.2 Simulaciones de dinámica molecular (SDM)

El MRP4 modelo 1 se insertó en una membrana DOPC y se realizaron las SDM para obtener una estructura 3D altamente confiable. Los parámetros termodinámicos, como la temperatura, la presión y el volumen, se mantuvieron estables durante la simulación. La Figura 13 muestra los agrupamientos de conformaciones semejantes (clusters) a lo largo de un tiempo de simulación de 19 ns, donde los grupos 1 y 2 fueron los más representativos utilizando un límite de RMSD de 0.2 nm. Después de 3 ns de las SDM, todos los clusters fueron significativamente diferentes entre sí y el RMSD siguió aumentando a través de la simulación (datos no mostrados). El cluster número 2 fue la conformación de MRP4 más representativa y dicho grupo se seleccionó para estudios de acoplamiento molecular. La Figura 14 muestra la conformación MRP4 del cluster 2, donde la proteína está en el estado orientado hacia adentro y es una conformación ideal para realizar estudios de acoplamiento debido a que el estado orientado hacia adentro se considera "orientación hacia adentro de alta afinidad" donde el MRP4 es capaz de la primera interacción con los sustratos[66]. Dado que la unión del sustrato inicia el ciclo de transporte donde MRP4 cambia de alta afinidad (bajo potencial químico del sustrato) a baja afinidad, la siguiente conformación sería una "orientación hacia afuera" pero no se observa debido a que la SDM se realizó sin unión al sustrato y fue de corta duración.

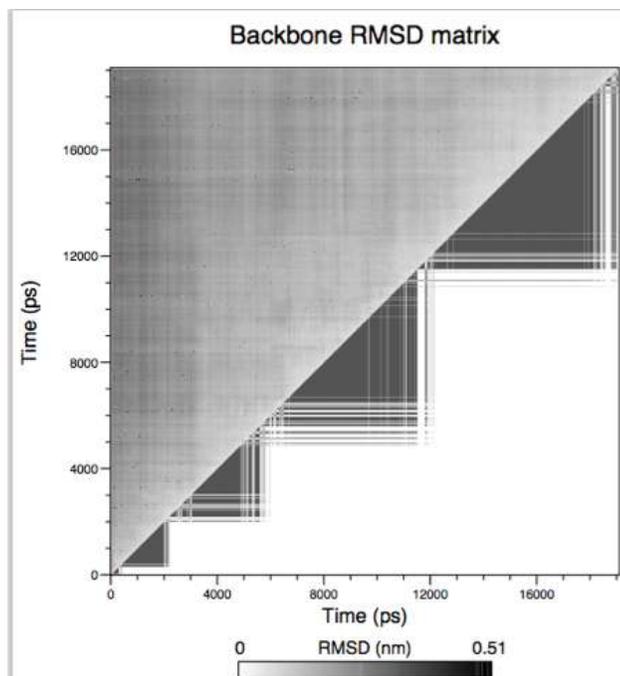


Figura 13. Clusters de dinámica molecular a través de 19 ns de simulación en GROMACS.

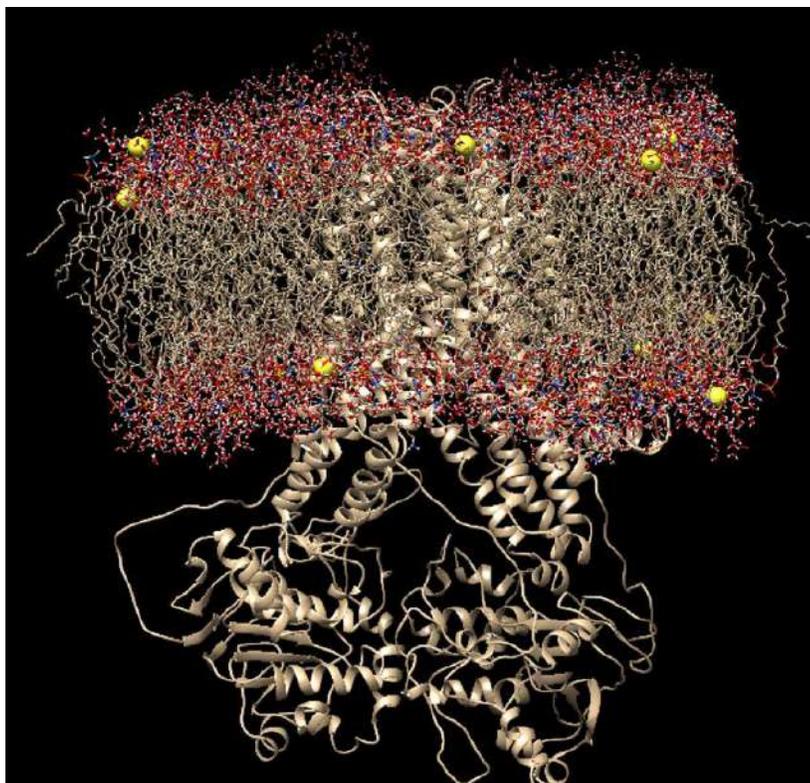


Figura 14. Conformación del cluster 2 del complejo MRP4-membrana a 8,2 ns de la DM.

Las interacciones de MRP4 con diferentes ligandos puede variar si hay alguna o varias mutaciones. Con la perspectiva de estudiar el efecto de las moléculas diseñadas en el presente trabajo, se realizó la construcción de 2 variantes de MRP4 (las más frecuentes) G187W y Y556C. Además, se realizaron estudios de dockig molecular con los mismos grupos de moléculas estudiadas en este trabajo, para determinar el efecto de las mutaciones sobre los patrones de interacción intermolecular. A su vez, los estudios de dinámica molecular *All-atom* permitieron comprender mejor los cambios conformacionales de MRP4 y el efecto de las mutaciones no sinónimas, sobre dichos cambios conformacionales y su interacción con sustratos e inhibidores[67]. Dicho trabajo aportará información valiosa para el futuro diseño de inhibidores de MRP4 basándose en un sitio específico del transportador tomando en cuenta mutaciones no sinónimas.

### 6.3 Acoplamiento molecular

Los sustratos endógenos y los sustratos de fármacos interactúan, principalmente, con residuos no polares y ejercen interacciones de puentes de hidrógeno. Los inhibidores interactúan con residuos no polares, polares y aromáticos. La principal interacción intermolecular ejercida por los inhibidores es el apilamiento  $\pi$ - $\pi$  o el  $\pi$ -catión. Los residuos Phe324, Arg362 y Thr366 interactúan únicamente con inhibidores, y estos residuos podrían ser la referencia para estudios de mutagénesis. Los inhibidores interactúan principalmente por enlaces  $\pi$ - $\pi$ ,  $\pi$ -catión e hidrógeno con residuos con carga positiva como la arginina. La interacción  $\pi$ -catión ocurre entre grupos aromáticos y cargados dentro de 4.5 Å, mientras que  $\pi$ - $\pi$  ocurre entre dos grupos aromáticos apilados cara a cara o cara a borde. Los valores de acoplamiento (*docking scores*, DS) para la unión entre MRP4-quercetina y MRP4-cefourina-1 fueron -5.73 y -7.16 kcal/mol, respectivamente. Por otro lado, el DS para EBD9 fue -11.93 kcal/mol, que es significativamente mejor que la cefourina-1 y la quercetina, sugiriendo que EBD9 es aproximadamente 50 y 60 veces más afin a MRP4 que cefourina-1 y quercetina, respectivamente. La tabla 6 muestra los diagramas de interacción, así como el DS de las moléculas de cefourina-1 y quercetina que fueron usadas como base de partida para el diseño de EBD9, de la cual también se incluyen los diagramas de interacción y el DS. La Tabla 7 muestra los principales residuos de MRP4 con los que interactúan las moléculas de cada grupo, y lo más sobresaliente fue que los residuos Phe324, Arg362 y Thr366 interactúan únicamente con los inhibidores. Dichos residuos pueden ser considerados para ensayos de mutagénesis dirigida para determinar su rol en el funcionamiento de MRP4.

Tabla 6. Resultados de acoplamiento molecular y DSs de quercetina y cefourina-1 con MRP4.

| Molécula    | Diagrama de interacción | DS (kcal/mol) |
|-------------|-------------------------|---------------|
| Quercetina  |                         | -5.73         |
| Cefourina-1 |                         | -7.16         |

Tabla 7. Principales residuos de MRP4 para la interacción con los 3 grupos de moléculas estudiados.

|          | Sustratos endógenos                         | Fármacos sustrato                                    | Inhibidores   |
|----------|---|--|---|
| Residuos | Glu 374, Gln 251, Asn 320, Lys 106, Arg 998 | Asn 320, Phe 320, Asp 842, Glu 374, Gln 251, Leu 838 | Gln 251, Asn 320, Asp 842, <b>Phe 324</b> , <b>Arg 362</b> , <b>Thr 366</b> , Leu 247 |

#### 6.4 Diseño de moléculas basado en fragmentos

Una vez realizado el acoplamiento molecular, se identificaron los grupos funcionales o grupos de átomos que ejercen interacciones intermoleculares con el MRP4 con cada grupo de moléculas. Se compararon las distintas interacciones de los grupos de moléculas y los residuos de MRP4 y se analizaron cuáles fueron los residuos de aminoácidos más importantes para cada grupo, con el objetivo de realizar un estudio de mutagénesis posteriormente. Por otro lado, se utilizaron las estructuras de quercetina y cefourina-1 como base para el diseño de nuevas moléculas inhibitorias de MRP4. Primero se identificaron los fragmentos importantes de quercetina y cefourina-1 para la interacción con MRP4. Estos fragmentos, así como el tipo de interacción con MRP4 se señalan en la figura 15. Posteriormente, se modificó la rigidez y se adicionaron donadores y aceptores de hidrógeno en cada molécula, dando lugar a la serie A. Para obtener la serie B, se realizó la combinación de fragmentos de las moléculas modificadas de quercetina y cefourina-1 que hayan obtenido el mejor docking score (DS), es decir la mejor afinidad teórica hacia el MRP4, en kcal/mol (a menor energía, mayor afinidad

teórica). La serie C fue el resultado de combinar los fragmentos de las moléculas con mejor DS en la serie B. Finalmente, la serie D se obtuvo combinando los fragmentos de las moléculas con mejor DS en la serie C con fragmentos con mejor DS de la base de datos de Schrodinger y Maybridge. La molécula EBD9 obtuvo el mejor DS y fue seleccionada para síntesis y evaluación. EBD9 interactúa principalmente por enlaces  $\pi$ - $\pi$ ,  $\pi$ -catión e hidrógeno con residuos con carga positiva como la arginina. Además, EBD9 mostró una clara preferencia por el residuo Arg362 en la hélice transmembrana 6 (TMH6), con interacciones  $\pi$ - $\pi$  o  $\pi$ -catión. Tomando en cuenta que cuanto menor sea el DS, mayor será la afinidad teórica, la estrategia del diseño de moléculas se resume en la tabla 8. La tabla 9 presenta la estructura y el DS de las 3 moléculas con mejor DS y mejor afinidad teórica hacia MRP4.

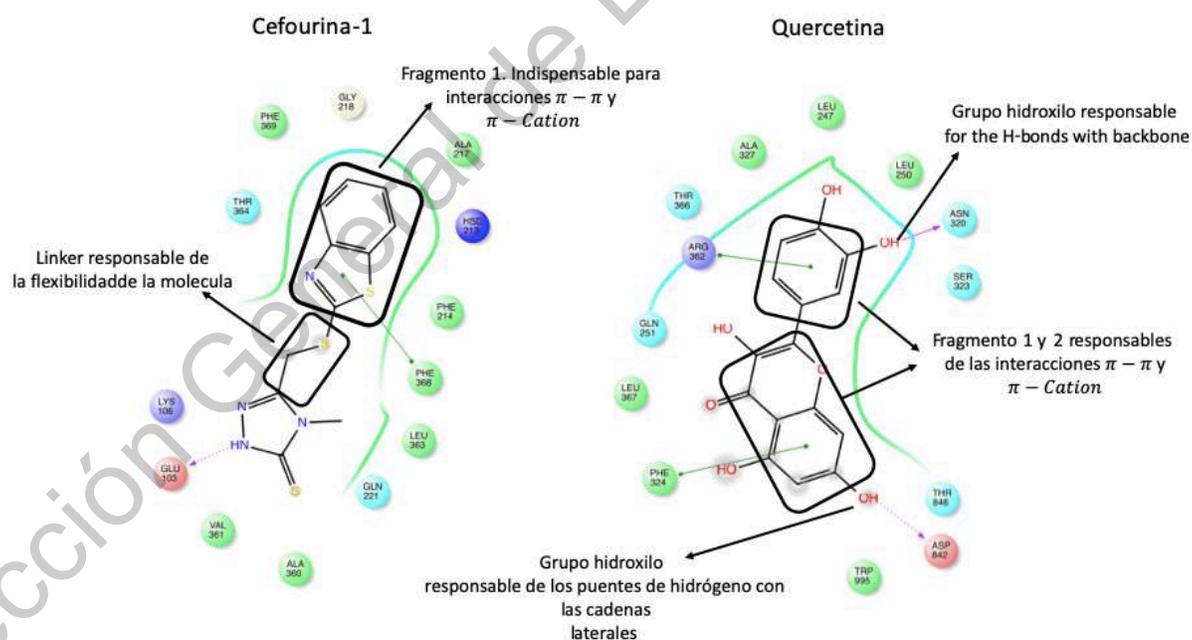
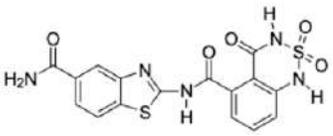
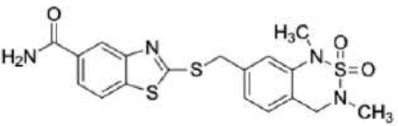
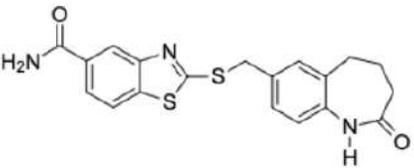


Figura 15. Identificación de los fragmentos de cefourina-1 y quercetina relevantes para la interacción con MRP4.

Tabla 8. Estrategia del diseño de las moléculas de la serie A a D.

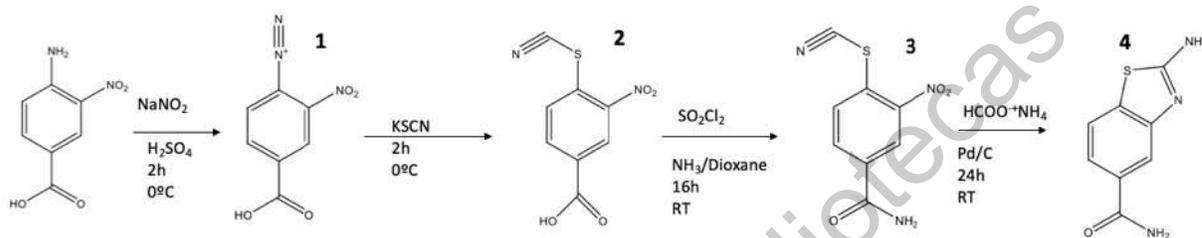
| Serie | Estrategia   |
|-------|--|
| A     | Adición/eliminación de donadores de H o aceptores de H a los fragmentos de quercetina y cefourina-1 (indicados en la figura 15).   |
| B     | Los fragmentos de las moléculas con menor DS de la serie A se combinaron entre sí para producir moléculas con fragmentos de cefourina-1 y quercetina.  |
| C     | Los fragmentos de las moléculas con menor DS de las series A y B se combinaron entre sí.   |
| D     | Los fragmentos de las moléculas con menor DS de la serie C se combinaron con los fragmentos con menor DS (en el acoplamiento molecular con MRP4) de las bases de datos de Schrödinger y Maybridge. |

Tabla 9. Estructura de las 3 moléculas diseñadas con mejor DS en MRP4.

|       | Estructura   | Docking score (kcal/mol) |
|-------|--|--------------------------|
| EBD9  |  | -11.93                   |
| EBD1  |  | -10.49                   |
| EBD14 |  | -11.74                   |

## 6.5 Procedimiento general para la síntesis de EBD9

Se procedió a realizar primeramente la síntesis de EBD9, que fue la molécula que presentó un mejor DS. En un trabajo posterior se pretende realizar en conjunto la síntesis de EBD1 y EBD14, ya que comparten un fragmento en común. Las rutas sintéticas para preparar EBD9 se esbozaron en los esquemas 1 a 3. En el esquema 1 se ilustra la ruta sintética utilizada.

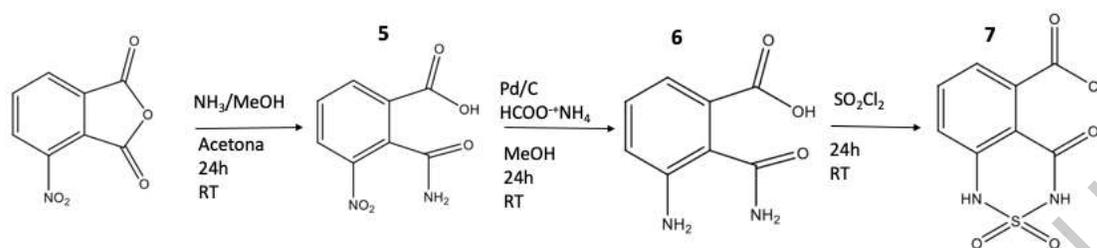


Esquema 1. Reacciones y condiciones para producir los intermediarios 1 a 4. TA: temperatura ambiente; Pd/C: paladio sobre carbono; KSCN: tiocianato de potasio.

El ácido 4-amino-3-nitrobenzoico disponible comercialmente se disolvió en ácido sulfúrico y se añadió  $\text{NaNO}_2$  a la mezcla en un baño de hielo. Posteriormente, se añadió KSCN, disuelto en agua, en las mismas condiciones para producir el intermediario tiocianato 2. Este producto se trató con  $\text{SO}_2\text{Cl}_2$  y luego, se añadió  $\text{NH}_3$  disuelto en dioxano para formar la amida correspondiente. La reducción del grupo nitro del intermediario 3 se realizó disolviéndolo en metanol/ $\text{H}_2\text{O}$  y tratado con  $\text{HCOO}^-\text{NH}_4$  con Pd al 10% en carbón activado como catalizador, condiciones que no sólo redujeron el grupo nitro sino que también promovieron la formación del cierre del anillo, obteniendo el intermediario 4 (fragmento 1).

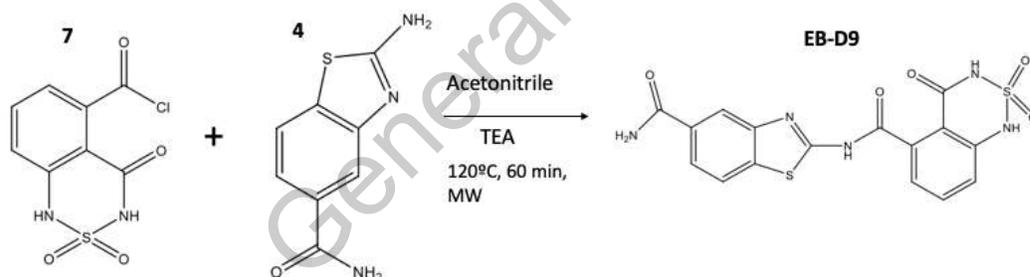
El esquema 2 describe el proceso para preparar los intermediarios 5 a 7. Primero, el anhídrido 3-nitroftálico disponible comercialmente se disolvió en acetona y se hizo reaccionar con  $\text{NH}_3$  en metanol para abrir el anhídrido y formar el intermediario 5. La reducción del grupo nitro presente en el intermedio 5 se realizó disolviendo este último en metanol: $\text{H}_2\text{O}$  a las condiciones de hidrogenación catalítica previamente utilizadas en 4. Una vez que el intermedio se purificó y se secó, se hizo reaccionar

con  $\text{SO}_2\text{Cl}_2$  para producir el intermediario 7, mismo que se mantuvo suspendido en tolueno para su uso inmediato para la síntesis de EBD9.



Esquema 2. Reacciones y condiciones para producir intermediarios 5 a 7.  $\text{SO}_2\text{Cl}_2$ : cloruro de sulfurilo; MeOH: metanol;  $\text{HCOO}^- \text{NH}_4^+$ : formiato de amonio.

El esquema 3 describe el proceso para preparar EBD9. Los intermediarios 4 y 7 (que en las evaluaciones biológicas serán llamados fragmento 1 y fragmento 2, respectivamente) se disolvieron en acetonitrilo y se añadió trietilamina en un recipiente reactor para un reactor de convección Anton-Paar Monowave 50. La reacción se calentó a  $120^\circ\text{C}$  durante 60 min. La purificación de EBD9 se realizó mediante extracción con acetato de etilo/agua y cromatografía en columna con acetato de etilo como fase móvil.



Esquema 3. Reacción para sintetizar EBD9. TEA: trietilamina; MW: microondas.

La figura 16 muestra el espectro RMN del fragmento 1. En este espectro fue difícil asignar las señales debido a que posiblemente se trate de una mezcla de compuestos. No se anexa la elucidación de  $^{13}\text{C}$  por esa razón. Se especula, de acuerdo con las señales observadas, que la muestra tiene un mayor porcentaje de materia prima dado a la forma en que fue recristalizada la muestra. Por lo tanto, las señales más intensas corresponderían a la materia prima y las señales pequeñas al fragmento 1 (estructura situada en el extremo superior derecho del espectro), de

acuerdo con los espectros predictivos. De esta manera se podrían explicar los bajos rendimientos obtenidos. Durante la síntesis fue complicado lograr la reducción del grupo nitro del ácido amino nitrobenzónico, lo cual impidió la formación de la amina para el posterior ataque nucleofílico al nitrilo y la posterior formación del ciclo para completar el benzotiazol.

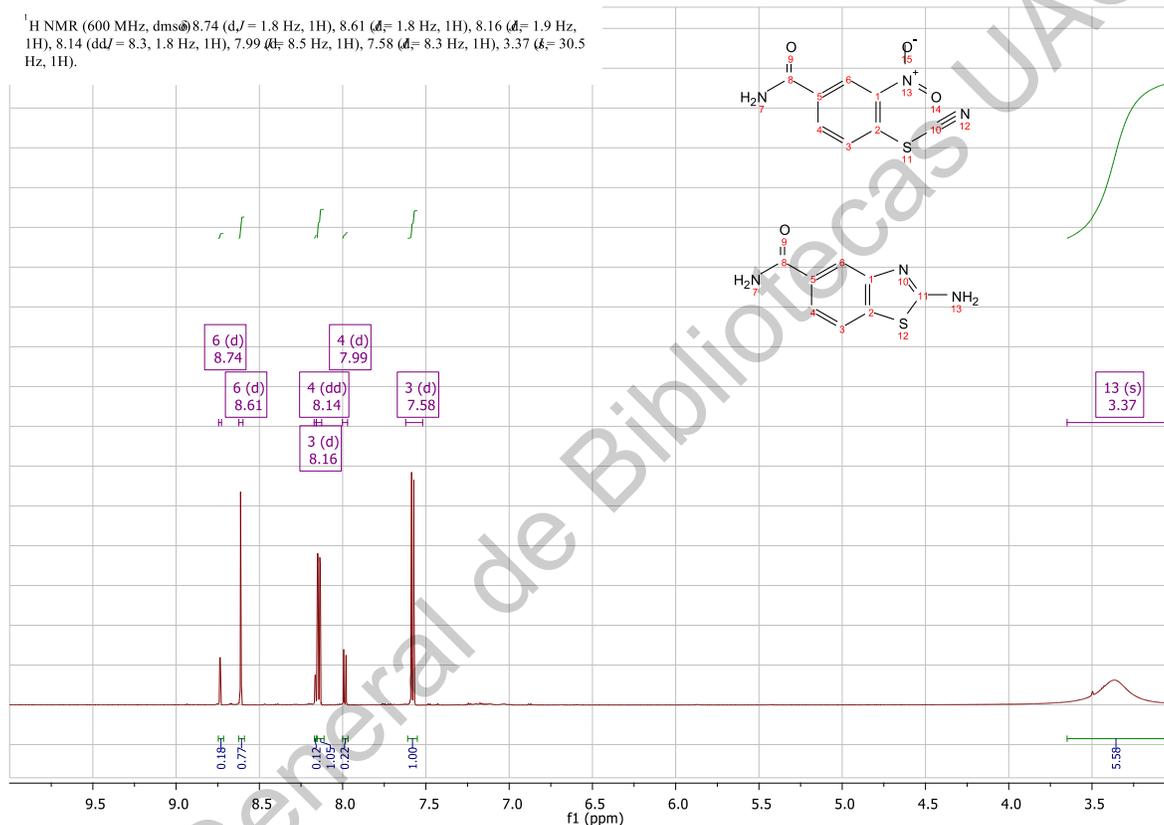


Figura 16. Espectro RMN-<sup>1</sup>H del fragmento 1.

La figura 17 muestra el espectro obtenido para el fragmento 2. En este caso, debido a que fue recristalizado en metanol, se obtuvo el éster metílico del compuesto de interés. Sin embargo, la elucidación estructural coincide con la estructura propuesta. Finalmente, se observa el espectro correspondiente a EBD9 (figura 18) donde al igual que la muestra anterior, este espectro muestra contaminación de alcanos, por lo que es lógico pensar que está contaminada con hexano y acetato de etilo provenientes de la fase de elución de la columna cromatográfica. El espectro en azul corresponde al calculado (de la molécula EBD9 esperada) y el espectro rojo corresponde al experimental. A pesar de tener señales que coinciden, el espectro

experimental contiene más señales aromáticas, que pueden corresponder no sólo a la estructura propuesta, sino también al tolueno que se usó para mantener estable el cloruro de ácido usado como materia prima. Debido a que la reacción se realizó a altas temperaturas, es posible que se presentara la degradación de este cloruro de ácido y formara otra molécula. En conclusión, con este espectro no se puede tener una certeza sobre la identidad de esta estructura de EBD9 a pesar de ser una sustancia separada por cromatografía, y los resultados de ensayos celulares realizados se deben a la mezcla de compuestos en el producto de reacción EBD9 (mezcla-EBD9).

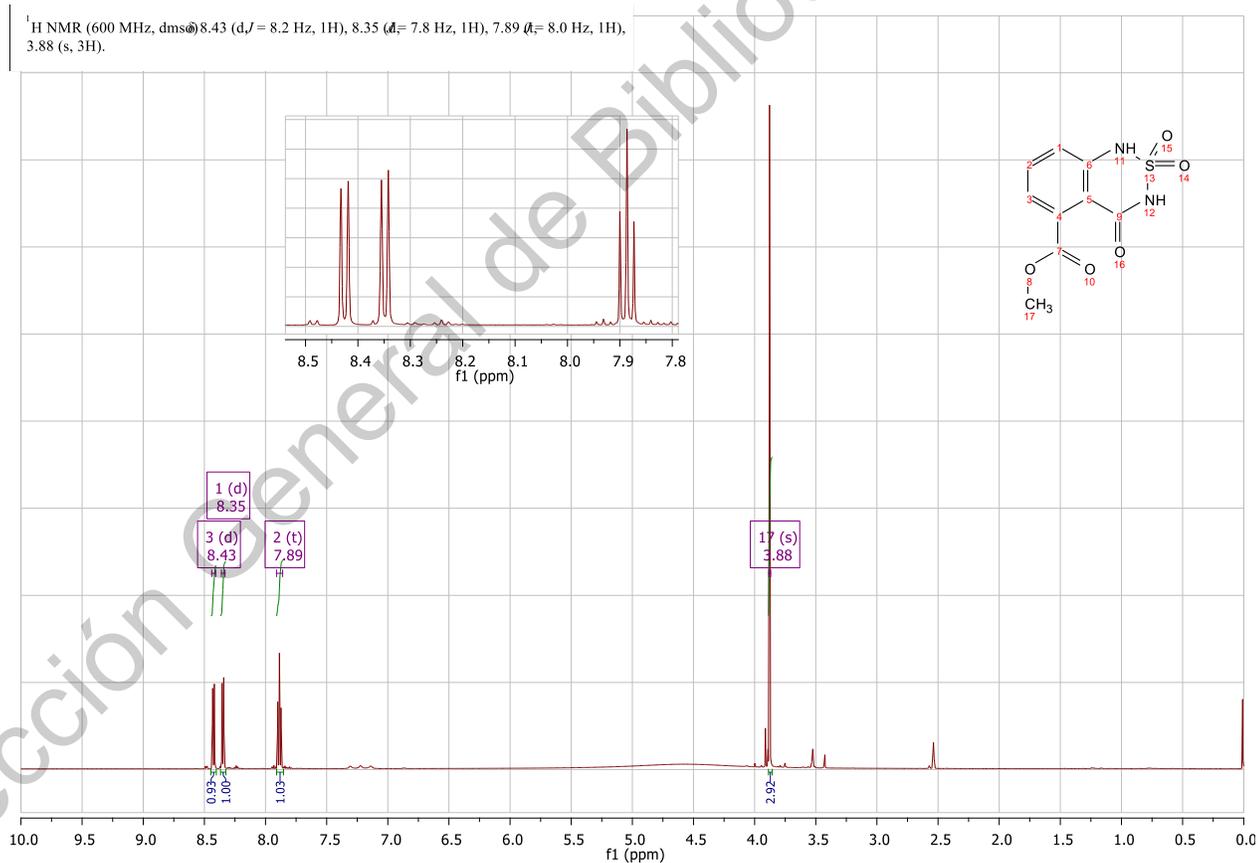


Figura 17. Espectro RMN-<sup>1</sup>H del fragmento 2.

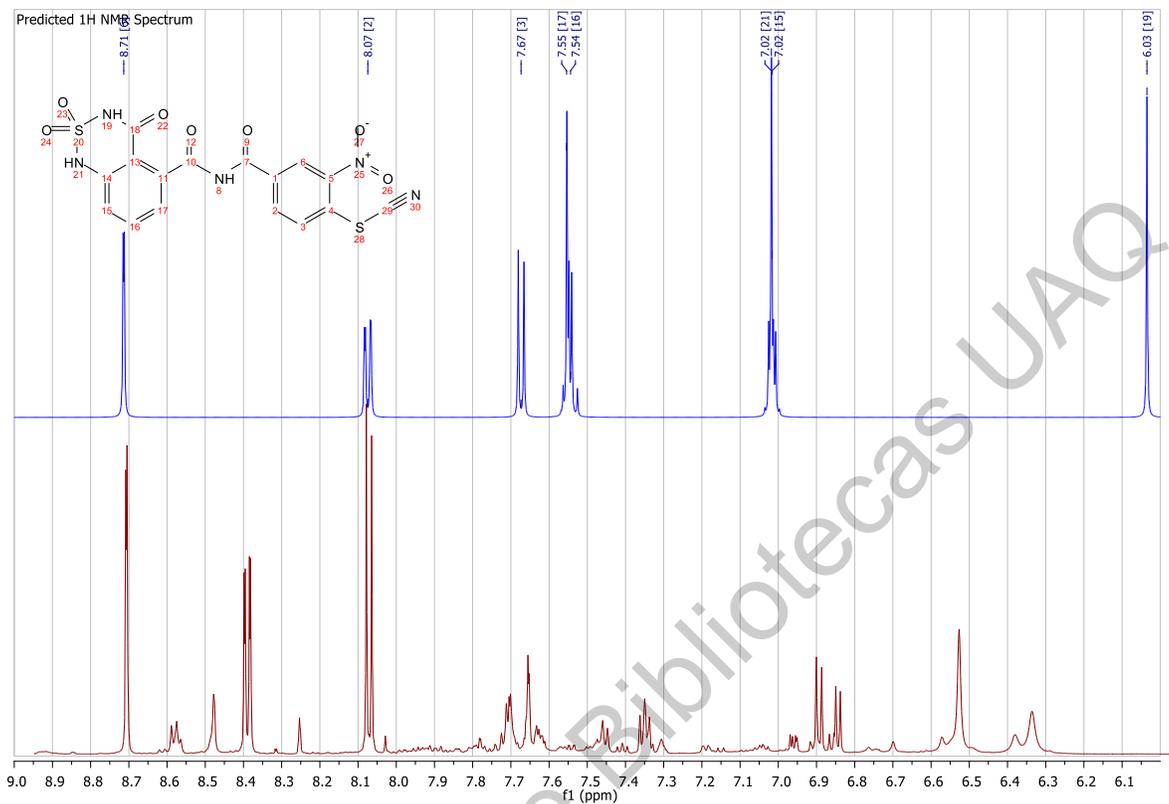


Figura 18. Espectro RMN- $^1\text{H}$  de la molécula mezcla-EBD9 (rojo) en comparación con una propuesta estructural (azul).

## Estructuras esperadas

## Estructuras obtenidas

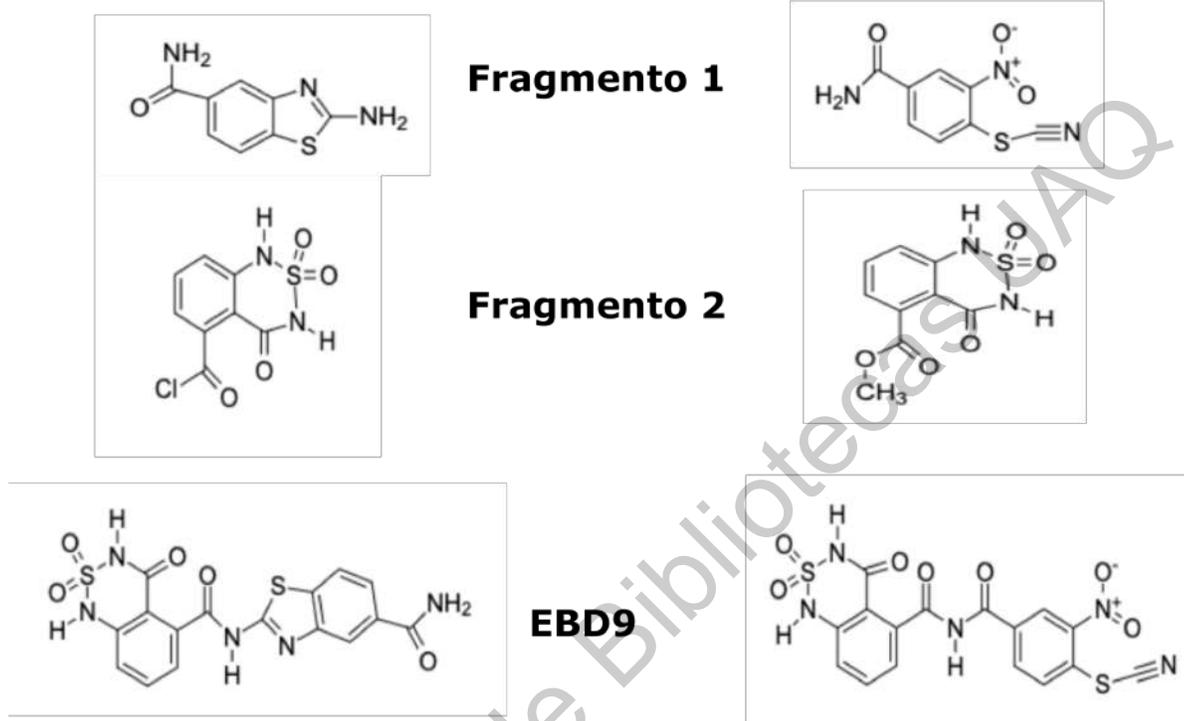


Figura 19. Estructuras de los fragmentos 1 y 2 y de EBD9 esperadas vs estructuras obtenidas.

### 6.6 Niveles de AMPc en células Jurkat después de los tratamientos.

La curva de concentración-respuesta (figura 21) mostró que la IC<sub>50</sub> para la mezcla-EBD9 fue de 1.35  $\mu$ M considerando el peso molecular de EBD9. La IC<sub>50</sub>, en este caso, representa la concentración en la que se inhibe la actividad de MRP4 al 50%, lo que conduce a la acumulación de AMPc dentro de la célula. Las células Jurkat se trataron durante 12 h con cefourina-1 1.5  $\mu$ M o diferentes concentraciones de mezcla-EBD9 para analizar su efecto sobre los niveles de AMPc intracelular. EBD9 de 1.0  $\mu$ M a 100  $\mu$ M aumentó los niveles de AMPc de una manera dependiente de la concentración (figura 22). Mezcla-EBD9 100  $\mu$ M inhibió la salida de AMPc por encima del 90% con respecto al control negativo (DMSO). El control positivo para

evaluar la inhibición de MRP4 fue cefourina-1 (ABCAM, número de cat. Ab145144) a 1.5  $\mu\text{M}$ , que es la  $\text{IC}_{50}$  indicada en el prospecto. La  $\text{IC}_{50}$  de cefourina-1 aumentó los niveles de AMPc sin diferencia significativa con respecto a la  $\text{IC}_{50}$  de mezcla-EBD9. La Figura 22 muestra el efecto de cada tratamiento sobre los niveles de AMPc intracelular en células Jurkat. Los niveles de AMPc medidos en el grupo de control negativo, así como en el grupo mezcla-EBD9 0.1  $\mu\text{M}$  son estadísticamente iguales. Mezcla-EBD9 10  $\mu\text{M}$  es estadísticamente diferente a todos los tratamientos igual que mezcla-EBD9 100  $\mu\text{M}$ , que promovieron los niveles más altos de acumulación de AMPc. De acuerdo al método utilizado para medir AMPc, no podemos determinar con este experimento si mezcla-EBD9 solamente inhibe MRP4 o si activa adenilato ciclasa o inhibe a la fosfodiesterasa, que son las otras dos maneras en que los niveles AMPc pudieran elevarse[41]. Se podría utilizar AMPc marcado para una mejor evaluación de la inhibición de MRP4 por EBD9.

El promotor MRP4 tiene varios elementos de respuesta para cAMP, que también modula los niveles de proteína y ARNm de MRP4[68]. Si se produce una acumulación de AMPc, la regulación positiva de la expresión de MRP4 a través de las Proteínas de Intercambio Activadas por AMPc (EPAC) debería ser el siguiente evento seguido de un aumento en la salida de AMPc. Sin embargo, después del tratamiento con EBD9, la acumulación de AMPc predomina sobre la salida de AMPc, lo que sugiere que la inhibición de la salida podría deberse a que mezcla-EBD9 y AMPc compiten por el mismo sitio de unión. Por otro lado, el eflujo de AMPc dependiente de MRP4 puede ser un evento tardío considerando el alto costo energético del flujo de salida de AMPc, y el posible agotamiento asociado de las reservas de purina[69]. Además, varios informes indican que el transporte de AMPc mediado por MRP4 representa un mecanismo regulador accesorio solo en los casos en los que los niveles de nucleótidos cíclicos son significativamente altos, por ejemplo, en células leucémicas con respecto a células hematopoyéticas normales. De acuerdo con la estructura de mezcla-EBD9 y el docking molecular realizado, las interacciones mediante puentes de hidrógeno serían menos frecuentes con respecto a la estructura de EBD9 esperada, pero las interacciones tipo  $\pi$ - $\pi$  serían

más probables (figura 20). El sitio de unión fue el mismo para ambas estructuras, pero con diferente patrón de interacción intermolecular. El grupo nitrilo no es particularmente electrofílico hacia los nucleófilos libres, incluso el glutatión, a menos que sea activado por elementos estructurales adyacentes, como los grupos sustractores de electrones, pero tiene mayor reactividad que el grupo nitro [70]. Las dos desventajas de la estructura obtenida del fragmento 1 son que se puede generar especies reactivas de nitrógeno por el grupo nitro y que es menos estable que la estructura esperada. La ausencia del benzotiazol en la estructura de mezcla-EBD9 podría ser una limitante en cuanto su afinidad hacia MRP4, ya que la estructura de benzotiazol parece ser la responsable de las interacciones tipo  $\pi$ - $\pi$  y  $\pi$ -catión las cuales son típicas de las moléculas inhibitoras de MRP4[71]. Tanto la estructura de mezcla-EBD9 como la EBD9 esperada incumplen con 3 de las reglas de “la regla de los 4” de Didziapertis y colaboradores, cumpliendo únicamente con la del  $pK_a < 4$ . Teóricamente estarían actuando como un sustrato, sin embargo, podrían ser inhibidores competitivos de AMPc, ya que se unen al mismo sitio de MRP4[67]. Adicionalmente, la selectividad puede verse comprometida ya que el benzotiazol es parte del esqueleto estructural de cefourina-1, la cual es la molécula más selectiva en cuanto a interacción/inhibición sobre MRP4 [50]. Por otro lado, la estructura altamente reactiva del fragmento 1 obtenido presente en mezcla-EBD9 pudiera comprometer la selectividad de la molécula y aumentar el riesgo de efectos *off target*. La estructura obtenida del fragmento 2 fue prácticamente la misma que la esperada, pero la recristalización en metanol favoreció la formación del grupo metoxi en lugar del cloruro de ácido. De esta manera, las interacciones tipo  $\pi$ - $\pi$  y  $\pi$ -catión, así como las interacciones por puente de hidrógeno serían las diferencias clave entre la molécula mezcla-EBD9 con respecto a la molécula EBD9 esperada.

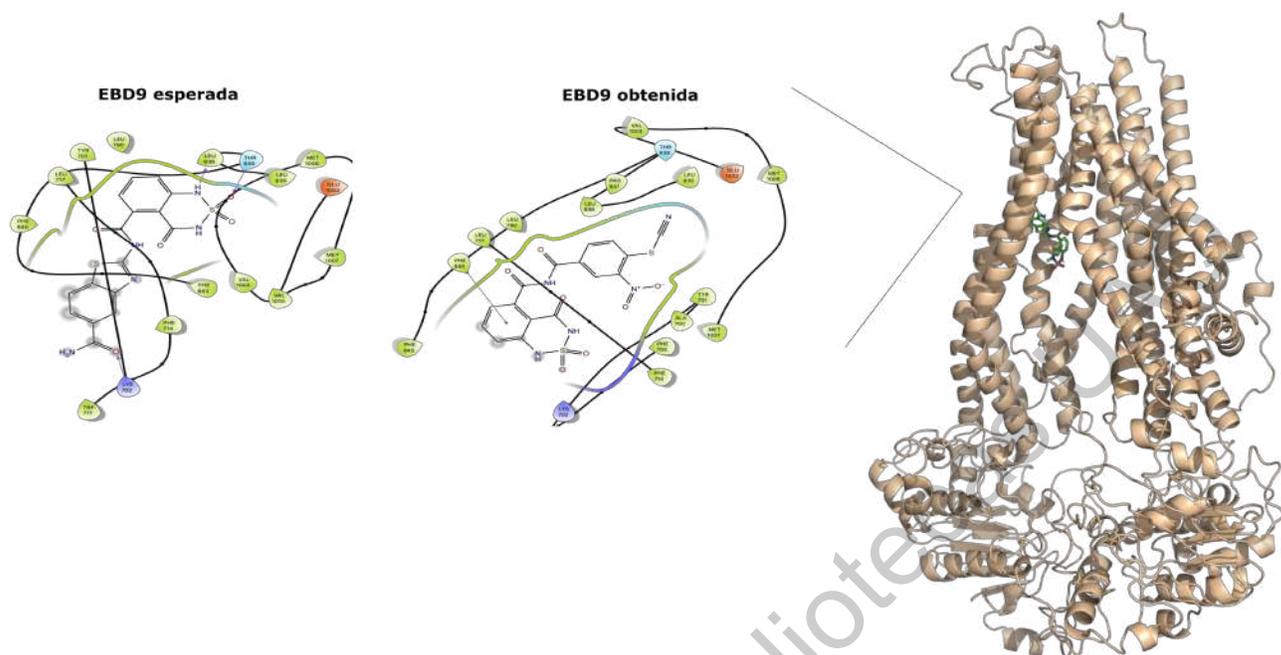


Figura 20. Diagramas de interacción de la estructura de EBD9 esperada vs la estructura de EBD9 obtenida (mezcla-EBD9).

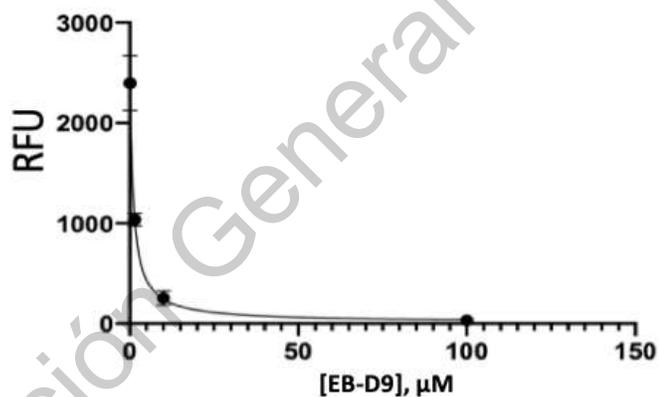


Figura 21. Curva concentración-respuesta de mezcla-EBD9 sobre el eflujo de AMPc en células Jurkat. Las concentraciones de mezcla-EBD9 utilizadas fueron 0.1  $\mu\text{M}$ , 1.0  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  y 100  $\mu\text{M}$ .

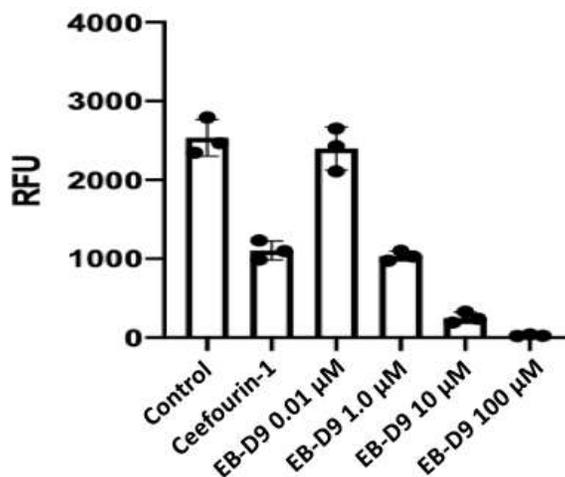


Figura 22. Efecto de los distintos tratamientos sobre los niveles de AMPc en células Jurkat. Se presenta el control negativo que es DMSO, control positivo que es cefourina-1 1.5 µM y las 4 concentraciones de mezcla-EBD9 usadas en la curva concentración-respuesta.

### 6.7 Evaluación de apoptosis en células Jurkat y CRL-1991

Las células Jurkat y CRL-1991 fueron tratadas como se indica en la tabla 5 con el objetivo de determinar el efecto apoptótico inducido por cada molécula y observar si hubo diferente porcentaje de apoptosis en las líneas celulares. La  $IC_{50}$  de mezcla-EBD9 corresponde a la concentración (1.35 µM) que inhibió el 50% del eflujo de AMPc en células Jurkat después de 12h de tratamiento. Así mismo, se utilizó la concentración de 1.35 µM para los fragmentos 1 y 2 que conforman a mezcla-EBD9. Los experimentos de apoptosis proporcionaron información valiosa pero no concluyente, ya que, de acuerdo con la elucidación estructural, las muestras tenían contaminación de los disolventes como acetato de etilo y hexano. Posiblemente, la presencia de contaminación por alcanos se deba a residuos de plástico de las tapas de los matraces utilizados para la formación de cloruros de ácido (en la síntesis de los fragmentos 1 y 2), ya que el cloruro de sulfurilo es altamente corrosivo. En relación con lo anterior, no se puede determinar el porcentaje de contaminación presente en cada muestra. Sin embargo, se muestran los resultados preliminares de ensayos de apoptosis (figura 23). En todos los grupos, a excepción del control

negativo, la actividad apoptótica fue significativamente mayor en células Jurkat que en linfoblastos normales (CRL-1991), lo cual era de esperarse debido a la mayor susceptibilidad que tienen las células leucémicas a los anticancerígenos. En el grupo de vincristina (VCR) se observó un mayor porcentaje de apoptosis en CRL-1991 comparado con los demás grupos. La VCR es un fármaco que favorece el arresto mitótico y la muerte celular mediante la perturbación de la dinámica de los microtúbulos. Además, el estrés oxidativo provocado por VCR es un mecanismo adicional por el cual se produce muerte celular [72,73], siendo tales mecanismos los responsables del porcentaje elevado de apoptosis en CRL-1991.

La cefourina-1 es la molécula con mayor selectividad en la inhibición de MRP4, promoviendo la acumulación de AMPc intracelular, y la concentración de 1.5  $\mu$ M utilizada en el experimento de apoptosis corresponde a la IC<sub>50</sub> de inhibición de MRP4, lo cual correspondió a menos del 20% de inducción de apoptosis en ambas líneas celulares, siendo mayor el porcentaje de apoptosis en Jurkat. Los resultados son consistentes con el hecho de que el incremento de los niveles de AMPc favorece la inducción de apoptosis intrínseca mediante la activación de PKA y posterior fosforilación de Bax [41] en células leucémicas en mayor proporción que en células hematopoyéticas normales [42]. Los blastos hematopoyéticos normales toleran más la acumulación de AMPc después de inhibir MRP4, siendo la diferenciación uno de los eventos posteriores más benéficos, como se observa en células blásticas de leucemia mieloide [74]. El porcentaje de apoptosis inducido por mezcla-EBD9 es el que muestra la mayor diferencia entre Jurkat y CRL1991, mostrando una amplia preferencia por las células Jurkat. EBD9 indujo el menor porcentaje de apoptosis sobre CRL-1991 con respecto a VCR, cefourina-1 y los fragmentos 1 y 2. Por otro lado, mezcla-EBD9 indujo el segundo mayor porcentaje de apoptosis sobre células Jurkat, sólo por debajo del control positivo VCR. Lo anterior sugiere que mezcla-EBD9 mostró el mayor grado de selectividad en cuanto a efecto apoptótico. Aun así, el porcentaje de apoptosis inducido en CRL-1991 es significativamente mayor que el inducido por el control negativo DMSO, lo cual sugiere que efectivamente la acumulación de AMPc provocada por mezcla-EBD9,

induce un efecto apoptótico sobre células hematopoyéticas normales, aunque no podemos afirmar que sea el único mecanismo por el cual mezcla-EBD9 induce apoptosis. De la misma forma en que no podemos determinar si EBD9 favorece el aumento de AMPc intracelular por inhibición de MRP4, por activación de adenilato ciclasa o por inhibición de fosfodiesterasas, tampoco podemos asegurar cuáles son los mecanismos alternativos por los cuales mezcla-EBD9 induce apoptosis, tomando en cuenta que su estructura pudiera ser promiscua. Los fragmentos 1 y 2 tienen actividad apoptótica por separado, ya que indujeron apoptosis significativamente mayor que DMSO en ambas líneas celulares, sin diferencia significativa entre ellos. Sin embargo, se observa que por separado no tienen el mismo grado de selectividad hacia células Jurkat comparados con mezcla-EBD9.

El siguiente paso por seguir es la repetición de la síntesis de EBD9 tomando en cuenta todos los factores que darán lugar a un mayor rendimiento y a niveles casi indetectables de contaminación. Una vez que se tengan las muestras puras, se realizarán nuevamente los ensayos de eflujo de AMPc para determinar la inhibición de MRP4, así como los ensayos de apoptosis. Para estudiar aún más la función de MRP4, se realizarán estudios *in silico* de dinámica molecular *all-atom* y *umbrella sampling*, así mutagénesis sobre el gen ABCC4 modificando los residuos de interacción de EBD9 determinados por los análisis *in silico*, para aproximarnos a determinar el sitio de interacción de EBD9. Para realizar los estudios de mutagénesis dirigida se utilizará el sistema CRISPR-Cas9 y de esta manera tener únicamente la variante de MRP4 y no la nativa en las células Jurkat.

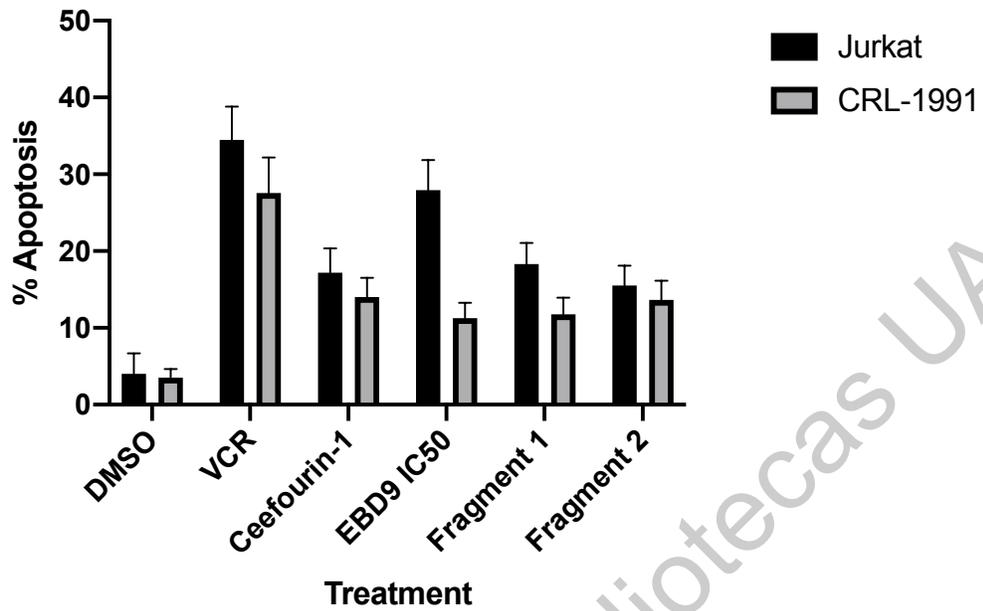


Figura 23. Inducción de apoptosis por los distintos tratamientos sobre células Jurkat en comparación con células CRL-1991.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## 7. Conclusión

El desarrollo de nuevos tratamientos para leucemia se basa en nuevos enfoques farmacológicos, identificando blancos terapéuticos estratégicos que no comprometan al máximo la salud de los pacientes. La inhibición de MRP4 para activar la vía de la apoptosis de una manera selectiva y, a su vez, mejorar la eficacia de los fármacos quimioterapéuticos que son sustrato de MPR4, es uno de los enfoques más prometedores. En el presente trabajo se diseñaron 3 moléculas con potencial inhibitorio sobre MRP4 ya que presentan una afinidad teórica entre 50 y 60 veces mayor que la quercetina y cefourina-1 (la más potente y selectiva, respectivamente). Se llevó a cabo la ruta de síntesis propuesta, con resultados preliminares sobre la inhibición de MRP4 y la inducción de apoptosis prometedores. La mezcla-EBD9 presenta un patrón de inhibición de MRP4 similar a la molécula control cefourina-1. Por otro lado, se muestra una selectividad sobre células Jurkat en la inducción de apoptosis por mezcla-EBD9, lo cual sugiere una baja probabilidad de efectos *off target*. Además, los fragmentos 1 y 2 indujeron apoptosis con diferencia significativa respecto al control, aunque fue significativamente menor a la apoptosis inducida por mezcla-EBD9. Como se mencionó anteriormente, se realizará una nueva ronda de síntesis para obtener la molécula EBD9 esperada y determinar su eficacia en la inhibición de MRP4 e inducción de apoptosis y, con la ayuda de la tecnología CRISPR-Cas9 se determinará el sitio de unión de EBD9 para tratar de explicar su mecanismo de acción.

## 8. Referencias

- [1] Drobna M, Szarzyńska-Zawadzka B, Dawidowska M. T-cell acute lymphoblastic leukemia from miRNA perspective: Basic concepts, experimental approaches, and potential biomarkers. *Blood Rev* 2018;32:457–72. doi:10.1016/j.blre.2018.04.003.
- [2] Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 2016;127. doi:10.1182/blood-2016-03-643544.
- [3] Raetz EA, Teachey DT. T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Hematology* 2016;2016:580–8. doi:10.1182/asheducation-2016.1.580.
- [4] Noone AM, Howlander N, Krapcho M, Miller D, Brest A, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ CK. SEER Cancer Statistics Review (CSR) 1975-2015 2015.
- [5] Rendón-Macías ME, Reyes-Zepeda NC, Villasís-Keever MÁ, Meneses JS, Núñez AE. Tendencia mundial de la supervivencia en pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda. revisión de las últimas cuatro décadas. *Bol Med Hosp Infant Mex* 2012;69:153–63.
- [6] Terwilliger T, Abdul-Hay M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer J* 2017;7:e577–e577. doi:10.1038/bcj.2017.53.
- [7] Zuckerman T, Rowe JM. Pathogenesis and prognostication in acute lymphoblastic leukemia. *F1000Prime Rep* 2014;6:59. doi:10.12703/P6-59.
- [8] Ma Y, Dobbins SE, Sherborne AL, Chubb D, Galbiati M, Cazzaniga G, et al. Developmental timing of mutations revealed by whole-genome sequencing of twins with acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:7429–33. doi:10.1073/pnas.1221099110.
- [9] Belver L, Ferrando A. The genetics and mechanisms of T cell acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Rev Cancer* 2016;16. doi:10.1038/nrc.2016.63.
- [10] Patel B, Fernando F. Molecular basis of acute lymphoblastic leukemia. *Mol. Hematol.* 4e, Wiley; 2019, p. 59–70. doi:10.1002/9781119252863.ch5.
- [11] Girardi T, Vicente C, Cools J, De Keersmaecker K. The genetics and molecular biology of T-ALL. *Blood* 2017;129. doi:10.1182/blood-2016-10-706465.
- [12] Kampouraki E, Goulielmos G, Stiakaki E. Understanding the role of genetics in childhood acute lymphoblastic leukemia (Review). *World Acad Sci J* 2020.

doi:10.3892/wasj.2020.54.

- [13] Li Y, Schwab C, Ryan S, Papaemmanuil E, Robinson HM, Jacobs P, et al. Constitutional and somatic rearrangement of chromosome 21 in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* 2014;508:98–102. doi:10.1038/nature13115.
- [14] Moriyama T, Relling M V, Yang JJ. Inherited genetic variation in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2015;125:3988–95. doi:10.1182/blood-2014-12-580001.
- [15] Pui C-H, Robison LL, Look AT. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* (London, England) 2008;371:1030–43. doi:10.1016/S0140-6736(08)60457-2.
- [16] Gupta S, Hunger SP. Recent trends in the results of studies conducted by the Children's Oncology Group acute lymphoblastic leukemia committee and implications for emerging cooperative trial groups in low- and middle-income countries. *Pediatr Hematol Oncol J* 2020;5:151–5. doi:10.1016/j.phoj.2020.03.001.
- [17] Schirrmacher V. From chemotherapy to biological therapy: A review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment (Review). *Int J Oncol* 2019;54:407–19. doi:10.3892/ijo.2018.4661.
- [18] Bakker E, Qattan M, Mutti L, Demonacos C, Krstic-Demonacos M. The role of microenvironment and immunity in drug response in leukemia. *Biochim Biophys Acta* 2016;1863:414–26. doi:10.1016/j.bbamcr.2015.08.003.
- [19] Chiarini F, Lonetti A, Evangelisti C, Buontempo F, Orsini E, Evangelisti C, et al. Advances in understanding the acute lymphoblastic leukemia bone marrow microenvironment: From biology to therapeutic targeting. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 2016;1863:449–63. doi:10.1016/j.bbamcr.2015.08.015.
- [20] Hsieh H, Jia W, Jin Z, Kidoya H, Takakura N. High expression of PSF1 promotes drug resistance and cell cycle transit in leukemia cells. *Cancer Sci* 2020;111:2400–12. doi:10.1111/cas.14452.
- [21] Konopleva MY, Jordan CT. Leukemia stem cells and microenvironment: Biology and therapeutic targeting. *J Clin Oncol* 2011;29:591–9. doi:10.1200/JCO.2010.31.0904.
- [22] Ravna AW, Sager G. Molecular modeling studies of ABC transporters involved in multidrug resistance. *Mini Rev Med Chem* 2009;9:186–93.
- [23] Szöllősi D, Rose-Sperling D, Hellmich UA, Stockner T. Comparison of mechanistic transport cycle models of ABC exporters. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 2018;1860:818–32. doi:10.1016/j.bbamem.2017.10.028.

- [24] Chen Z, Shi T, Zhang L, Zhu P, Deng M, Huang C, et al. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family in multidrug resistance: A review of the past decade. *Cancer Lett* 2016;370:153–64. doi:10.1016/j.canlet.2015.10.010.
- [25] El-Awady R, Saleh E, Hashim A, Soliman N, Dallah A, Elrasheed A, et al. The Role of Eukaryotic and Prokaryotic ABC Transporter Family in Failure of Chemotherapy. *Front Pharmacol* 2017;7. doi:10.3389/fphar.2016.00535.
- [26] Liu B, Li L-J, Gong X, Zhang W, Zhang H, Zhao L. Co-expression of ATP binding cassette transporters is associated with poor prognosis in acute myeloid leukemia. *Oncol Lett* 2018. doi:10.3892/ol.2018.8095.
- [27] Fletcher JI, Williams RT, Henderson MJ, Norris MD, Haber M. ABC transporters as mediators of drug resistance and contributors to cancer cell biology. *Drug Resist Updat* 2016;26:1–9. doi:10.1016/j.drup.2016.03.001.
- [28] Muriithi W, Wanjiku Macharia L, Pilotto Heming C, Lima Echevarria J, Nyachieo A, Niemeyer Filho P, et al. ABC transporters and the hallmarks of cancer: roles in cancer aggressiveness beyond multidrug resistance. *Cancer Biol Med* 2020;17:253–69. doi:10.20892/j.issn.2095-3941.2019.0284.
- [29] Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH, Mackie JE, Grant CE, Almquist KC, et al. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* 1992;258:1650–4.
- [30] Nasr R, Lorendeau D, Khonkarn R, Dury L, Pérès B, Boumendjel A, et al. Molecular analysis of the massive GSH transport mechanism mediated by the human Multidrug Resistant Protein 1/ABCC1. *Sci Rep* 2020;10:7616. doi:10.1038/s41598-020-64400-x.
- [31] Okamura T, Okada M, Kikuchi T, Wakizaka H, Zhang M-R. Mechanisms of glutathione-conjugate efflux from the brain into blood: Involvement of multiple transporters in the course. *J Cereb Blood Flow Metab* 2020;40:116–25. doi:10.1177/0271678X18808399.
- [32] Hardy D, Bill RM, Rothnie AJ, Jawhari A. Stabilization of Human Multidrug Resistance Protein 4 (MRP4/ABCC4) Using Novel Solubilization Agents. *SLAS Discov* 2019. doi:10.1177/2472555219867074.
- [33] Liu X, Pan G, editors. *Drug Transporters in Drug Disposition, Effects and Toxicity*. vol. 1141. Singapore: Springer Singapore; 2019. doi:10.1007/978-981-13-7647-4.
- [34] Schuetz JD, Connelly MC, Sun D, Paibir SG, Flynn PM, Srinivas R V, et al. MRP4: A previously unidentified factor in resistance to nucleoside-based antiviral drugs. *Nat Med* 1999;5:1048–51. doi:10.1038/12487.

- [35] Russel FGM, Koenderink JB, Masereeuw R. Multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4): a versatile efflux transporter for drugs and signalling molecules. *Trends Pharmacol Sci* 2008;29:200–7. doi:10.1016/j.tips.2008.01.006.
- [36] Berthier J, Arnion H, Saint-Marcoux F, Picard N. Multidrug resistance-associated protein 4 in pharmacology: Overview of its contribution to pharmacokinetics, pharmacodynamics and pharmacogenetics. *Life Sci* 2019;231:116540. doi:10.1016/j.lfs.2019.06.015.
- [37] Sobiak J, Skalska-Sadowska J, Chrzanowska M, Resztak M, Kołtan S, Wysocki M, et al. Thiopurine methyltransferase activity in children with acute myeloid leukemia. *Oncol Lett* 2018. doi:10.3892/ol.2018.9191.
- [38] Chen Y, Yuan X, Xiao Z, Jin H, Zhang L, Liu Z. 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* 2018;13:e0205175. doi:10.1371/journal.pone.0205175.
- [39] Saxena S, Rönn RE, Guibentif C, Moraghebi R, Woods N-B. Cyclic AMP Signaling through Epac Axis Modulates Human Hemogenic Endothelium and Enhances Hematopoietic Cell Generation. *Stem Cell Reports* 2016;6:692–703. doi:10.1016/j.stemcr.2016.03.006.
- [40] Copsel S, Bruzzone a, May M, Beyrath J, Wargon V, Cany J, et al. Multidrug resistance protein 4/ ATP binding cassette transporter 4: a new potential therapeutic target for acute myeloid leukemia. *Oncotarget* 2014;5:9308–21.
- [41] Perez DR, Smagley Y, Garcia M, Carter MB, Evangelisti A, Matlawska-wasowska K, et al. Cyclic - AMP - efflux - inhibitors - as - potential - therapeutic - agents - for - leukemia 2016;7.
- [42] Insel PA, Zhang L, Murray F, Yokouchi H, Zambon AC. Cyclic AMP is both a pro-apoptotic and anti-apoptotic second messenger. *Acta Physiol* 2012;204:277–87. doi:10.1111/j.1748-1716.2011.02273.x.
- [43] Zhang J, Wang X, Vikash V, Ye Q, Wu D, Liu Y, et al. ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. *Oxid Med Cell Longev* 2016;2016. doi:10.1155/2016/4350965.
- [44] Zhang H, Kong Q, Wang J, Jiang Y, Hua H. Complex roles of cAMP–PKA–CREB signaling in cancer. *Exp Hematol Oncol* 2020;9:32. doi:10.1186/s40164-020-00191-1.
- [45] Baillie\* BAF and GS. PDE4-Mediated cAMP Signalling. *J Cardiovasc Dev Dis* 2018;5:8. doi:10.3390/jcdd5010008.

- [46] Ould Amer Y, Hebert-Chatelain E. Mitochondrial cAMP-PKA signaling: What do we really know? *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* 2018;1859:868–77. doi:10.1016/j.bbabi.2018.04.005.
- [47] Kelly K, Mejia A, Suhasini AN, Lin A-P, Kuhn J, Karnad AB, et al. Safety and Pharmacodynamics of the PDE4 Inhibitor Roflumilast in Advanced B-cell Malignancies. *Clin Cancer Res* 2017;23:1186–92. doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-1207.
- [48] Chougule RA, Shah K, Moharram SA, Vallon-Christersson J, Kazi JU. Glucocorticoid-resistant B cell acute lymphoblastic leukemia displays receptor tyrosine kinase activation. *Npj Genomic Med* 2019;4:7. doi:10.1038/s41525-019-0082-y.
- [49] Monterisi S, Lobo MJ, Livie C, Castle JC, Weinberger M, Baillie G, et al. PDE2A2 regulates mitochondria morphology and apoptotic cell death via local modulation of cAMP/PKA signalling. *Elife* 2017;6. doi:10.7554/eLife.21374.
- [50] Cheung L, Flemming CL, Watt F, Masada N, Yu DMT, Huynh T, et al. High-throughput screening identifies Ceefourin 1 and Ceefourin 2 as highly selective inhibitors of multidrug resistance protein 4 (MRP4). *Biochem Pharmacol* 2014;91:97–108. doi:10.1016/j.bcp.2014.05.023.
- [51] Furuta T. Structural dynamics of ABC transporters: molecular simulation studies. *Biochem Soc Trans* 2021;49:405–14. doi:10.1042/BST20200710.
- [52] Didziapetris R, Japertas P, Avdeef A, Petrauskas A. Classification analysis of P-glycoprotein substrate specificity. *J Drug Target* 2003;11:391–406. doi:10.1080/10611860310001648248.
- [53] Robinson K, Tiriveedhi V. Perplexing Role of P-Glycoprotein in Tumor Microenvironment. *Front Oncol* 2020;10. doi:10.3389/fonc.2020.00265.
- [54] Fukuda Y, Takenaka K, Sparreboom A, Cheepala SB, Wu C-P, Ekins S, et al. Human Immunodeficiency Virus Protease Inhibitors Interact with ATP Binding Cassette Transporter 4/Multidrug Resistance Protein 4: A Basis for Unanticipated Enhanced Cytotoxicity. *Mol Pharmacol* 2013;84:361–71. doi:10.1124/mol.113.086967.
- [55] Yang J, Yan R, Roy A, Xu D, Poisson J, Zhang Y. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nat Methods* 2015;12:7–8. doi:10.1038/nmeth.3213.
- [56] Bateman A, Martin M-J, Orchard S, Magrane M, Agivetova R, Ahmad S, et al. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Res* 2021;49:D480–9. doi:10.1093/nar/gkaa1100.

- [57] Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS, Thornton JM. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J Appl Crystallogr* 1993;26:283–91. doi:10.1107/S0021889892009944.
- [58] S. Jo, T. Kim, V.G. Iyer and Wl. Web-based Graphical User Interface for CHARMM. *JComputChem* 2008;29:1859–65.
- [59] M.J. Abraham, D. van der Spoel, E. Lindahl BH and the G development team. *Gromacs* 2016.
- [60] J.B. Klauda, R.M. Venable, J.A. Freites, J.W. O'Connor, D.J. Tobias, C. Mondragon-Ramirez, I. Vorobyov, A.D. MacKerell, Jr. and RWP. Update of the CHARMM all-atom additive force field for lipids: Validation on six lipid types. *J Phys Chem B* 2010;114:7830–43.
- [61] Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, et al. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 2004;25:1605–12. doi:10.1002/jcc.20084.
- [62] Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem* 2009;30:2785–91. doi:10.1002/jcc.21256.
- [63] Ravna AW, Sager G. Molecular model of the outward facing state of the human multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4). *Bioorg Med Chem Lett* 2008;18:3481–3. doi:10.1016/j.bmcl.2008.05.047.
- [64] Post Hoc Tests: Tukey Honestly Significant Difference Test. *SAGE Encycl. Commun. Res. Methods*, 2455 Teller Road, Thousand Oaks California 91320: SAGE Publications, Inc; 2017. doi:10.4135/9781483381411.n452.
- [65] Beis K. Structural basis for the mechanism of ABC transporters. *Biochem Soc Trans* 2015;43:889–93. doi:10.1042/BST20150047.
- [66] Yaneff 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;26:1270–307. doi:10.2174/0929867325666171229133259.
- [67] Becerra E, Aguilera-Durán G, Berumen L, Romo-Mancillas A, García-Alcocer G. Study of Endogen Substrates, Drug Substrates and Inhibitors Binding Conformations on MRP4 and Its Variants by Molecular Docking and Molecular Dynamics. *Molecules* 2021;26:1051. doi:10.3390/molecules26041051.
- [68] Rodríguez González A, Sahores A, Díaz-Nebreda A, Yaneff A, Di Siervi N, Gómez N, et al. MRP4/ABCC4 expression is regulated by histamine in acute myeloid leukemia cells, determining cAMP efflux. *FEBS J* 2021;288:229–43.

doi:10.1111/febs.15344.

- [69] Godinho RO, Duarte T, Pacini ESA. New perspectives in signaling mediated by receptors coupled to stimulatory G protein: the emerging significance of cAMP efflux and extracellular cAMP-adenosine pathway. *Front Pharmacol* 2015;06. doi:10.3389/fphar.2015.00058.
- [70] Fleming FF, Yao L, Ravikumar PC, Funk L, Shook BC. Nitrile-Containing Pharmaceuticals: Efficacious Roles of the Nitrile Pharmacophore. *J Med Chem* 2010;53:7902–17. doi:10.1021/jm100762r.
- [71] Ohashi R, Watanabe R, Esaki T, Taniguchi T, Torimoto-Katori N, Watanabe T, et al. Development of Simplified in Vitro P-Glycoprotein Substrate Assay and in Silico Prediction Models To Evaluate Transport Potential of P-Glycoprotein. *Mol Pharm* 2019;16:1851–63. doi:10.1021/acs.molpharmaceut.8b01143.
- [72] Kothari A, Hittelman WN, Chambers TC. Cell Cycle-Dependent Mechanisms Underlie Vincristine-Induced Death of Primary Acute Lymphoblastic Leukemia Cells. *Cancer Res* 2016;76:3553–61. doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-2104.
- [73] Chen Y, Liang Y, Luo X, Hu Q. Oxidative resistance of leukemic stem cells and oxidative damage to hematopoietic stem cells under pro-oxidative therapy. *Cell Death Dis* 2020;11:291. doi:10.1038/s41419-020-2488-y.
- [74] Copsel S, Bruzzone A, May M, Beyrath J, Wargon V, Cany J, et al. Multidrug resistance protein 4/ ATP binding cassette transporter 4: a new potential therapeutic target for acute myeloid leukemia. *Oncotarget* 2014;5:9308–21. doi:10.18632/oncotarget.2425.