



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



**CENTRO DE QUÍMICA DEL INSTITUTO DE CIENCIAS
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**

POSGRADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**“Reposicionamiento de fármacos como terapia
para el cáncer de mama triple negativo
mediante herramientas bioinformáticas.”**

TESIS

que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias Químicas
Área Bioquímica y Biología Molecular

Presenta:

L.B. Ilse Daniela Monroy Nicolás

Directores de Tesis:

Dra. Irma Herrera Camacho. ICUAP-BUAP.

Dra. Maricruz Anaya Ruiz. CIBIOR-IMSS.

Puebla, Pue.

Diciembre 2021



BUAP

A QUIEN CORRESPONDA:

Por este conducto la Comisión Revisora formada por la Dra. Lourdes Millán Pérez Peña, Dra. Verónica Vallejo Ruiz, Dr. Gerardo Santos López y la Dra. Paulina Cortés Hernández, informan haber leído y aprobado para su impresión, la tesis denominada **“Reposicionamiento de fármacos como terapia para el cáncer de mama triple negativo mediante herramientas bioinformáticas”**, que presenta la alumna **Ilse Daniela Monroy Nicolás** para obtener el grado de Maestra en Ciencias Químicas.

Se extiende la presente a los ocho días del mes de noviembre del año dos mil veintiuno.

ATENTAMENTE

Dra. Lourdes Millán Pérez Peña

Dra. Verónica Vallejo Ruiz

Dr. Gerardo Santos López

Dra. Paulina Cortés Hernández

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Este trabajo fue realizado bajo la dirección de la Dra. Irma Herrera Camacho y la Dra. Maricruz Anaya Ruiz, adscritas al Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular del Centro de Química del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y al Laboratorio de Biología Celular del Centro de Investigación Biomédica de Oriente del Instituto Mexicano del Seguro Social, respectivamente.

El presente trabajo se realizó en colaboración del cDr. Alan Carrasco Carballo del Posgrado en Ciencias Químicas, área de Química Orgánica, BUAP, quien otorgó el acceso a la suite Schrödinger, apoyó y asesoró a lo largo de toda la tesis.

Como alumna del Posgrado en Ciencias Químicas de la BUAP, para la realización de este trabajo agradezco el apoyo en becas de:

- Beca CONACYT (num. registro: 818784-05456) de enero 2019 a diciembre 2020.
- Beca de término por parte de Proyecto VIEP clave: 100251855-VIEP2021 de la Vicerrectoría de investigación y Estudios de Posgrado de la BUAP. Nov-dic-2021.

AGRADECIMIENTOS

A la Dr. Irma Herrera Camacho y la Dra. Maricruz Anaya Ruíz por el apoyo, el conocimiento brindado y la paciencia que permitió el desarrollo de este trabajo de tesis.

A la comisión revisora, conformada por:

Dra. Lourdes Millán Pérez Peña,

Dra. Verónica Vallejo Ruíz,

Dra. Paulina Cortés Hernández,

Dr. Gerardo Santos López

Por sus consejos y apoyo para enriquecer este trabajo.

A Alan Carrasco C. por acompañarme, asesorarme y tenerme paciencia nuevamente en un trabajo de tesis.

A mi familia, amigos y todas aquellas personas que me acompañaron, apoyaron e hicieron que esta travesía fuera divertida y posible.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	I
ABREVIATURAS	III
LISTA DE FIGURAS	IV
LISTA DE TABLAS.....	V
LISTA DE GRÁFICAS	VI
RESUMEN	VII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Estadísticas del cáncer de mama.....	1
1.2 Clasificación del cáncer de mama (CM).....	2
1.3 Cáncer de mama triple negativo (CMTN)	4
1.4 Diagnóstico y terapia del cáncer de mama triple negativo	7
2. ANTECEDENTES.....	9
2.1 Subtipos moleculares del cáncer de mama triple negativo	9
2.2 Proteínas relacionadas al cáncer de mama triple negativo.....	11
2.2.1 Receptor de andrógenos (AR).....	12
2.2.2 Receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR).....	13
2.2.3 Isoforma alfa de la subunidad catalítica de PI3K (p110 α)	14
2.2.4 Diana de rapamicina en células de mamífero (mTOR)	15
2.2.5 Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR)	16
2.2.6 Ligando 1 de muerte programada (PD-L1).....	17
2.3 Reposicionamiento de fármacos	19
2.4 Acoplamiento molecular.....	21
3 JUSTIFICACIÓN	23
4 HIPÓTESIS	23
5 OBJETIVOS	24
General	24
Específicos	24
6 METODOLOGÍA.....	25
7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
7.1 Primera etapa.....	31

7.1.1	Selección de proteínas para el estudio por subtipo de CMTN.....	31
7.1.2	Selección de inhibidores control.....	33
7.1.3	Selección de base de datos de fármacos para reposicionar.....	36
7.2	Segunda etapa.....	36
7.2.1	Preparación de proteínas	36
7.2.2	Preparación de inhibidores y fármacos.....	37
7.2.3	Criterios que considerar para la selección de fármacos a reposicionar ...	38
7.2.4	<i>Docking molecular</i>	39
7.3	Tercera etapa.....	62
7.3.1	Estudios monoproteína para filtrar fármacos	63
7.3.2	Estudios multiproteína	72
8	CONCLUSIONES	81
9	PERSPECTIVAS DEL TRABAJO	82
10	BIBLIOGRAFÍA	83
11	ANEXOS	90
	Anexo 1.....	90
	Anexo 2.....	96

ABREVIATURAS

AR	Receptor de Andr6genos
BACE1	β -secretasa
BL	Basal-Like
BL1	Basal like 1
BL2	Basal like 2
CLG	Criterios de Lipinski y Ghose
CM	C6ncer de Mama
CMTN	C6ncer de Mama Triple Negativo
COX2	Prote6na Prostaglandina-endoper6xido Sintasa 2
DB	Drug Bank
DHT	Dihidrotestosterona
DILI	Drug Induced Liver Injury
EA	Energ6a de acoplamiento
EGFR	Receptor del Factor de Crecimiento Epid6rmico
ER	Receptor de Estr6geno
ERK	Quinasa Activada por Mit6geno
FDA	Food and Drug Administration
FGFR	Receptor del Factor de Crecimiento Fibrobl6stico
GGG	Grid Gride Generation
HER-2	Factor de Crecimiento Epid6rmico Humano 2
IM	Clase Inmunomoduladora
LAR	Luminal al Receptor de Andr6genos
LE	Ligando End6geno
M	Clase Mesenquimal
MAFK	Familia de Oncogenes de la Prote6na K
MAO	Monoamino Oxidasa
MAPK	Serina/treonina Quinasas Activadas por Mit6geno
MSL	C6lulas Troncales Mesenquimales
mTOR	Diana de Rapamicina en C6lulas de Mam6fero
NMDA	N-metil-D-aspartato
p110a	Isoforma Alfa de la Subunidad Catal6tica de PI3K
PARP	Poli ADP Ribosa Polimerasa
PD-1	Prote6na de Muerte Celular Programada 1
PDB	Protein Data Bank
PDGFR	Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas
pdh	Puente de hidr6geno
PD-L1	Ligando 1 de Muerte Programada
PI3K	Fosfoinositol 3-quinasa
PR	Receptor de Progesterona
Src	Tirosina-quinasa Protooncog6nica Src
TGF- β	Factor de Crecimiento Transformante Beta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Incidencia del cáncer de mama a nivel mundial y en México.	1
Figura 2. Progresión del cáncer de mama.	2
Figura 3. Ruta canónica y no canónica de TGF- β en el CM.	4
Figura 4. Progresión del cáncer de mama triple negativo, genes y proteínas implicados.	5
Figura 5. Efectos de la inhibición de PARP en respuesta al daño del ADN.	10
Figura 6. Ejemplos de compuestos para terapia a base de taxanos (docetaxel) y antraciclinas (epirubicin).	11
Figura 7. Rutas de señalización de AR en los distintos tipos de CM.	12
Figura 8. Ruta de señalización EGFR en CM.	14
Figura 9. Ruta y funciones de PI3K en CMTN.	15
Figura 10. Ruta PI3K/AKT/mTOR.	16
Figura 11. Ruta de señalización de PDGFR.	17
Figura 12. Participación de PD-1/PD-L1 en el microambiente tumoral.	18
Figura 13. Estructura del ácido acetilsalicílico.	19
Figura 14. Estructura de la talidomida.	20
Figura 15. Estructura cristalizada de AR (ocre) y estructura proteica minimizada (colores). .	37
Figura 16. Cambios conformacionales de masitinib y sus EA con PDGFR.	37
Figura 17. Cristal del Receptor de Andrógeno (AR) del PDB 2PIQ y determinación de sitios de unión.	39
Figura 18. Representación 2D del inhibidor RB1 con los residuos de AR.	40
Figura 19. Representación 2D de los ligandos endógenos de AR.	45
Figura 20. Total de fármacos que aparentemente interactúan con AR.	47
Figura 21. Representación 3D y 2D del acoplamiento entre EGFR y sus inhibidores.	49
Figura 22. Representación 3D y 2D del acoplamiento entre p110 α y sus inhibidores.	52
Figura 23. Representación 3D y 2D del acoplamiento entre mTOR y sus inhibidores.	54
Figura 24. Representación 3D y 2D del acoplamiento entre PDGFR y sus inhibidores.	57
Figura 25. Representación 3D y 2D del acoplamiento entre PD-L1 y sus inhibidores.	60
Figura 26. Estructura química de bumadizona y tolnaftato interactuando con la proteína EGFR.	63
Figura 27. Estructura química de enzalutamida, filgotinib y guanabenz interactuando con p110 α	64
Figura 28. Estructura química de artesunato y su interacción con PDGFR.	66
Figura 29. Estructura química de risperidona y sacubitril interactuando con PD-L1.	67
Figura 30. Fármacos candidatos para AR.	69
Figura 31. Candidatos de la proteína mTOR.	71
Figura 32. Teoría de conjuntos de interacciones de fármacos con AR y EGFR.	72
Figura 33. Fármacos candidatos para el conjunto 1 (EGFR y AR).	73
Figura 34. Teoría de conjuntos de interacciones de fármacos con EGFR, p110 α y mTOR.	75
Figura 35. Candidatos para el conjunto 2 (EGFR, p110 α y mTOR).	76

LISTA DE TABLAS

<i>Tabla 1. Subtipos de cáncer de mama.</i>	3
<i>Tabla 2. Subtipos moleculares de CMTN.</i>	6
<i>Tabla 3. Terapias convencionales para el tratamiento del CMTN.</i>	7
<i>Tabla 4. Información cristalográfica de las proteínas seleccionadas.</i>	26
<i>Tabla 5. Información de los inhibidores seleccionados.</i>	26
<i>Tabla 6. Energía de acoplamiento de la proteína con cada inhibidor.</i>	29
<i>Tabla 7. Criterios de Lipinski y Ghose, combinación utilizada para el estudio (CLG).</i>	30
<i>Tabla 8. Principales alteraciones en genes y proteínas involucrados en el CMTN.</i>	32
<i>Tabla 9. Proteínas seleccionadas por subtipo de CMTN.</i>	34
<i>Tabla 10. Inhibidores control por proteína de estudio.</i>	35
<i>Tabla 11. Energías de acoplamiento del AR con ligandos e inhibidor control.</i>	44
<i>Tabla 12. Interacciones que presentan los ligandos endógenos y flutamida con los residuos del AR.</i>	46
<i>Tabla 13. Residuos de interacción de EGFR con los inhibidores.</i>	48
<i>Tabla 14. Interacciones de p110α con los inhibidores.</i>	51
<i>Tabla 15. Interacciones de mTOR con los inhibidores.</i>	55
<i>Tabla 16. Interacciones de PDGFR con inhibidores.</i>	58
<i>Tabla 17. Interacciones entre la proteína PD-L1 y los inhibidores.</i>	60
<i>Tabla 18. Resumen de interacciones proteína-fármaco y número final de fármacos candidatos en la segunda etapa</i>	62
<i>Tabla 19. Información clínica de los fármacos candidatos para EGFR.</i>	64
<i>Tabla 20. Información clínica de los candidatos para p110α.</i>	65
<i>Tabla 21. Información clínica del candidato para PDGFR.</i>	66
<i>Tabla 22. Información clínica de los candidatos para PD-L1.</i>	68
<i>Tabla 23. Clasificación de candidatos para AR por padecimiento</i>	69
<i>Tabla 24. Clasificación de fármacos candidatos para mTOR por padecimiento.</i>	70
<i>Tabla 25. Clasificación de fármacos candidatos para EGFR y AR por padecimiento.</i>	74
<i>Tabla 26. Clasificación de candidatos para EGFR, p110α y mTOR por padecimiento.</i>	77
<i>Tabla 27. Fármacos monoproteína candidatos seleccionados por subtipo de CMTN.</i>	78
<i>Tabla 28. Fármacos multiproteína candidatos seleccionados por subtipo de CMTN.</i>	78
<i>Tabla 29. Fármacos candidatos totales clasificados por padecimiento y tipo de estudio.</i>	80

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Energía de acoplamiento del docking molecular AR-fármacos contra la masa de las 6,428 isoformas de los 2,678 fármacos del DB..	41
Gráfica 2. Energía de acoplamiento del docking molecular AR-fármacos contra LogP de las 6,428 isoformas de los 2,678 fármacos del DB..	41
Gráfica 3. Energía de acoplamiento del docking molecular AR-fármacos contra aceptores de puentes de hidrógeno de las 6,428 isoformas de los 2,678 fármacos del DB.....	42
Gráfica 4. Energía de acoplamiento del docking molecular AR-fármacos contra donadores de puentes de hidrógeno de las 6,428 isoformas de los 2,678 fármacos del DB.....	42
Gráfica 5. Energía de acoplamiento del docking molecular AR-fármacos contra refractividad molar de las 6,428 isoformas de los 2,678 fármacos del DB.....	43
Gráfica 6. Energía de acoplamiento del docking molecular AR-fármacos contra número de átomos de las 6,428 isoformas de los 2,678 fármacos del DB.....	43
Gráfica 7. Energía de acoplamiento del docking molecular AR-fármacos contra masa exacta aplicados los filtros de EA y CLG.	44
Gráfica 8. Energía de acoplamiento del docking molecular AR (sitio de unión del ligando endógeno)-fármacos contra la masa de las 6,428 isoformas de los 2,678 fármacos del DB.	46
Gráfica 9. Energía de acoplamiento del docking molecular AR (sitio de unión del ligando endógeno)-fármacos contra masa exacta aplicados los filtros de EA y CLG.	47
Gráfica 10. Energía de acoplamiento del docking molecular EGFR-fármacos contra la masa de las 6,428 isoformas de los 2,678 fármacos del DB.	50
Gráfica 11. Energía de acoplamiento del docking molecular EGFR-fármacos contra masa exacta aplicados los filtros de EA y CLG.	50
Gráfica 12. Energía de acoplamiento del docking molecular p110 α -fármacos contra la masa de las 6,428 isoformas de los 2,678 fármacos del DB.	53
Gráfica 13. Energía de acoplamiento del docking molecular p110 α -fármacos contra masa exacta aplicados los filtros de EA y CLG.	53
Gráfica 14. Energía de acoplamiento del docking molecular mTOR -fármacos contra la masa de las 6,428 isoformas de los 2,678 fármacos del DB.	55
Gráfica 15. Energía de acoplamiento del docking molecular mTOR-fármacos contra masa exacta aplicados los filtros de EA y CLG.	56
Gráfica 16. Energía de acoplamiento del docking molecular PDGFR -fármacos contra la masa de las 6,428 isoformas de los 2,678 fármacos del DB.	58
Gráfica 17. Energía de acoplamiento del docking molecular PDGFR-fármacos contra masa exacta aplicados los filtros de EA y CLG.	59
Gráfica 18. Energía de acoplamiento del docking molecular PD-L1-fármacos contra la masa de las 6,428 isoformas de los 2,678 fármacos del DB.	61
Gráfica 19. Energía de acoplamiento del docking molecular PD-L1-fármacos contra masa exacta aplicados los filtros de EA y CLG.	61

RESUMEN

El cáncer de mama tiene una alta incidencia en México, especialmente el cáncer de mama triple negativo (CMTN), el cual se ha clasificado en 6 subtipos moleculares: BL1, BL2, M, MSL, IM y LAR de acuerdo con las proteínas que se encuentran desreguladas. El CMTN no cuenta con terapia dirigida, por lo que es importante la búsqueda de terapias alternativas dirigidas a cada subtipo de CMTN que brinden a la paciente mejores resultados que los observados con los tratamientos actuales. En el presente trabajo, mediante el reposicionamiento de fármacos con herramientas *in silico* y búsquedas de estudios clínicos, se proponen nuevos candidatos para el tratamiento del CMTN que actúen sobre proteínas específicas para cada subtipo.

Primero realizamos la selección y preparación de 6 proteínas: AR, EGFR, mTOR, p110 α , PDGFR, PD-L1, los inhibidores control (15) de cada una de ellas, 2 ligandos endógenos de la AR y para reposicionar se utilizó la base de datos DrugBank, conformada por 2,678 fármacos aprobados por la FDA. Se utilizó la suite Schrödinger con sus distintos módulos, minimizando energías, se establecieron condiciones fisiológicas pH 7.4 y 36.5 °C, y flexibilidad al sitio de unión de las proteínas, los inhibidores y fármacos para realizar el acoplamiento (*docking*) molecular. Se utilizaron filtros para la selección de los candidatos: energía de acoplamiento (EA), los criterios de Lipinski y Ghose (CLG), enfoque mono o multiproteína y finalmente información clínica de uso de los fármacos.

Una vez realizado el *docking* molecular, proteína-inhibidores y proteína-fármacos, el primer filtro fue seleccionar los fármacos que tuvieran una energía de acoplamiento igual o más favorable que los inhibidores control, el segundo filtro fue que cumplieran con los seis CLG (peso molecular ≤ 500 g/mol, logP -0.5-5.6, aceptores de pdh ≤ 10 , donadores de pdh ≤ 5 , refractividad molar 40-130 y número de átomos 20-70). El tercer filtro fue el de fármacos candidatos monoproteína, es decir, que predice que actúan solo sobre una proteína y fármacos multiproteína, que se predice que actúan solo en 2 (AR y EGFR) o 3 proteínas (EGFR, p110 α , mTOR). Como último filtro se utilizaron las bases de datos DrugBank, PubChem, Sider 4.1 y Drugs.com para recopilar la información clínica de cada uno de los fármacos candidatos: uso / tratamiento (actual), toxicidad, lesión hepática inducida por fármacos (DILI, por sus siglas en inglés), efectos adversos, contraindicaciones, formulación y mecanismo de acción. Aquellos que tuvieran toxicidad, efectos adversos graves, contraindicaciones relevantes o un grado de DILI superior a C, fueron descartados del estudio.

De los 2,678 fármacos de inicio, al final del estudio se obtuvieron 78 fármacos candidatos para proseguir el estudio de reposicionamiento contra CMTN, de los cuales 63 fármacos actúan de forma exclusiva con una sola proteína de estudio de cada subtipo de CMTN, 8 fármacos contra 2 proteínas (EGFR, AR) y 7 fármacos contra 3 proteínas (EGFR, mTOR, p110 α). Estos 78 fármacos para reposicionar contra el CMTN han sido aprobados por la FDA y actualmente se utilizan para una amplia gama de padecimientos lo que implica que son seguros, siendo buenos candidatos para futuros estudios *in vitro* e *in vivo* en CMTN y confirmar si es posible utilizarlos para el tratamiento en pacientes.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Estadísticas del cáncer de mama

El cáncer es una enfermedad de tipo multifactorial. Las principales causas son la exposición a sustancias químicas, el ambiente, organismos patógenos, radiaciones y los factores genéticos del individuo, los cuales ocasionan alteraciones de tipo metabólico, genético o epigenético que desembocan en el desarrollo de la enfermedad [1].

Uno de los tipos de cáncer con mayor incidencia en México y en el mundo es el cáncer de mama (CM); ocupa el primer lugar en ambos casos (Figura 1). En nuestro país, aunque existen diversos métodos de diagnóstico y terapias dirigidas, el porcentaje de mortalidad es alrededor del 8.8% del total de los casos reportados en 2020 [2], [3].

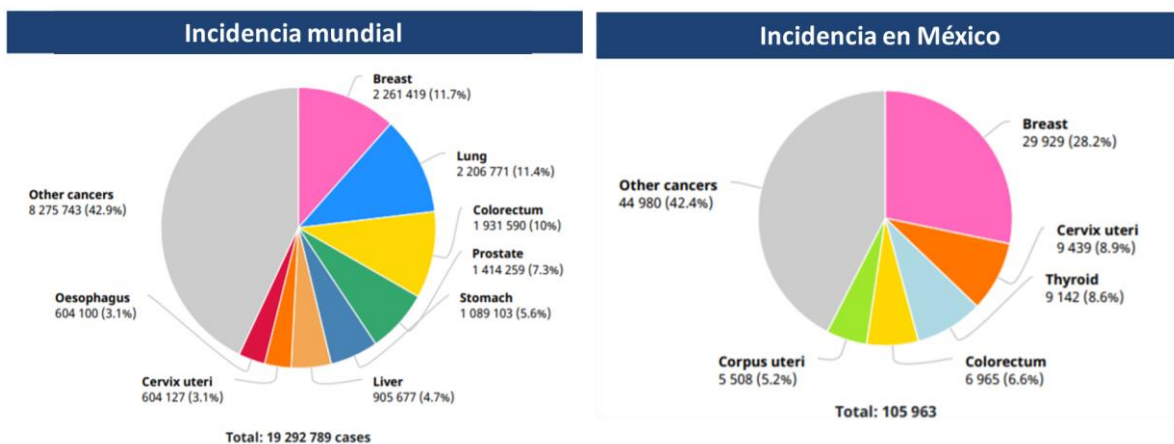


Figura 1. Incidencia del cáncer de mama a nivel mundial (lado izquierdo) y en México (lado derecho), reportes 2020. Tomada de [2], [3].

Aunque existen métodos de detección inmunohistoquímicos y terapias como la cirugía y quimioterapia aún falta información para entender el mecanismo y patogénesis del cáncer de mama [4], por lo cual es esencial ahondar en las clasificaciones con las que se cuenta con la finalidad de desarrollar nuevos métodos de detección o terapia que posean una mayor eficacia que los encontrados en el mercado.

1.2 Clasificación del cáncer de mama (CM)

El CM se clasifica según su origen en dos grandes grupos: **carcinomas** desarrollados en los componentes epiteliales de la mama (delimitan lóbulos y conductos) y **sarcomas** presentes en los miofibroblastos y vasos sanguíneos, siendo más común los del primer tipo. Los carcinomas se pueden subdividir acorde con la patología de éste en 3 tipos, como se observa en la Figura 2: **no invasivo o in situ** el cual se encuentra localizado en los ductos o lóbulos de la mama y en donde participan fibroblastos, leucocitos y miofibroblastos que empiezan a dañar la membrana basal. El tipo **invasivo** el cual se difunde fuera de los ductos o lóbulos de la mama ya que no hay membrana basal que impida su movilidad creciendo fuera del tejido estromal mamario, observándose en su mayoría la participación de células del epitelio luminal. Por último el tipo **metastásico** el cual se disemina a otros órganos del cuerpo considerándose una etapa avanzada y de mal pronóstico [4], [5].

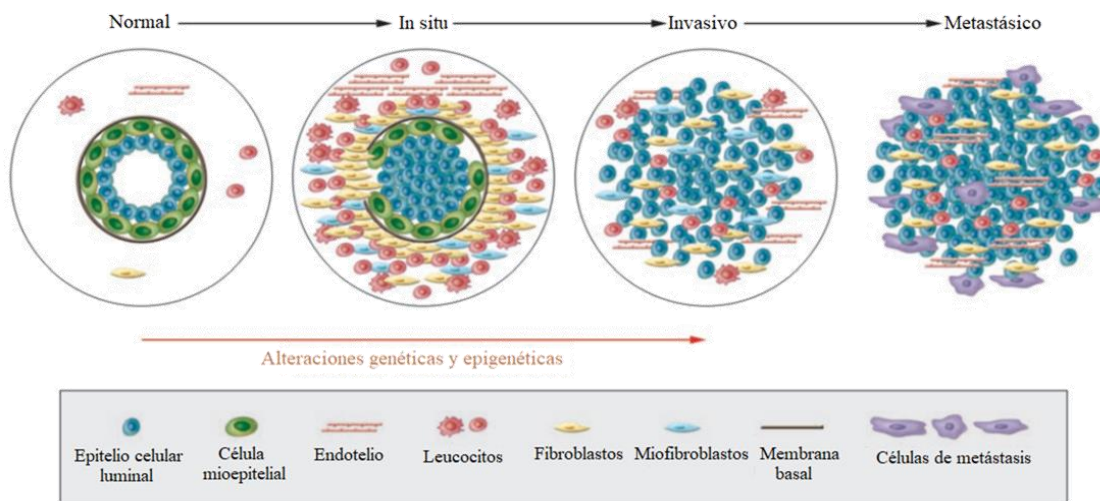


Figura 2. Progresión del cáncer de mama. Tomado y modificado de [5].

Así mismo, existe una clasificación molecular determinada por la sobreexpresión de los receptores de estrógenos (ER), progesterona (PR) y el factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER-2) y en algunos casos por la presencia de Ki67, (marcador de proliferación celular), todos ellos involucrados en el desarrollo y progresión del cáncer. Por lo anterior, se han establecido 5 subtipos de cáncer de mama y cuyas características se resumen en la Tabla 1, [4], [5].

Los subtipos *luminal A* y *B* cuentan con la sobreexpresión de los receptores hormonales ER y PR diferenciándose en la sobreexpresión de HER-2 que posee solamente el tipo B,

ambos son los de mayor incidencia y cuentan con terapia hormonal dirigida lo cual se correlaciona con un buen pronóstico para la paciente. Por otro lado, en el *subtipo HER-2* solo se sobreexpresa HER-2, con una incidencia del 5-15% y también posee una terapia dirigida de tipo anticuerpo monoclonal. El *subtipo similar a normal* podemos observar un patrón de expresión similar al observado en el luminal A, pero con una expresión baja de Ki67, su incidencia es rara, pero se cuenta con terapia hormonal dirigida para su tratamiento [5].

El *subtipo triple negativo* al no tener receptores sobreexpresados, no cuenta con terapia dirigida, aunado a su alta tasa metastásica, lo convierte en un cáncer de alto riesgo para la paciente debido a la rápida progresión de la enfermedad. Así mismo, hoy en día la quimioterapia es la primera opción de tratamiento contra este subtipo tanto en etapas tempranas y tardías, sin embargo, presenta efectos adversos y no refleja un beneficio en la supervivencia de las pacientes.

Tabla 1. Subtipos de cáncer de mama. Modificada de [5].

Subtipo	Patrón molecular	Incidencia y pronóstico	Tratamiento
Luminal A	ER+, PR±, HER2-	Más común ~70% Mejor pronóstico	Terapia hormonal Terapia dirigida
Luminal B	ER+, PR±, HER2+	10-20% Menor supervivencia que el luminal A	Terapia hormonal Terapia dirigida
HER 2	ER-, PR-, HER2+	5-15% Peor pronóstico que los luminales	Terapia dirigida
Triple negativo	ER-, PR-, HER2-	15-20% Mal pronóstico	Sin terapia dirigida
Similar a normal	ER+, PR±, HER2-, Ki67 bajo	Raro Peor pronóstico que el luminal A	Terapia hormonal Terapia dirigida

1.3 Cáncer de mama triple negativo (CMTN)

El CMTN es una neoplasia maligna caracterizada por la ausencia de la sobreexpresión de los ER, PR y HER-2, por lo que no cuenta con un método de detección temprano o terapia dirigida [5].

El CMTN se caracteriza por una progresión rápida debido a alteraciones en los niveles celular, tisular y metabólico, en donde las células cancerosas de tipo epitelial se remodelan a mesenquimales para lograr una invasión local mediante la remodelación del citoesqueleto. Después dichas células pasarán a torrente sanguíneo donde cascadas de señalización específicas, como la ruta del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), les permitirán la supervivencia en ese ambiente con la finalidad de lograr colonizar órganos distantes como huesos, pulmones y cerebro, este último paso se conoce como metástasis [6].

En la Figura 3 se representan las rutas canónica y no canónica de TGF- β en el CM. Para el desarrollo de nuevos inhibidores de esta ruta se plantea la interacción dirigida sobre los receptores de TGF- β para impedir su fosforilación y por ende la activación de las proteínas SMAD-2 y -3 y rutas relacionadas con el desarrollo de procesos que favorezcan el mantenimiento de células malignas. Dicha inhibición en la ruta canónica impedirá la transcripción de genes regulados por SMAD y del lado no canónico el desarrollo de rutas relacionadas con la supervivencia celular y los procesos inflamatorios en el CM [7].

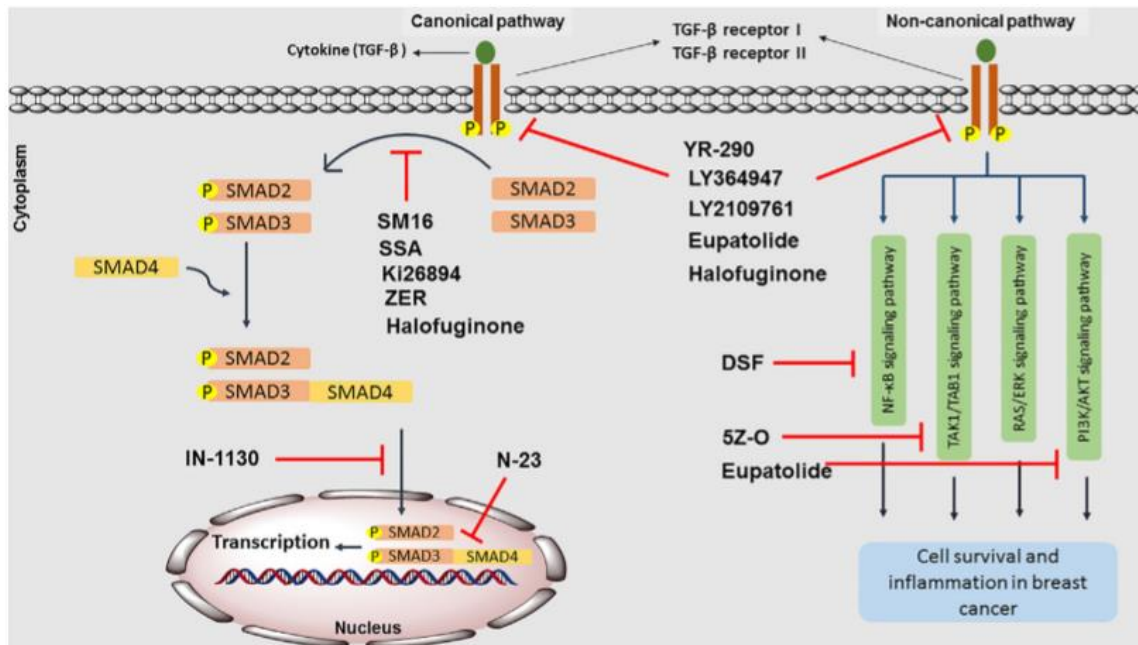
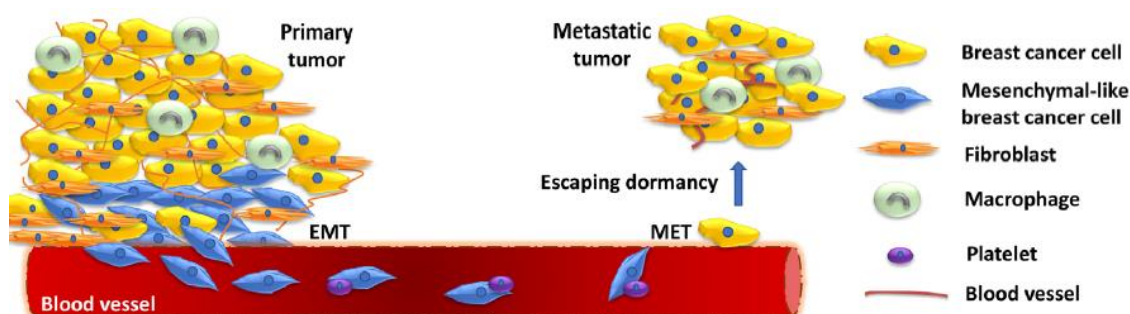


Figura 3. Ruta canónica y no canónica de TGF-B en el CM. Tomada de [7].

En la Figura 4 se esquematiza cómo se llevan a cabo los procesos de invasión, migración y metástasis; en los que se muestran los genes o proteínas supresores (color verde) y promotores (color rojo) de metástasis que juegan un papel clave en cada uno de ellos. En el caso de la invasión y extravasación (Figura 4) observamos la participación de la proteína TGF- β que promueve la sobreexpresión de la familia de oncogenes de la proteína K (MAFK) la cual induce la formación e invasión del tumor *in vivo*. Por otro lado podemos observar como el gen *EREG*, y la proteína prostaglandina-endoperoxido sintasa 2 (COX2) permiten la extravasación, proceso que ayudará a las células tumorales a colonizar otros órganos, dichos genes y proteínas identificados se podrían utilizar como posibles blancos para terapia [6].






Local invasion/ Intravasation	Survival in circulation	Extravasation	Metastatic colonization	Organ
ANGPTL2, CDCP1, COX2, CXCL12, CXCR4, EREG, FSCN, IRAK1, MAFK, MLK3, NOS, NOTCH1/2, OPN, PKCλ/i, PML, PTK6, RAD51, RAGE, RANKL, SLUG, SNAIL, SPRY1, TGFB1, TWIST, WAVE3, WNT1, ΔNp63, FOXF2, LIFR, TP63, RAB1B, SSBP1, TXNIP	TRKB, VCAM1	ANGPTL2, ANGPTL4, CDCP1, COX2, CXCL12, CXCR4, EREG, FSCN, IRAK1, IL13Rα2, MAFK, MLK3, NOS, NOTCH1/2, PKCλ/i, PML, RAD51, RAGE, RANKL, ST6GALNAC5, TGFB1, WAVE3, WNT1, ΔNp63, FOXF2, LIFR, TP63, RAB1B, SHARP1, SSBP1, TIEG1, TXNIP	LDH, PCDH7, CX43, SERPINS	
			CDCP1, CXCL1/2, CYR61, FGFR, ID1, ID3, MYOF, POSTN, RAGE, S100A7, TGFB1, TNC, VCAM1, WNT1, LIFR, SDPR, TXNIP	
			ANGPTL2, CSF2, LPA, PTHrP, RANKL, TGFB1, VCAM, WNT1	

Figura 4. Progresión del cáncer de mama triple negativo, genes y proteínas implicados. Rojo: promotores de metástasis, verde: supresores de metástasis. Tomada de [6].

En 2011, Lehmann y cols., realizaron un análisis de los perfiles de expresión molecular de grupos de datos de pacientes con cáncer de mama, identificaron los casos de CMTN y los clasificaron en 6 grupos distintos como se observa en la Tabla 2. Cada uno de estos subtipos se relaciona con procesos específicos; por ejemplo, en BL1 y 2 observamos rutas involucradas con la proliferación y crecimiento celular principalmente. Por otro lado, para M y MSL existen rutas que ayudan a los procesos de diferenciación migración y crecimiento celular. Para IM se relacionan procesos de tipo inmunológico que ayudan a las células malignas a evadir el sistema inmune y para LAR los principales procesos involucran la síntesis de esteroides en particular andrógenos y estrógenos. Una de las principales ventajas de esta clasificación es que abarca diversos procesos involucrado en el desarrollo del CMTN, lo que permite estudiar desde aspectos de crecimiento y desarrollo celular hasta procesos relacionados con el sistema inmune [8].

Tabla 2. Subtipos moleculares de CMTN. Modificado de [8].

Subtipos	Procesos involucrados
BL1 (Tipo basal 1, <i>basal like 1</i>)	Proliferación celular y reparación del ADN.
BL2 (Tipo basal 2, <i>basal like 2</i>)	Señalización de rutas del factor de crecimiento (EGF, MET, NGF), glicolisis, gluconeogénesis y factores de expresión mioepiteliales.
IM (Clase inmunomoduladora)	Procesos inmunológicos y cascadas (TH1/TH2, células NK, receptor células N).
M (Clase mesenquimal)	Diferenciación celular, migración, crecimiento y procesos de la matriz extracelular.
MSL (Células troncales mesenquimales)	Similar a la expresión de M y células troncales mesenquimales.
LAR (Luminal al receptor de andrógenos)	Incremento en la expresión del AR y síntesis de esteroides, andrógenos/estrógenos
UNS	Inestable

El CMTN representa entre 15-20% del total de casos de CM reportados. Los factores de riesgo relacionados han sido ampliamente estudiados, Phipps y cols., demostraron que mujeres con un mayor número de hijos tiene mayor riesgo (1.4 veces más) de desarrollar CMTN [9]. Otros factores, como la lactancia, un alto índice de masa corporal (IMC) y los síndromes metabólicos están asociados con este subtipo de cáncer, lo cual es de relevancia en México debido a la alta prevalencia de obesidad y síndromes metabólicos en nuestra población [10].

En México existen pocos reportes relacionados con pacientes con CMTN, por ejemplo; un estudio realizado en el Hospital Ángeles del Pedregal, en la Ciudad de México reportó

la alta incidencia del CMTN, presentándose en un 17% de los casos totales de cáncer de mama, con una edad promedio de 45 años y en estadio avanzado, lo cual corrobora el mal pronóstico y la rápida diseminación de este cáncer [11].

1.4 Diagnóstico y terapia del cáncer de mama triple negativo

Los métodos de pronóstico como Oncotype DX o MammaPrint solo clasifican a los cánceres de tipo luminal o asociados con el factor HER2. Para el CMTN no se cuenta con un método de pronóstico, dado que los métodos mencionados anteriormente solo detectan genes implicados en los otros subtipos, por lo anterior, en el subtipo triple negativo el progreso de la enfermedad es inminente [12].

El tratamiento convencional para el CMTN se elige acorde con la etapa de la enfermedad que presente la paciente, en tanto no haya una terapia dirigida para este subtipo de CM, se eligen terapias convencionales. Por ejemplo, un tratamiento neoadyuvante en etapas tempranas o tardías en donde se administran antraciclinas, taxanos y ciclofosfamidias, así mismo para las pacientes con mutaciones *BRCA* se administran compuestos basados en platino o anticuerpos. Por otro lado, la terapia adyuvante, utilizada después de una intervención quirúrgica se basa en el uso de antraciclinas y taxanos. Aunado a estas terapias los métodos quirúrgicos y de radioterapia se utilizan en conjunto para el tratamiento de las pacientes (Tabla 3) [13].

Tabla 3. Terapias convencionales para el tratamiento del CMTN. Modificado de [12].

Tratamiento Convencional	Fármacos	Mecanismo	Ref
Tratamiento Neoadyuvante, CMTN temprano, tardío o metastásico	Antraciclinas y taxanos	Inhibición de la síntesis de ADN y ARN. Estabilización de microtúbulos.	[14]
	Capecitabine y taxano		
	Monoterapia con ixabepilone		
	Ixabepilone y capecitabine		
Nuevos agentes neoadyuvantes (mutaciones BRCA)	Compuestos basados en platino (carboplatino) bevacizumab, nab-paclitaxel	Citotóxico e inmunoterapia VEGF	[15]
Agentes adyuvantes	Antraciclinas y taxanos	Citotóxico	[16]

Como podemos observar aún faltan estudios para poder dilucidar la participación de diversas proteínas y genes involucrados en el desarrollo del CMTN. Para el desarrollo de nuevas opciones de detección o terapias dirigidas eficaces que beneficien a las pacientes. La utilización de herramientas bioinformáticas para el estudio de nuevos blancos terapéuticos resulta de interés con el propósito de predecir actividades biológicas de moléculas o fármacos de interés para una posterior aplicación experimental.

2. ANTECEDENTES

2.1 Subtipos moleculares del cáncer de mama triple negativo

Como se ha mencionado con anterioridad, en 2011 Lehman y cols., clasificaron 6 subtipos moleculares de CMTN acorde con los perfiles de expresión genética de grupos de datos de CM, donde identificaron 587 casos de CMTN. Se ha estudiado la relevancia de estos subtipos a lo largo de los años e incluso se han propuesto diversos tratamientos para las pacientes, como se explicará a continuación.

En 2015, Lehman y cols. plantearon la búsqueda de nuevos blancos de terapia para los distintos subtipos de CMTN, debido a que el tratamiento para dichas pacientes sigue siendo la quimioterapia, independientemente del estadio clínico temprano o tardío. La inhibición de poli-(ADP-ribosa)-polimerasa (PARP) se propone para el CMTN con mutaciones en *BRCA*, antiandrogénicos cuando existe sobreexpresión del receptor de andrógenos (AR), inhibición del receptor del factor de crecimiento fibroblástico (FGFR) y gamma-secretasas, entre otros [17].

En 2017, Hubalek y cols. propusieron otras opciones de terapia para los distintos subtipos de CMTN, empezando por los tipo basal (BL), para los cuales proponen el tratamiento de las mutaciones *BRCA1* y *2* mediante el uso de inhibidores para la enzima PARP involucrada en la reparación celular por daño al ácido desoxirribonucleico (ADN). En la Figura 5, podemos observar cómo en una respuesta temprana al daño del ADN la enzima es reclutada para reparar el daño de forma adecuada, pero al utilizar un inhibidor de PARP se busca la disociación del complejo y puede ocasionar otro tipo de proceso de reparación o la muerte celular por daño al ADN [18]. Para el subtipo LAR nuevamente proponen el uso de antiadrenérgicos y para el subtipo IM toman como blancos de terapia a la proteínas proteína de muerte celular programada 1 (PD-1) y el ligando 1 de muerte programada (PD-L1) [19].

En 2018, Chan y cols. discutieron los subtipos aplicables a la clínica acorde con las poblaciones de CMTN observadas, los cuales son: reparación del ADN, fenotipo inflamado, positivo al receptor de andrógenos, *PI3K*, *AKT*, *PTEN* alterados y expresión de antígenos única. Proponen el uso de inhibidores de PARP y compuestos platinados para la reparación de daños al ADN [20].

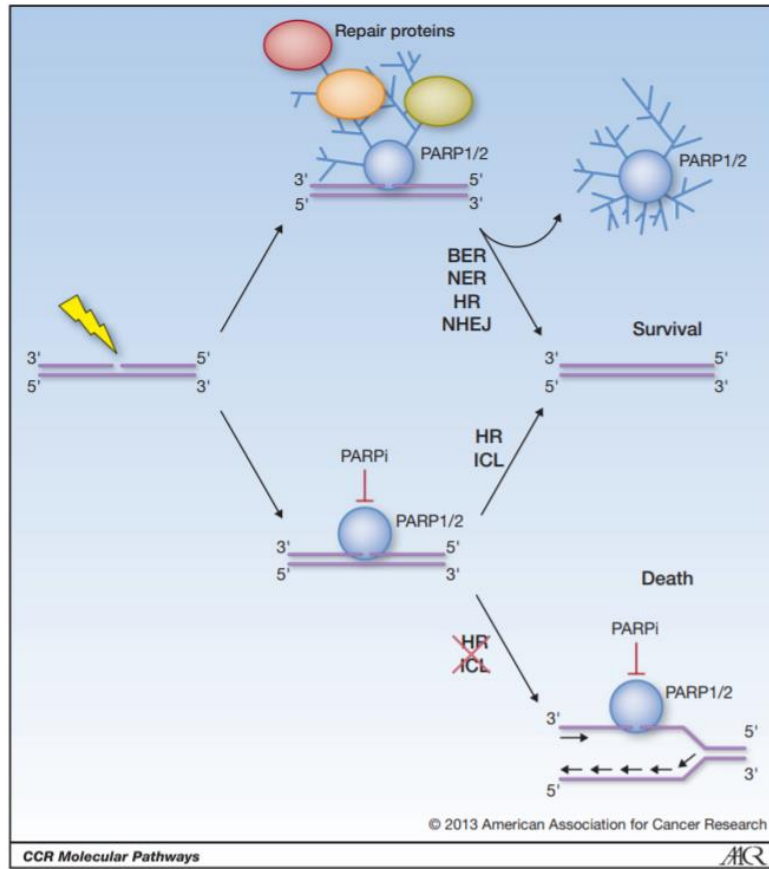


Figura 5. Efectos de la inhibición de PARP en respuesta al daño del ADN. Tomado de [18].

Por otro lado, ya existen estudios en pacientes con CMTN que evalúan la respuesta a determinadas terapias en los diferentes subtipos detectados, en 2013 Masuda y cols., realizaron un estudio acerca de la respuesta a quimioterapia neoadyuvante en los distintos subtipos de CMTN. Se tomaron 146 muestras frescas de pacientes y se identificaron los subtipos con ayuda de microarreglos de expresión, de estas muestras solo se tomaron aquellas que recibieron quimioterapia neoadyuvante de tipo taxanos, antraciclina (Figura 6) y radioterapia lo que redujo las muestras a 130. La respuesta más favorable a este tipo de terapia fue para el subtipo BL1 donde se observó ausencia de tejido invasivo en un 16.1% de las pacientes, por otro lado, no se observó una respuesta positiva para los subtipos BL2 y LAR [21].

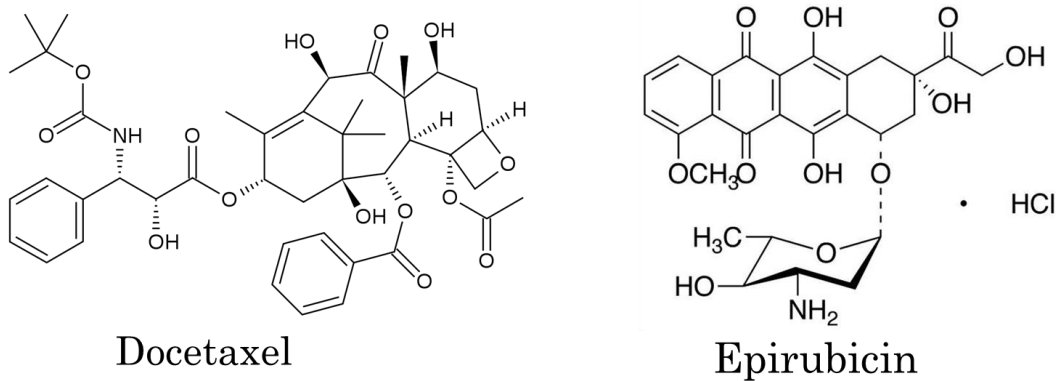


Figura 6. Ejemplos de compuestos para terapia a base de taxanos (docetaxel) y antraciclina (epirubicin)

En 2018 Santonja y cols., realizaron un estudio de respuesta a quimioterapia neoadyuvante para cada subtipo de CMTN, se tomaron 125 muestras de pacientes inmersas en parafina. Se realizó un estudio por microarreglos de expresión para determinar el subtipo al que correspondían, la quimioterapia con la que fueron tratadas fue de tipo antraciclina, taxanos y carboplatino. La mejor respuesta se observó en el subtipo BL1 donde en 47.1% de las muestras no se encontró tejido de tipo invasivo y la respuesta menos favorable se encontró en el subtipo LAR teniendo una respuesta positiva en solo 14.3% de las muestras [22].

Considerando lo antes planteado resulta de interés la búsqueda de nuevos blancos para terapia contra los distintos subgrupos moleculares de CMTN, ya que las terapias actuales (quimioterapia) no muestran resultados favorables para todos los subtipos, por lo que una terapia dirigida podría arrojar mejores resultados mejorando así el pronóstico de las pacientes.

2.2 Proteínas relacionadas al cáncer de mama triple negativo

Existen diversas proteínas relacionadas con el desarrollo, mantenimiento, migración y supervivencia del CMTN, de acuerdo con estudios de expresión genética se han identificado proteínas relacionadas con cada subtipo molecular de CMTN. Entre las que destacan: AR, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), isoforma alfa de la subunidad catalítica de PI3K (p110 α), diana de rapamicina en células de mamífero (mTOR), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR) y PD-L1 [23]. Cada una de ellas involucrada en procesos que ayudan al desarrollo de células tumorales como se explicará a continuación.

2.2.1 Receptor de andrógenos (AR)

Una de las proteínas implicadas en el CMTN es **AR**, un factor de transcripción activado por ligando (testosterona o dihidrotestosterona (DHT)). Se ha observado su expresión en 70% de los tumores primarios de CM y en todos sus estadios, está presente en 50% de los casos de CMTN y se relaciona a una menor respuesta a quimioterapia. El AR participa en procesos de diferenciación, proliferación, apoptosis y angiogénesis de células tumorales [24].

La ruta que sigue el AR ya ha sido descrita en distintos tipos de CM (Figura 7), para el CMTN se observa la participación de proteínas fosfoinositol 3-quinasa (PI3K), tirosina-quinasa protooncogénica Src (Src), serina/treonina quinasa activadas por mitógeno (MAPK) y quinasa activada por mitógeno (ERK). Por otro lado, la participación de DHT también es fundamental, siendo una buena propuesta de terapia la inhibición del AR. Para el subtipo HER-2 solo se observa la participación de DHT que permite el ingreso del AR al núcleo y la posterior transcripción de genes involucrados en el desarrollo celular, por último en el subtipo ER+ se muestra que la unión del AR y ER es necesaria para comenzar con la transcripción de genes involucrados en la ruta [24].

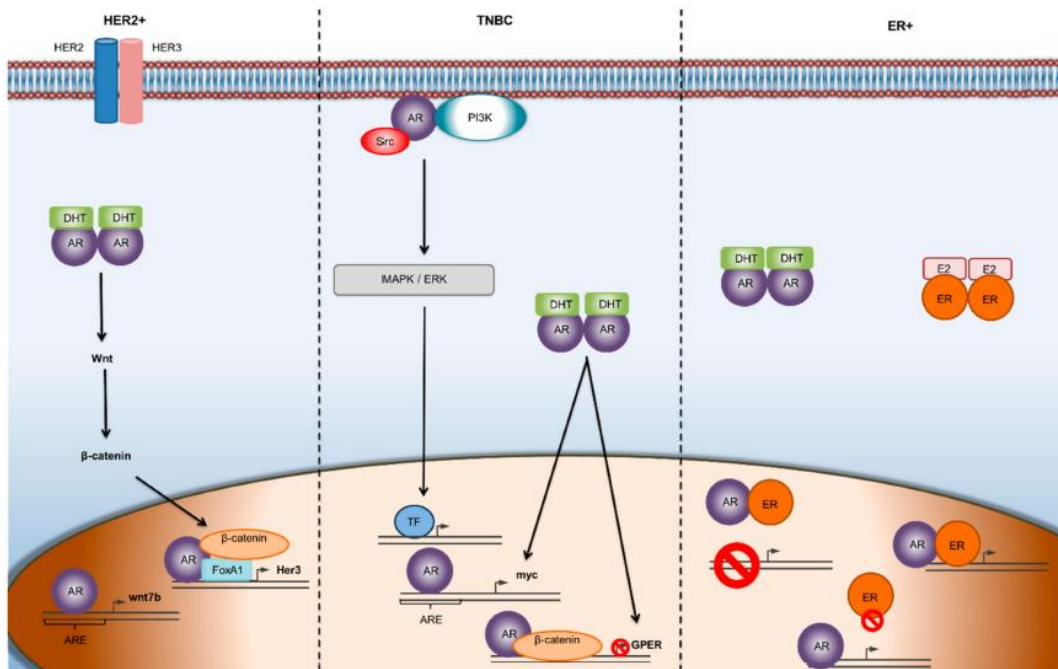


Figura 7. Rutas de señalización de AR en los distintos tipos de CM. Tomada de [24].

DHT: dihidrotestosterona, AR: receptor de andrógenos, PI3K: fosfoinositol 3-quinasa, Src: tirosina-quinasa protooncogénica Src, MAPK: serina-treonina quinasa activada por mitógeno, ERK: quinasa activada por mitógeno.

Se han reportado inhibidores del AR tanto en estudios clínicos como comerciales, por ejemplo, bicalutamida es una molécula que ha sido estudiada para el tratamiento de CMTN metastásico, pero aún sigue en estudios clínicos fase 2. Por otro lado, el acetato de abiraterona (AB) también se está probando para el tratamiento de CMTN metastásico o avanzado y se ha observado una tasa clínica benéfica en los estudios clínicos en fase 2 [24].

Aunque ya existen inhibidores del AR en el mercado se han observado efectos secundarios en pacientes, por ejemplo, el AC que ha sido utilizado en el tratamiento de cáncer de próstata provoca hepatotoxicidad en los pacientes. Por otro lado, enzalutamida, un agonista del AR ha provocado hipertensión y convulsiones en pacientes [25].

2.2.2 Receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)

EGFR es una familia de 4 tirosina-quinatas transmembranales (EGFR1/ErbB1, Her2/ErbB2, Her3/ErbB3 y Her4/ErbB4) relacionadas con 13 ligandos polipeptídicos. Se ha observado su sobreexpresión en diversos tipos de tumores: mama, páncreas, cabeza y cuello, próstata, ovario, entre otros. Dicha sobreexpresión está implicada en procesos de crecimiento, diferenciación y progresión celular, angiogénesis y apoptosis [26].

En CM, la proteína EGFR está expresada en 70% de los casos de CMTN y está implicada en procesos de regulación de proliferación celular, diferenciación, migración y supervivencia (Figura 8) [26].

Como se observa en la Figura 8, existen muchas proteínas implicadas en la ruta de señalización de EGFR, una propuesta para frenar los procesos celulares que favorecen la sobrevivencia de las células tumorales es impedir la dimerización de EGFR para que la cascada de señalización no pueda avanzar. Podemos observar la participación de proteínas MEK, ERK, Ras, transductor de señal y activador de la transcripción (STAT), quinasa Janus (JAK) y Src, todas ellas se activan por la fosforilación de EGFR y desencadenan rutas relacionadas a la proliferación y mantenimiento de células malignas [26].

Actualmente existen inhibidores de EGFR, entre ellos anticuerpos monoclonales y moléculas pequeñas. El problema en el primer caso es el tamaño de los anticuerpos, dado que no penetran en el tejido debidamente por lo que las dosis son altas y por ende eleva los costos. Por otro lado, en el segundo caso, han tenido una eficiencia clínica baja y se ha observado el desarrollo de efectos secundarios por su ingesta [26].

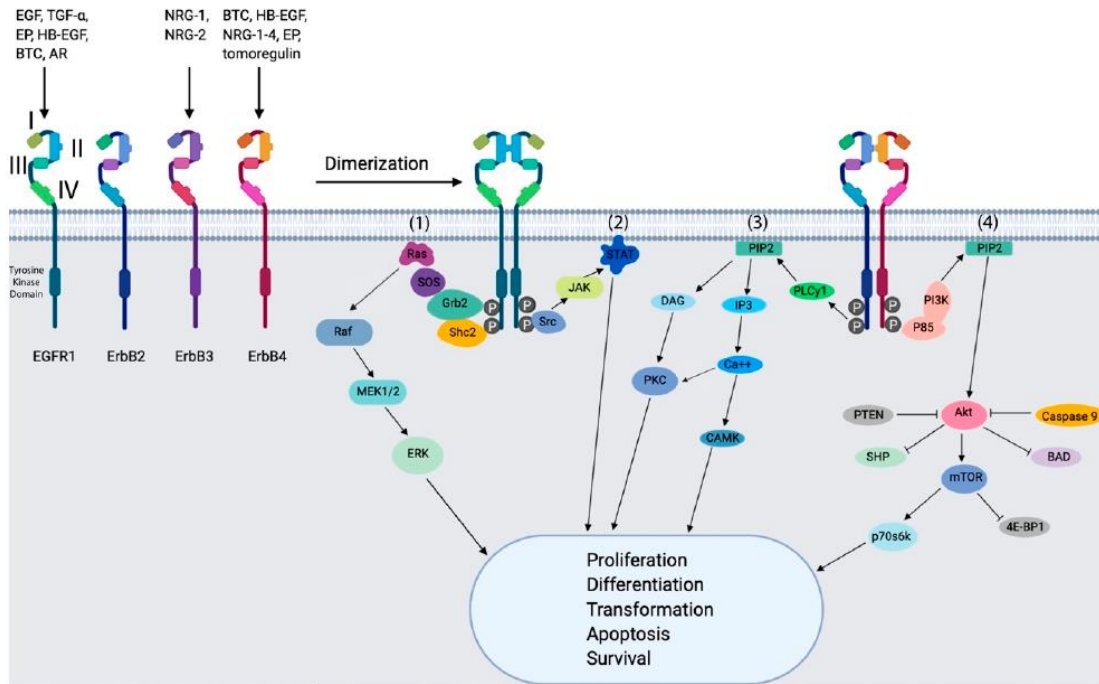


Figura 8. Ruta de señalización EGFR en CM. Tomada de [26]. EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico, STAT: transductor de señal y activador de la transcripción, JAK: quinasa Janus.

2.2.3 Isoforma alfa de la subunidad catalítica de PI3K (p110 α)

P110 α forma parte de un heterodímero junto con la proteína p85, el cual regula la función de la fosfoinositol-3 quinasa (PI3K), una enzima de señalización encargada de fosforilar el hidroxilo 3 libre de los fosfoinosítidos en la membrana celular, lo que permite el desarrollo de procesos como la regulación del ciclo celular y supervivencia [27].

Las mutaciones de p110 α en PI3K son de las más frecuentes siendo la segunda aberración más común en el CMTN; promueve la fosforilación y activa rutas relacionadas con procesos de crecimiento celular. En la Figura 9, se puede observar cómo PI3K mediante procesos de fosforilación activa a la proteína AKT y desencadena procesos involucrados en la proliferación, crecimiento y supervivencia de células tumorales. Por otro lado la desregulación de PTEN impide la correcta supresión tumoral para permitir el desarrollo de la enfermedad [27], cada una de estas proteínas se convierte en un buen blanco para terapia contra el CMTN.

En la actualidad existen inhibidores de PI3K, pero se ha observado que las pacientes no se benefician con este tipo de terapia, se propone la inhibición de p110 α como alternativa [27], es por eso que resulta de interés la inhibición de esta subunidad catalítica con el propósito de proponer una terapia efectiva contra el CMTN.

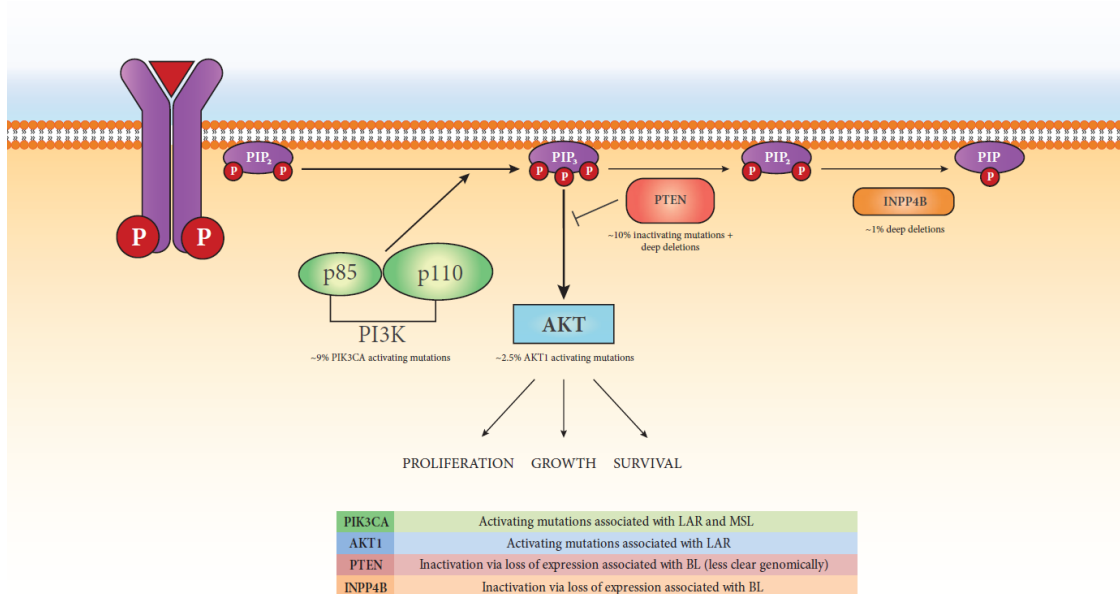


Figura 9. Ruta y funciones de PI3K en CMTN. Tomada de [27]. PTEN: fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa, AKT: proteína quinasa B, PI3K: fosfoinositol 3-quinasa.

2.2.4 Diana de rapamicina en células de mamífero (mTOR)

La proteína **mTOR** es una serina/treonina quinasa que controla la transcripción, traducción y autofagia mediante la regulación positiva de factores de crecimiento, metabolismo y supervivencia [28].

Se ha observado una sobreexpresión de mTOR en el CMTN que se ha correlacionado con un mal pronóstico y está involucrada en procesos como transcripción, traducción, autofagia y supervivencia. En la Figura 10, se observa la activación de la ruta ya sea por la fosforilación de HER2 o EGFR, esto permite la acción de las proteínas PI3K, AKT y mTOR. Para el primer caso y de RAS y MEK que permiten la transcripción para la generación de los procesos antes mencionados los cuales ayudan al mantenimiento de las células malignas [29].

Se ha observado el desarrollo de resistencia a inhibidores de mTOR en pacientes con CMTN y aunque actualmente existen inhibidores para mTOR muchas de estas moléculas aún están en fases clínicas para comprobar su acción en CMTN. Además se ha observado que no se unen específicamente a mTOR sino que participan en la inhibición de las subunidades de PI3K y AKT [29]. Resulta de interés la búsqueda de nuevas terapias que ayuden a frenar procesos que favorezcan el desarrollo y mantenimiento de células malignas.

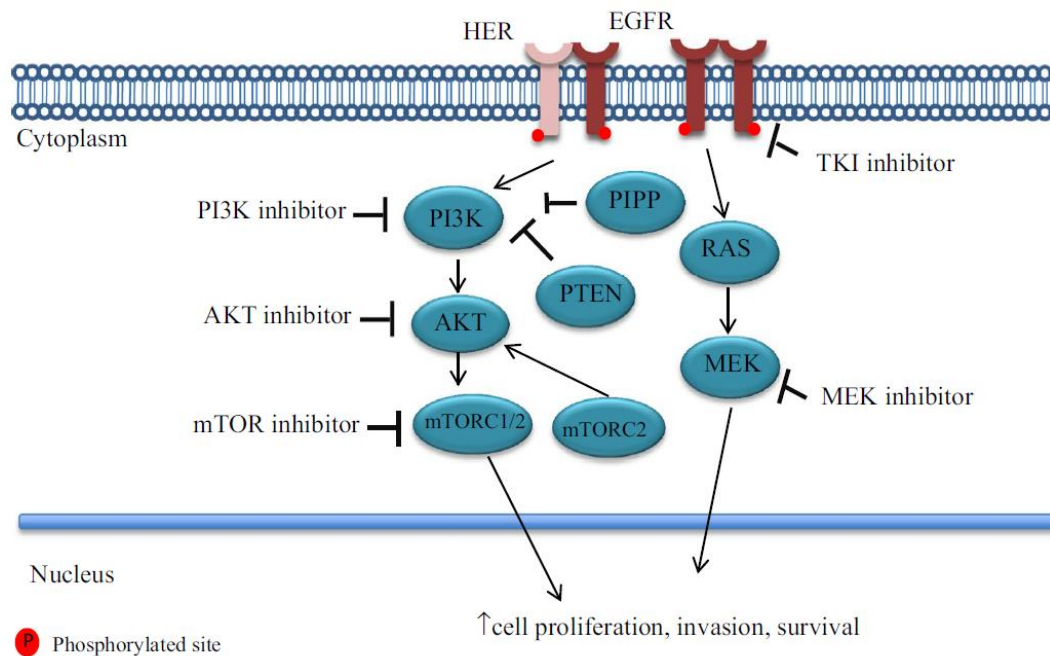


Figura 10. Ruta PI3K/AKT/mTOR. Tomada de [29]. PTEN: fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa, AKT: proteína quinasa B, mTOR: diana de rapamicina en células de mamífero, MEK: Proteína quinasa quinasa activada por mitógenos.

2.2.5 Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR)

PDGFR está implicado en la ruta de señalización que favorece el desarrollo de células mesenquimales. PDGFR se divide en dos tipos de receptores el alfa y beta y 5 ligandos PDGF-AA, BB, AB, CC y DD [30], su señalización es relevante durante la embriogénesis y su sobreexpresión está asociada con diversas condiciones patológicas, por ejemplo el cáncer [31].

Los estudios en CM han demostrado su participación en procesos de remodelación de la matriz extracelular, migración, invasión y angiogénesis de células malignas [30]. Como se observa en la Figura 11, la forma activa de PDGFR es en dímero y dependiendo de la isoforma que se una es la actividad que podrá desencadenar. Una vez activado por fosforilación, activa proteínas como RAS, RAF, MEK y ERK que inducen la transcripción de genes relacionados a angiogénesis, proliferación, invasión y metástasis [32].

Los inhibidores de PDGFR actualmente se estudian para otros tipos de cáncer, como el de colon donde se han establecido diversos fármacos para el tratamiento de esta enfermedad, dichos compuestos no son selectivos y en algunos casos se encuentran efectos secundarios debido a su uso [32].

Es de interés la búsqueda de inhibidores que puedan actuar contra CMTN inhibiendo a PDGFR y que además sean específicos.

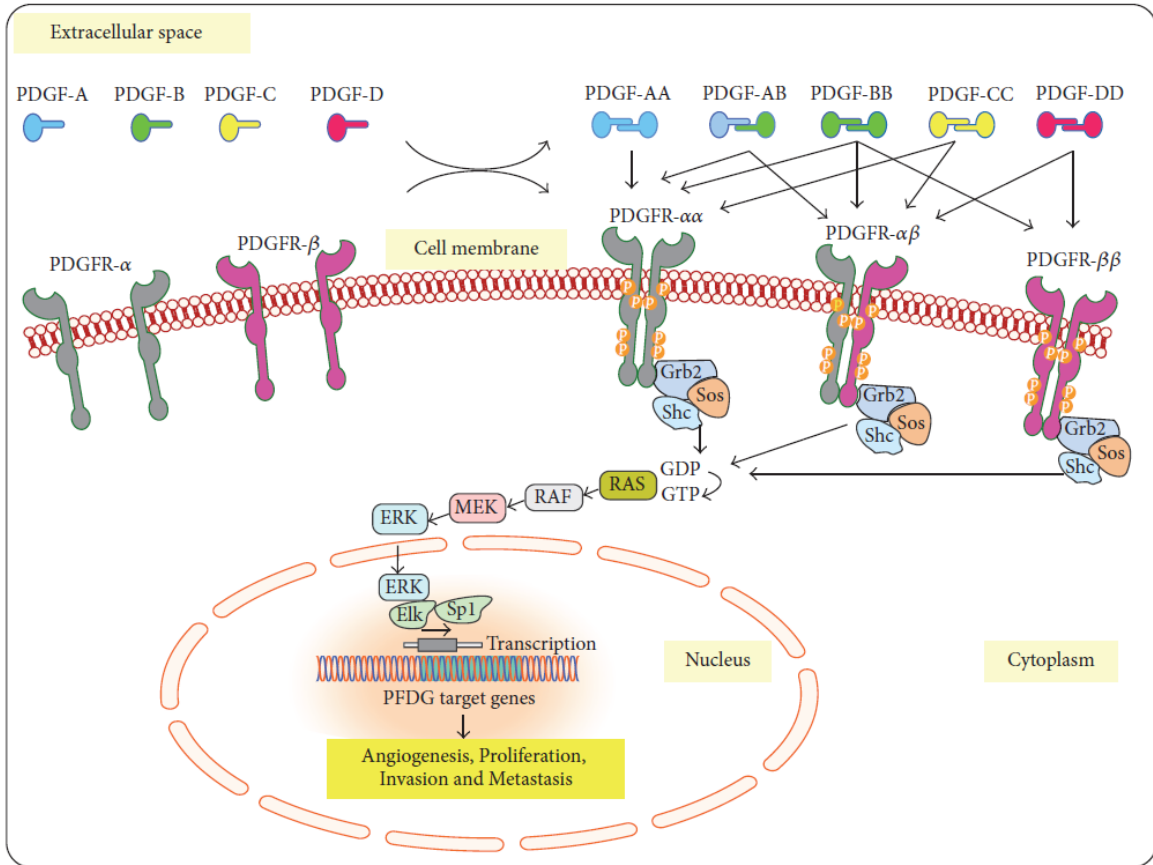


Figura 11. Ruta de señalización de PDGFR. Tomada de [32]. PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas, PDGFR: receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas, MEK: Proteína quinasa quinasa activada por mitógenos, ERK: quinasas reguladas por señales extracelulares.

2.2.6 Ligando 1 de muerte programada (PD-L1)

PD-L1 junto con PD-1 constituyen un punto de control de diversas reacciones inmunes, su expresión en células cancerígenas ayuda a evadir la respuesta inmune antitumoral y su expresión, se ha reportado en 34% de los tumores de cáncer de mama, interesantemente PD-L1 se relaciona con un alto riesgo clínico patológico [33], [34].

La sobreexpresión de PD-L1 en células tumorales provocaría su evasión del sistema inmune, por eso en los últimos años se ha aumentado el interés por crear anticuerpos

anti PD-1/PD-L1 como una propuesta de inmunoterapia para distintos tipos de cáncer [35].

Como se observa en la Figura 12 la expresión anormal de PD-1/PD-L1 ocasiona la fosforilación de los residuos de tirosina en el motivo inhibidor inmuno-receptor basado en tirosina (ITIM), lo que disminuye la actividad antitumoral de los linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) e induce procesos como apoptosis, disminuye la secreción de interferones e interleucinas, la producción de perforinas y enzimas granulares y la detención del ciclo celular [35].

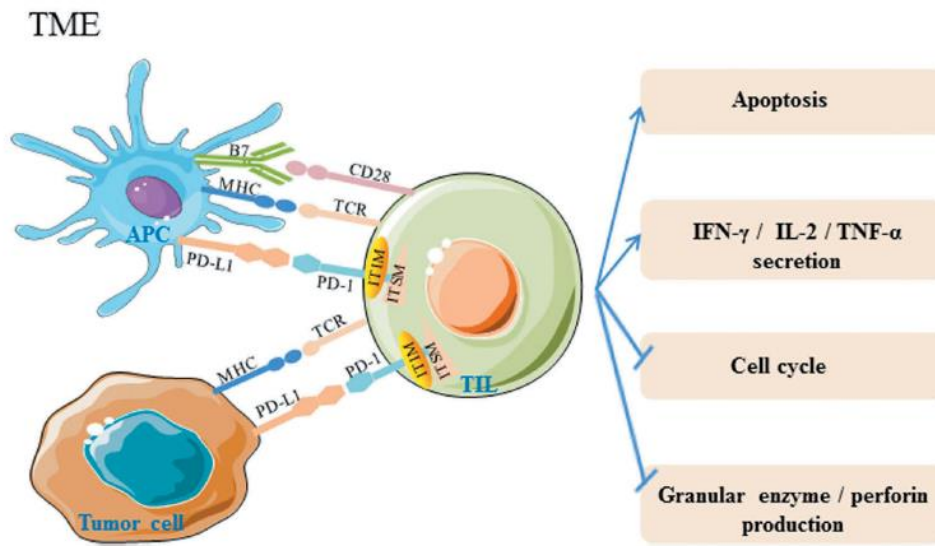


Figura 12. Participación de PD-1/PD-L1 en el microambiente tumoral. Tomado de [35]. APC: célula presentadora de antígeno, PD-L1: ligando 1 de muerte programada, PD-1: proteína de muerte celular programada 1, ITIM: motivo inhibidor inmuno-receptor basado en tirosina, TIL: linfocitos infiltrantes de tumores.

En la actualidad, las terapias utilizadas para la inhibición de PD-L1 son de tipo anticuerpo monoclonal [35], resulta de interés la inhibición de esta proteína mediante moléculas pequeñas, ya que probablemente disminuirían los costos de tratamiento.

Los inhibidores comerciales utilizados para las proteínas AR, EGFR, p110 α , mTOR, PDGFR y PD-L1 han presentado efectos secundarios o no efectivos en la clínica. Por otro lado, se siguen buscando alternativas para el tratamiento de CMTN dirigidas a de estos blancos, una de las estrategias bioinformáticas para este fin es el reposicionamiento de fármacos.

2.3 Reposicionamiento de fármacos

El reposicionamiento de fármacos es el uso de un ingrediente activo farmacéutico (fármaco) que ya ha salido al mercado para una nueva indicación es decir el tratamiento de una nueva enfermedad. El reposicionamiento se basa en dos aspectos: 1) mediante la elucidación del genoma humano se ha observado que algunas enfermedades comparten un mismo blanco biológico y 2) el concepto de fármacos pleiotrópicos [36] donde el efecto pleiotrópico sugiere la potencialidad de acciones terapéuticas.

Una de las principales ventajas que presenta este tipo de estudio es la simplificación de los procesos de regulación de fármacos en el mercado, pero en caso de que exista un cambio en la formulación, dosis o ruta de administración se requerirá una reexaminación en su perfil de seguridad. A continuación se comentan casos de éxito de reposicionamiento [36].

El caso del ácido acetilsalicílico (Figura 13) es el más antiguo relacionado con el reposicionamiento. En 1899 Bayer lo comercializó como un analgésico, pero en los años ochenta se reposicionó como un fármaco antiagregante plaquetario para la prevención de eventos cardiovasculares con base en el trabajo realizado por Vane en 1982 [36].

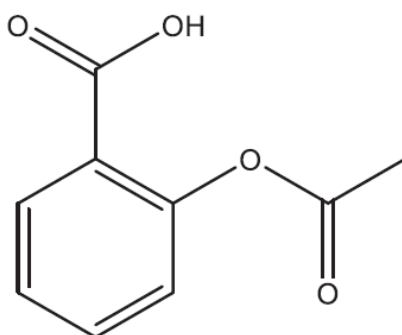


Figura 13. Estructura del ácido acetilsalicílico.

En 1962 la Organización Mundial de la Salud prohibió el uso de talidomida (Figura 14) debido a los efectos teratogénicos desarrollados, pero en 1964 los estudios desarrollados por el doctor Jacob Sheskin mostraron su efecto contra el eritema nudoso leproso, complicación autoinmune derivada de la lepra, reposicionándolo de nuevo en el mercado, indicando que su ingesta en pacientes embarazadas no es recomendado [36].

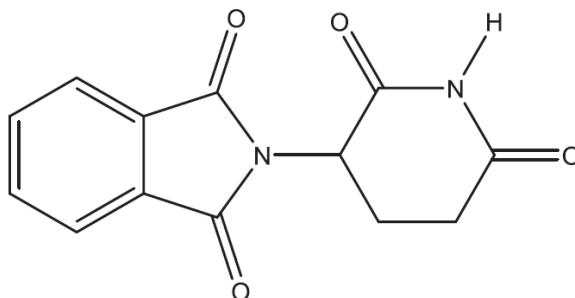


Figura 14. Estructura de la talidomida.

En estudios más actuales en 2017, Kumar y cols., realizaron un reposicionamiento de fármacos antipsicóticos para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer con ayuda de herramientas *in silico*. Probaron 150 fármacos y llevaron a cabo estudios de acoplamiento molecular con 5 proteínas de interés: acetilcolinesterasa (AChE), butirilcolinesterasa (BuChE), β -secretasa (BACE1), monoamino oxidasa (MAO) y N-metil-D-aspartato (NMDA). Encontraron 6 fármacos con posible actividad para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer [37].

Uno de los factores más importantes a considerar para el reposicionamiento de fármacos *in silico* es la selección de la base de datos que se va a utilizar, estas bases se pueden clasificar en [38]:

1. *Raw data DB*: almacenan un gran contenido de datos organizados en tablas con el propósito de minar los datos y crear bases de datos específicas. Ejemplos, CMAP, Drug repurposing hub y THIN.
2. *Target-based DB*: contienen información acerca de blancos de fármacos ya sea genes, RNA, proteínas, información de mutaciones, rutas, efectos secundarios, entre otros. Ejemplos: Drug2Gene, DrugBank (DB) y SIDER.
3. *Specific DB*: almacenan información para una aplicación específica ya sea medicinales, enfermedades específicas o geográficas. Ejemplos: Ontario, SuperCYP y TDR.
4. *Drug design DB*: almacenan información de moléculas pequeñas, estructura, actividades, posibles aplicaciones biológicas, entre otros. Ejemplos: CancerHSP, ChEMBL y DMAP.
5. *Tool-based DB*: consiste en herramientas y servidores web para el uso de reposicionamiento, su información generalmente se basa en las bases de datos mencionadas anteriormente. Ejemplos: DrugNet, DTome y NFFinder.

2.4 Acoplamiento molecular

El acoplamiento molecular (*docking*) es un procedimiento computacional que permite predecir la unión entre una macromolécula con un ligando y los tipos de enlaces involucrados. [39].

Muchas veces, conocer el sitio de unión de la proteína en el cual se quiere ver la interacción con un ligando incrementa considerablemente la eficiencia del *docking*. En caso de no conocer el sitio de unión de una proteína hay diversos servidores (GRID, POCKET, SurfNet) que pueden ayudar al investigador a identificar el sitio de unión. Dicha metodología se basa en la comparación estructural de diversos activos de proteínas relacionadas [39].

Los valores obtenidos después de realizar un *docking molecular* son el resultado de dos procesos relacionados entre sí:

- Generación de diferentes conformaciones del ligando en el sitio de unión y
- Listado de dichas conformaciones de acuerdo con un puntaje determinado.

Probar todas las conformaciones posibles de un ligando en el sitio de unión resultaría demasiado costoso computacionalmente y tomaría mucho tiempo. Por lo cual se han desarrollado algoritmos que toman en consideración cierto número de parámetros para limitar las posibles conformaciones de las moléculas, además de asegurar resultados reproducibles con fines estadísticos [39].

Existen varios tipos de procedimientos de *docking molecular* como: i) *docking* de ligando flexible (el blanco como molécula rígida), ii) *docking* de cuerpo rígido (donde tanto la proteína y el ligando son moléculas rígidas) y iii) *docking* flexible (ambas moléculas interactuantes son flexibles) [40], [41].

Se han desarrollado más de 60 diferentes herramientas y programas para realizar *docking molecular*, ya sea para el ámbito académico o comercial. Entre estos programas se encuentran DOCK, AutoDock, FlexX, Surfex, GOLD, MCDock, MOE-Dock, AutoDock Vina, UCSF Dock, por mencionar algunos [39].

La energía de acoplamiento (EA) es considerada de prioridad en la evaluación de los mejores candidatos para un screening virtual. Como se mencionó anteriormente, existen diversos programas que el usuario puede escoger basado en sus requerimientos particulares. Por ejemplo, si se requiere realizar un tamizaje de más de 10,000 compuestos de una base de datos, el *docking* flexible no es una buena opción a menos que se tenga un gran poder y velocidad computacional [39].

Una de las plataformas que permite un análisis extenso de moléculas es Schrödinger, una suite informática que posibilita realizar la predicción de nuevas propiedades para moléculas de interés. La identificación de blancos y su optimización, integra métodos predictivos basados en la física con técnicas de aprendizaje automático para acelerar los procesos realizados. Está diseñado para acelerar la evaluación y optimización de la materia química *in silico* antes de la síntesis y el ensayo, gracias a sus distintos módulos

podemos preparar las moléculas y macromoléculas, minimizar energías, para finalmente realizar el acoplamiento molecular y su posterior análisis [42].

Schrödinger brinda una amplia gama de programas para realizar actividades específicas con la finalidad de preparar, realizar y analizar ensayos de *docking molecular*. El modulo Prime ayuda a la predicción de la estructura proteica precisa; Glide realiza el acoplamiento ligando-receptor y Laiso predice la energía de acoplamiento. Por otro lado, Phase permite el modelado de farmacóforos basados en ligandos y QikProp la predicción de propiedades ADME de candidatos a fármacos. Por último, Maestro es el modulo grafico de todos los programas computacionales antes mencionados, brindando una interfaz para el análisis y visualización de resultados [42].

3 JUSTIFICACIÓN

El cáncer de mama constituye una de las principales causas de muerte en mujeres tanto a nivel mundial como en México, y aunque existen métodos de detección y terapias aprobadas. Los índices de mortalidad siguen siendo elevados sobre todo en el CMTN que, al no presentar sobreexpresión de receptores, no existe una terapia idónea para combatirlo. Aunque este subtipo de cáncer de mama tiende a responder favorablemente a la quimioterapia inicial, puede reincidir con más frecuencia en comparación con otros tipos de cáncer.

En los últimos años los estudios bioinformáticos han sido ampliamente utilizados para la predicción de posibles actividades biológicas de moléculas de interés. Uno de los métodos utilizados en la actualidad es el reposicionamiento de fármacos que tiene gran impacto pues permite identificar nuevos usos de un medicamento ya aprobado, lo que reduce significativamente los costos y el tiempo de investigación, permitiendo así encontrar nuevos tratamientos para enfermedades relevantes como el cáncer.

Dado que actualmente se tienen bases de datos muy completos de fármacos aprobados por la FDA, así como de información clínica de éstos, es importante utilizar estas herramientas *in silico* para reposicionar fármacos para la búsqueda de nuevos tratamientos dirigidos a proteínas específicas relacionadas con los subtipos moleculares del CMTN.

4 HIPÓTESIS

Con base en estudios *in silico* de interacción proteína-fármaco y tomando en cuenta las bases de datos de fármacos aprobados por la FDA y la información clínica de éstos, se encontrarán fármacos candidatos para reposicionamiento que posiblemente inhiban proteínas específicas de cada subtipo de CMTN.

5 OBJETIVOS

General

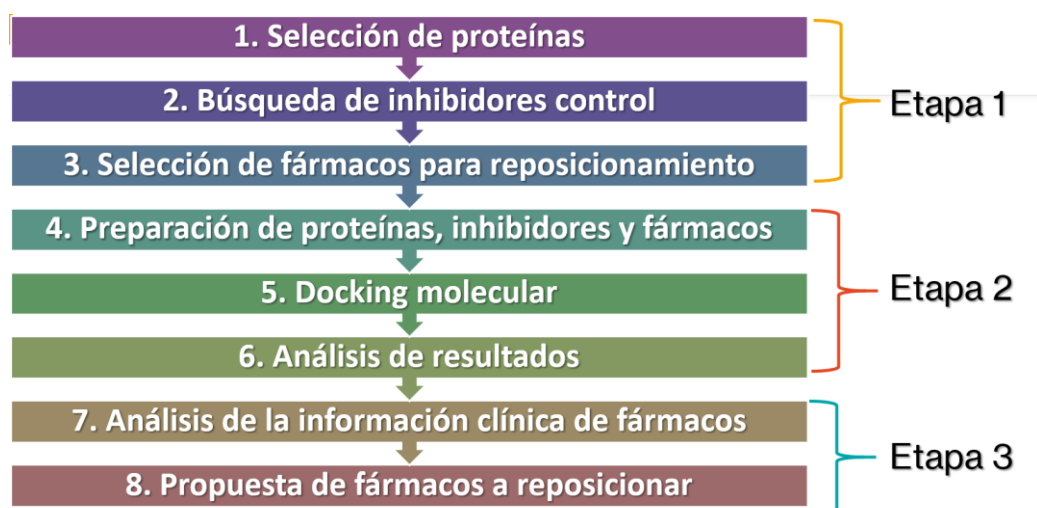
Reposicionar fármacos candidatos contra proteínas involucradas en el desarrollo del CMTN mediante herramientas bioinformáticas e información clínica de los fármacos.

Específicos

1. Seleccionar una proteína relacionada a cada subtipo de CMTN, moléculas control (inhibidores y/o ligandos endógenos) y la base de datos de fármacos a reposicionar.
2. Preparar las proteínas seleccionadas, las moléculas control y los fármacos utilizando la plataforma Drug Bank para el acoplamiento molecular.
3. Determinar la energía de acoplamiento, interacciones y residuos aminoacídicos que participan en la unión de las proteínas con los fármacos (suite Schrödinger).
4. Realizar la primera selección de fármacos tomando en cuenta la energía de acoplamiento y los parámetros de Lipinski y Ghose.
5. Seleccionar los fármacos específicos monoproteína (para una sola proteína) y multiproteína (que actúen en varias proteínas).
6. Analizar la información clínica bibliográfica de los fármacos para sugerir los fármacos candidatos a reposicionamiento y establecer si son seguros o no para su posible aplicación futura en pacientes con CMTN.

6 METODOLOGÍA

El presente proyecto se dividió en 3 etapas acorde con las actividades realizadas, éstas son descritas en el Esquema 1. En la etapa 1 se seleccionaron mediante una extensa búsqueda bibliográfica las proteínas relacionadas a cada uno de los subtipos de CMTN, los inhibidores control para dichas proteínas y la base de datos de fármacos para el posible reposicionamiento. En la etapa 2 se prepararon las proteínas, inhibidores y fármacos bajo condiciones específicas para el *docking molecular*, posteriormente se realizó el análisis de resultados abarcando la energía de acoplamiento (EA), los residuos que interaccionan y los tipos de interacción observadas, también se utilizaron la EA y los criterios de Lipinski y Ghose (CLG) como filtros para la selección de candidatos. Por último, en la etapa 3 se analizó la información clínica de los fármacos para el reposicionamiento y se dividieron de acuerdo con las proteínas con las que interaccionan *in silico* (mono o multiproteína). Finalmente se realizó la propuesta de fármacos candidatos para reposicionar.



Esquema 1. Resumen de actividades realizadas para el desarrollo del proyecto.

La selección de proteínas se realizó mediante una búsqueda bibliográfica extensa, considerando aquellas proteínas que tuvieran una actividad relevante en cada uno de los subtipos de CMTN y que pudiesen utilizarse como blancos para terapia, una vez seleccionadas las proteínas, se recolectó la estructura cristalizada en la base de datos RCSB PDB [43]. En la Tabla 4 se encuentra la información relacionada con el código PDB, clasificación, resolución, condiciones de cristalización (ligando, pH y temperatura) de cada una de las proteínas, todos estos criterios estructurales se tomaron en cuenta para su selección. Solo se tomaron en cuenta aquellas proteínas de origen humano, y con una resolución mínima a 3 Å, en el caso de p110 α y mTOR se utilizaron cristales de una resolución menos favorable debido a la escasez de estructuras reportadas.

Tabla 4. Información cristalográfica de las proteínas seleccionadas.

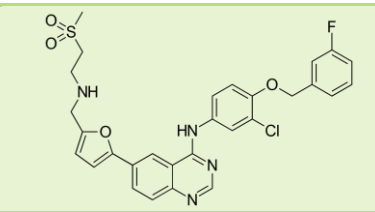
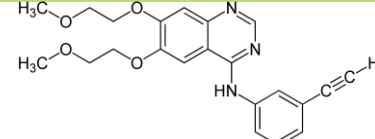
Proteína	Código PDB	Clasificación	Resolución (Å)	Ligando	pH	Temperatura (K)	Ref.
EGFR	6DUK	Transferasa	2.20	Inhibidor experimental	N/E	293	[44]
AR	2PIQ	Receptor hormonal	2.40	Inhibidor experimental	N/E	298	[45]
P110 α	6OAC	Transferasa	3.15	Inhibidor experimental	9.5	290	[46]
mTOR	4JSX	Transferasa	3.50	Inhibidor experimental	8.5	277	[47]
PDGFR	5GRN	Transferasa	1.77	WQ-C-159	N/E	293	[48]
PD-L1	5NIU	Sistema inmune	2.01	Inhibidor experimental	N/E	298	[49]

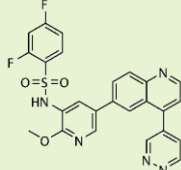
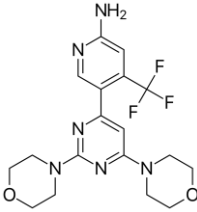
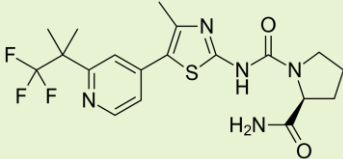
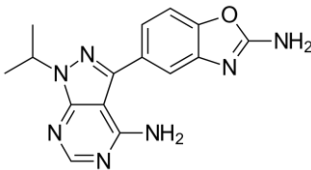
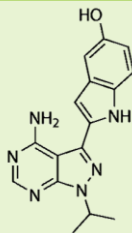
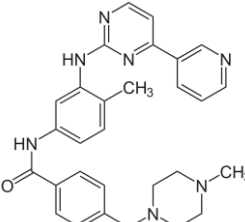
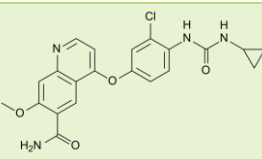
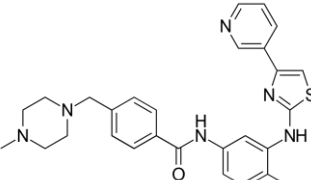
N/E= No especificado

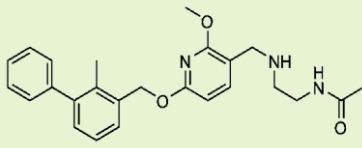
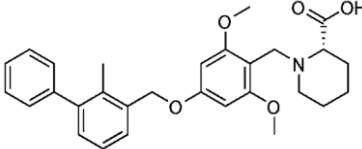
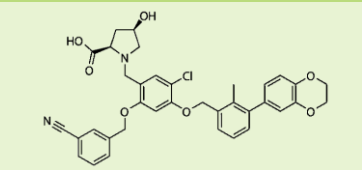
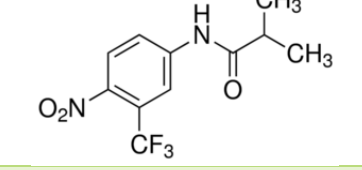
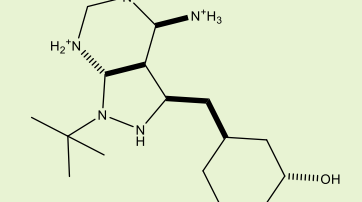
Schrödinger permitió completar las cadenas de aquellos cristales con cadenas faltantes.

Para la selección de inhibidores también se realizó una extensa búsqueda bibliográfica, en su mayoría se seleccionaron inhibidores comerciales (aprobados por la FDA) y que contarán con experimentos *in vitro*, *in vivo* o reportes de ensayos clínicos; una vez seleccionados se procedió a descargar su estructura en formato SDF en la base de datos Selleckchem para el estudio de acoplamiento molecular. En la Tabla 5 encontramos el número de catálogo o código del inhibidor para la base de datos en donde podremos encontrar más información de cada uno de ellos y su estructura 2D.

Tabla 5. Información de los inhibidores seleccionados.

Inhibidor	Código	Estructura	Ref
Lapatinib	S2111		[50]
Erlotinib	S7786		[51]

Omipalisib	S2658		[52]
Buparlisib	S2247		[53]
Alpelisib	S2814		[54]
Sapanisertib	S2811		[55]
TORKinib	S2218		[56]
Imatinib	S2475		[57]
Lenvatinib	S1164		[58]
Masitinib	S1064		[59]

BMS-202	S7912		[60]
BMS-1	S7911		[61]
BMS-1166	S8859		[62]
Flutamida	S1908		[63]
RB1	El inhibidor no es comercial, se obtuvo su estructura a partir del cristal utilizado.		[45]

Para la selección de la base de datos de fármacos para reposicionar, se compararon 3 bases de datos que permitían la descarga de diversas listas de moléculas o fármacos, dichas bases fueron: DrugCentral, FDA y DrugBank.

Se seleccionó a Drug Bank ya que permite la descarga particular de todos los fármacos aprobados, DrugCentral no permite esto y, por otro lado, la base de FDA era demasiado extensa; además la interfaz de DrugBank es más amigable para la búsqueda de información particular para cada uno de los fármacos.

Para el estudio de acoplamiento molecular se descargó el archivo en formato SDF de los 2648 fármacos aprobados por la FDA (Versión 5.1.8 liberada el 03-01-2021) [64].

La preparación de proteínas, inhibidores y fármacos se realizó en el suite Schrödinger [42] con ayuda de diversos módulos:

En el módulo LigPrep se prepararon los 17 ligandos, tanto inhibidores como ligandos endógenos y 2648 fármacos de la base de datos DB, se minimizaron las estructuras y se su estudio se llevó a cabo en condiciones fisiológicas (pH 7.4 y 36.5 °C), lo cual permitió que las moléculas adoptaran distintas isoformas, tautomería y estados de protonación.

Para la preparación de proteínas se utilizó el módulo *Protein Wizard Preparation*, se minimizaron energéticamente las estructuras (OPL3), se eliminó el agua y disolventes que pudiesen tener las estructuras cristalizadas y se establecieron condiciones fisiológicas (pH 7.4 y 36.5 °C) para el estudio de acoplamiento molecular. En el módulo Grid Grid Generation (GGG) se generaron las cajas con las coordenadas correspondientes al sitio de unión de cada proteína para realizar el estudio de interacción.

El *docking molecular* de alta precisión se realizó en el módulo Glide, tanto los inhibidores, fármacos y aminoácidos circundantes del sitio de unión son flexibles.

Para el análisis de resultados del *docking molecular*, se consideraron las energías de acoplamiento, tipos de interacción y residuos que interaccionan, así mismo se tomaron en cuenta los parámetros de EA y los CLG como filtros para la selección de candidatos.

Para el filtro de EA se consideraron todos aquellos fármacos que tuvieran una mejor EA que el inhibidor menos favorecido en cada una de las proteínas, en la Tabla 6. Se muestran las EA de todos los inhibidores por proteína. Considerando el filtro de EA se consideraron los siguientes inhibidores para cada proteína: para EGFR el erlotinib, para p110 α el burpalsib, para mTOR el sapanisertib, para PDGFR el lenvatinib, para PD-L1 el BMS-1166 y para AR la flutamida y RB1, ya que se estudiaron tanto el sitio de unión del ligando natural como el sitio alostérico.

Tabla 6. Energía de acoplamiento de la proteína con cada inhibidor.

Proteína	Inhibidor	EA (kcal/mol)
EGFR	Lapatinib	-7.53
	Erlotinib	-5.78
AR	Flutamida	-6.75 (sitio de unión del ligando endógeno)
	RB1	-3.42 (sitio alostérico)
P110α	Omipalisib	-8.33
	Alpelisib	-8.08
	Burpalsib	-7.76
mTOR	TORKinib	-4.89
	Sapanisertib	-3.93
PDGFR	Imatinib	-12.03
	Masitinib	-10.71
	Lenvatinib	-6.57
PD-L1	BMS-202	-10.771
	BMS-1	-9.56
	BMS-1166	-7.22

Además, solo se consideraron aquellos fármacos que cumplieran con los CLG. En la Tabla 7 se detallan los criterios de Lipinski y Ghose de forma particular y en la última columna los CLG combinados que se aplicaron en el presente estudio.

Tabla 7. Criterios de Lipinski y Ghose, combinación utilizada para el estudio (CLG)

Criterio	Lipinski	Ghose	CLG
Peso molecular	≤500 g/mol	160-480 g	≤500
logP	≤5	-0.4-5.6	-0.4-5.6
Aceptores de puentes de hidrógeno	≤10	N/A	≤10
Donadores de puentes de hidrógeno	≤5	N/A	≤5
Refractividad molar	N/A	40-130	40-130
Número de átomos	N/A	20-70	20-70

N/A: No Aplica

Análisis de la información clínica de fármacos. Se recopiló información en las bases de datos DrugBank, PubChem, Sider 4.1: Side Effect Resource y Drugs.com relacionada con:

1. Uso o tratamiento actual
2. Toxicidad
3. Lesión hepática inducida por fármacos (DILI, por sus siglas en inglés)
4. Efectos adversos
5. Contraindicaciones
6. Formulación
7. Mecanismo de acción

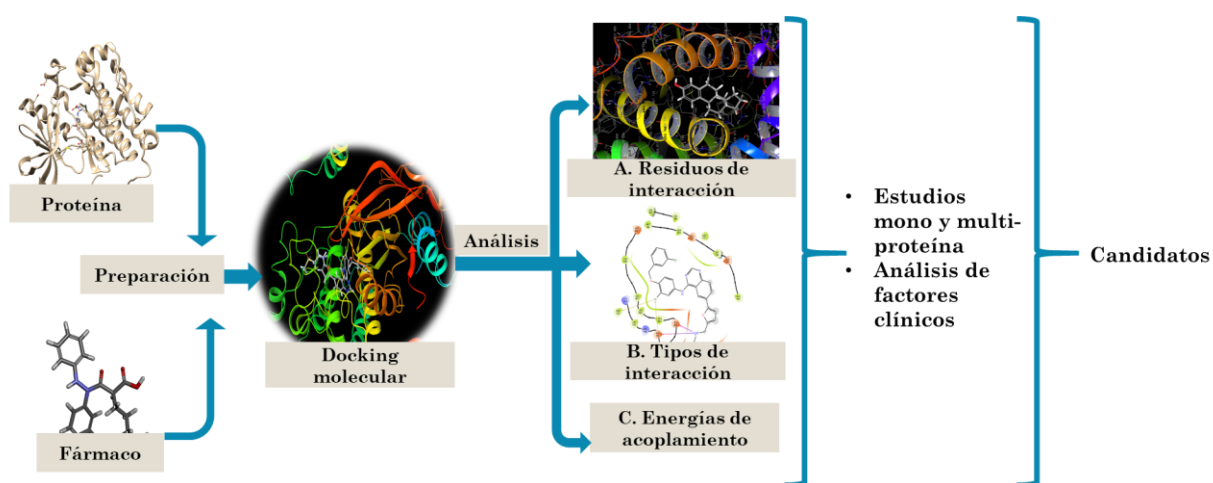
Se descartaron aquellos fármacos que presentaran toxicidad, efectos adversos o contraindicaciones graves, así mismo, solo se consideraron fármacos con DILI C, D y E dado que no estarían relacionados al desarrollo de hepatotoxicidad. Por otro lado, la formulación oral se consideró mejor sobre la tópica. Por último, el uso o tratamiento actual y el mecanismo de acción es información relevante para una posterior aplicación clínica, ya que, son aspectos que deben considerarse de acuerdo con el perfil de los pacientes.

La propuesta de los fármacos para reposicionar se llevó a cabo mediante los estudios mono y multiproteína estudiados, en el que se incluyó tanto la información del acoplamiento molecular como la información clínica recopilada.

Es decir, solamente aquellos fármacos que pasaron los filtros de EA, CLG y los aspectos clínicos se consideraron como candidatos, además, se dividieron en monoproteína es decir aquellos fármacos que solo interactúan con una de las 6 proteínas propuestas y por otro lado el estudio multiproteína, en el que se consideró la interacción de los fármacos en dos conjuntos: el primero incluye aquellos que interactúan *in silico* con AR y EGFR y el segundo aquellos que interactúan *in silico* con EGFR, p110 α y mTOR.

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El presente trabajo se dividió en tres etapas, la **primera** consistió en la selección de proteínas, inhibidores control y base de datos de fármacos para reposicionar. La **segunda** el *docking molecular* y el análisis de las energías de acoplamiento, conformación espacial e interacciones, además se realizó la selección de los candidatos aplicando los filtros de energía de acoplamiento y parámetros moleculares. Por último, en la **tercera** etapa se dividió el estudio en candidatos mono y multiproteína y se aplicó un último filtro correspondiente a la información clínica de los fármacos (Esquema 2).



Esquema 2. Actividades realizadas para la selección de candidatos.

7.1 Primera etapa

7.1.1 Selección de proteínas para el estudio por subtipo de CMTN

La Tabla 8 presenta un resumen de las alteraciones en genes y proteínas descritas en CMTN por diferentes autores, que describiré a continuación:

Lehman y cols., en 2011 identificaron 6 subtipos de cáncer de mama triple negativo de acuerdo con la expresión génica en microarreglos de expresión de pacientes, como se describe en la Tabla 8. Cada uno de estos subtipos presenta alteraciones en genes específicos relacionados a procesos de mantenimiento y desarrollo de células tumorales los cuales podrían ser un buen blanco para terapia [8].

Tabla 8. Principales alteraciones en genes y proteínas involucrados en el CMTN.

Autores	Modificaciones en genes y proteínas	Ref.
Lehman y cols., 2011	BL1: <i>BRCA1, STAT4, TP53, PTEN</i> BL2: <i>PTEN, TP53, UTX, SMAD4, RB1</i> IM: <i>TP53, CTNNA1, DDX18, MAP2K4</i> M: <i>PTEN, RB1, TP53, PIK3CA</i> MSL: <i>CDKN2A, HRAS, TP53, NF1, BRCA1</i> LAR: <i>PTEN, PIK3CA, CDH1, TP53</i>	[8]
Garrido-Castro y cols., 2019	Metilaciones en CpG en regiones promotoras de 9 biomarcadores epigenéticos: <i>CDH1, CEACAM6, CST6, GNA11, ESR1, MUC1, MYB, SCNN1A y TFF3</i> . Hipometilación de 3 genes relacionados a células troncales: <i>CD44, CD133 y MSH1</i> .	[65]
Damaskos y cols., 2019	Los pacientes con CMTN no se benefician de un tratamiento hormonal, se han sugerido nuevas terapias que inhiban proteínas que se encuentran desreguladas, por ejemplo: inhibidores de tirosina-quinasa, anti-andrógénicos, inhibidores de PARP-1, factores anti-angiogénicos, por otro lado; la ruta PI3K/AKT/mTOR ha resultado de interés.	[66]
Mehanna y cols., 2019	Proponen el desarrollo de nuevas terapias, entre las que se encuentran, inhibidores de PARP, AR, PI3K/AKT y conjugados anticuerpo-fármaco.	[67]
Yin y cols., 2020	BL1: <i>MYC, PIK3CA, CDK6, AKT2, KRAS, FGFRQ</i> BL2: <i>EGFR, MET, NGF</i> IM: <i>PD1, PDL1, CTLA-4</i> M: <i>mTOR, genes relacionados a proliferación celular</i> MSL: <i>BMP2, KDR, NGFR, NT5E, PDGFR, THY1</i> LAR: <i>AR, ALCAM, FASN, APOD, SPDEF, CLDN8</i>	[23]
Lopes da Silva y cols., 2020	Describieron algunos marcadores moleculares relevantes: <i>TP53, KI-67, EGFR, c-KIT, VEGF, AR, BRCA1 y 2, PD-L1</i> , rutas Notch y PI3 quinasa	[68]

Garrido Castro y cols., en 2019 estudiaron algunos posibles biomarcadores epigenéticos para el cáncer de mama triple negativo entre los cuales destacan *CDH1, MUC1*, entre otros, y en donde también se presentan alteraciones relacionadas con procesos de células troncales, siendo este último un factor clave para el desarrollo del CMNT [65].

Por otro lado, Damaskos y cols., en 2019 propusieron para el tratamiento del CMTN algunos compuestos inhibidores de tirosina quinasa, anti androgénicos, PARP-1, entre otros, así mismo identificaron algunas rutas de interés por ejemplo la de PI3K/AKT/mTOR que está relacionadas con el crecimiento, mantenimiento y desarrollo de células malignas [66].

En 2019, Mehanna y cols., desarrollaron nuevas terapias relacionadas a la inhibición de las proteínas PARP, AR, PI3K/AKT conjugando anticuerpos con fármacos para conseguir una inhibición específica para este tipo de proteínas [67].

Retomando el estudio de los subtipos de CMTN, Yin y cols., en 2020 analizaron las alteraciones genéticas de cada uno de los subtipos propuestos con la finalidad de desarrollar nuevas terapias, y en donde se pueden observar genes y proteínas asociadas con éstos, relacionadas a procesos de proliferación celular, desarrollo y migración [23].

En 2020, Lopes da Silva y cols., encontraron marcadores moleculares relevantes como *TP53*, *KI-67*, *EGFR*, entre otros, los cuales también están relacionados con procesos que ayudan a las células tumorales a su mantenimiento y migración hacia otro tipo de tejido de acuerdo con cada uno de los subtipos de CMTN [68].

Como se observa en la Tabla 8 existen estudios que demuestran los genes alterados y algunas proteínas por subtipo de CMTN. Tomando en cuenta estas alteraciones, se han desarrollado nuevas terapias para el tratamiento de las pacientes con este padecimiento, la mayoría de ellas se encuentran en fases preclínicas o clínicas y otras no mostraron ser muy eficaces. Por lo que es necesario continuar con la búsqueda de blancos de interés para el tratamiento de la enfermedad.

Con la información de la Tabla 8 y la información recabada en la literatura de las proteínas descritas, se seleccionaron para nuestro estudio 6 proteínas blanco, representativas de cada uno de los subtipos de CMTN. En la Tabla 9 se muestran los nombres de las proteínas seleccionadas, sus generalidades, su función en CMTN, así como, si cuentan con ensayos clínicos con algún inhibidor o fármaco y sus referencias.

Como se observa en la Tabla 9, se conoce la participación de las proteínas blanco elegidas en algunos procesos relevantes relacionados al CM y al CMTN, en su mayoría dichos procesos se relacionan con el crecimiento, supervivencia y desarrollo de células tumorales. Así mismo podemos observar procesos relacionados a la migración y diferenciación, otras actividades de interés descritas son aquellas relacionadas a la evasión del sistema inmune por parte de las células tumorales permitiendo su desarrollo. Por otro lado, se muestran ensayos clínicos en lo que emplean los inhibidores tanto comerciales como aquellos que están en etapa experimental para cada una de estas proteínas. Cabe señalar que, aunque existen resultados relevantes, no se ha logrado desarrollar una terapia eficaz exclusiva para cada uno de estos subtipos de CMTN.

7.1.2 Selección de inhibidores control

Para el estudio de *docking* con las proteínas blanco se realizó también una búsqueda bibliográfica para tener como ligandos control a inhibidores específicos de preferencia aprobados por la FDA o experimentales para cada una de las proteínas. Interesantemente para AR se encontraron tanto inhibidores control como ligandos naturales.

En la Tabla 10 se muestran los inhibidores control seleccionados. Cabe señalar que de cada uno de los inhibidores se cuenta con información acerca del tipo de inhibidor, las enfermedades en los que se ocupan actualmente, los estudios *in vitro* e *in vivo* en los que se evaluaron y si se unen a otras proteínas.

Tabla 9. Proteínas seleccionadas por subtipo de CMTN.

Subtipo de CMTN	Proteína blanco	Generalidades	Papel en cáncer	Ensayos clínicos	Ref.
BL1	p110 α	Nombre: subunidad catalítica alfa de PI3K	Segunda aberración más común en CMTN, la tasa de mutación es de 9% en CMTN en etapas tempranas. Procesos: crecimiento celular, supervivencia, evolución tumoral, resistencia a terapia	Los inhibidores para BL1 siguen en fases clínicas o experimentales	[27], [69], [70],
BL2	EGFR	Nombre: Receptor del factor de crecimiento epidérmico Ligando natural: EGF	Expresado en 70% de los casos de CMTN. Procesos: regulación de proliferación celular, diferenciación, migración y supervivencia	Se han probado inhibidores de BL2 para el tratamiento de CM de tipo hormonal.	[71], [26], [72],
M	mTOR	Nombre: Diana de rapamicina en células de mamífero Actividad: Regulador central del metabolismo celular, crecimiento y supervivencia	Se ha observado hiperactividad de mTOR en CMTN correlacionado a un mal pronóstico y se ha mostrado resistencia a inhibidores de mTOR. Procesos: transcripción, autofagia, supervivencia	Existen inhibidores de mTOR en ensayos clínicos para tratamiento de CMTN, muchos de ellos no son específicos.	[29], [28], [73], [74],
MSL	PDGFR	Nombre: Factor de crecimiento derivado de plaquetas Ligando natural: PDGF Actividad: Promueve o inhibe la proliferación y migración celular	Se sigue estudiando su participación en cáncer de mama. Procesos en otros tipos de cáncer: remodelación de la matriz extracelular, migración, invasión y angiogénesis.	Existen estudios sobre inhibidores de PDGFR, no son específicos y se han probado en otros tipos de cáncer.	[31], [30], [32], [75],
IM	PD-L1	Nombre: Ligando 1 de muerte programada Ligando natural: PD-1 Actividad: Mantenimiento de tolerancia inmune	Esta expresado en 34% de los tumores de CM, y se relaciona con un alto riesgo clínico patológico. Procesos: ayuda a las células tumorales a evadir la respuesta inmune	Existen inhibidores aprobados para PD-L1, en su mayoría son anticuerpos, no se ha explorado la inhibición de esta proteína por moléculas pequeñas.	[34], [35], [33], [76],
LAR	AR	Nombre: Receptor de andrógenos Ligandos naturales: testosterona y DHT Actividad: afecta la proliferación y diferenciación en tejidos blanco	Está expresado en 70% de los tumores de CM y en 50% de los casos de CMTN, está presente en todos los estadios clínicos. Procesos: diferenciación, proliferación, apoptosis y angiogénesis.	Se han desarrollado inhibidores para el tratamiento de otros tipos de cáncer, se han presentado efectos secundarios importantes.	[24], [25], [77], [78], [79],

Tabla 10. Inhibidores control por proteína de estudio.

Subtipo CMTN	Proteína	Inhibidores control	Blancos	Experimentos	Ref.
BL1	p110 α	Omipalisib, Burpalisib, Alpelisib	Omipalisib: P110 α / β / δ / γ Burpalisib: P110 α / β / δ / γ Alpelisib: PI3K β / γ / δ	Omipalisib: <i>in vitro</i> T47D, IC50: 0.41 nM, BT474, IC50: 0.18 nM. <i>In vivo</i> Xenoinjertos BT474. Burpalisib: <i>in vitro</i> A2780, U87MG, MCF7, DU145. <i>In vivo</i> xenoinjertos U87MG, A2780 Alpelisib: <i>in vitro</i> líneas celulares de CM. <i>In vivo</i> xenoinjertos.	[80]–[84]
BL2	EGFR	Lapatinib, Erlotinib	Lapatinib: EGFR, ErbB2 Erlotinib: EGFR	Lapatinib: <i>in vitro</i> MCF-7, T47D, A-431, HN5, BT474. <i>In vivo</i> Xenoinjertos de BT474 y HN5 Erlotinib: <i>in vitro</i> A431, IC50: 0.42 μ M, SKBR3, IC50: 1.89 μ M. <i>In vivo</i> Xenoinjertos de tumores HN5.	[85] [86]–[89]
M	mTOR	Sapanisertib, TORKinib	Sapanisertib: mTOR TORKinib; mTOR	Sapanisertib: <i>in vitro</i> PANC-1. <i>In vivo</i> Xenoinjertos de cáncer de mama. TORKinib; <i>in vivo</i> MEFs. <i>In vivo</i> modelo murino de leucemia.	[90]–[92] [93]
MSL	PDGFR	Imatinib, Lenvatinib, Masitinib	Imatinib: PDGF, v-Abl, c-Kit. Lenvatinib: FGFR1-4, PDGFR, Kit (c-Kit), RET (c-RET). Masitinib: Kit (c-Kit) y PDGFR α / β	Imatinib: <i>in vitro</i> NCI-H727, BON-1. <i>In vivo</i> xenoinjertos de cáncer de pulmón de células pequeñas. Lenvatinib: <i>in vitro</i> ensayos de inhibición. <i>In vivo</i> xenoinjertos H146. Masitinib: <i>in vitro</i> ensayos de inhibición. <i>In vivo</i> modelos tumorales Ba/F3.	[94] [95]–[97]
IM	PD-L1	BMS-202, BMS-1, BMS-1166	PD-1, PD-L1	Ensayos de inhibición de crecimiento <i>in vitro</i>	[49] [98]
LAR	AR	Ligandos naturales: Testosterona, DHT Inhibidores: Flutamida (sitio endógeno), RB1 (sitio alostérico)	Flutamida: AR RB1: AR	Flutamida: <i>in vitro</i> células Shionogi sensibles a andrógeno. <i>In vivo</i> modelo murino. RB1: ensayos experimentales.	[45], [99]–[101]

Como se observa en la Tabla 10, los inhibidores seleccionados para cada proteína en su mayoría ya cuentan con estudios tanto *in vivo* como *in vitro*, y en algunos casos dichos experimentos se han realizado en líneas celulares de cáncer o en modelos murinos con ayuda de xenoinjertos. Por otro lado, en el caso de BMS-202, BMS1, BMS-1166 y RB1 siguen en fases experimentales, pero aun así contamos con información al respecto.

7.1.3 Selección de base de datos de fármacos para reposicionar

DrugBank (DB) es una base de datos canadiense disponible en la Universidad de Alberta, que recolecta información de drogas (fármacos) y sus blancos, posee una amplia descripción de las moléculas almacenadas, además permite la descarga libre de la base de datos total o parcial según la investigación lo requiera y la información se actualiza de manera constante [64].

Para este estudio se utilizó la versión 5.1.8 de la base de datos de moléculas pequeñas, conformada por 2,678 fármacos, aprobados por la FDA, liberada el 3 de marzo del 2021.

Cabe recordar que “La Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) es una agencia del Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EE. UU. La FDA en una de sus direcciones es responsable de proteger la salud pública asegurando la seguridad, eficacia, calidad y protección de los medicamentos, vacunas y otros productos biológicos y dispositivos médicos para uso humano y veterinario.

7.2 Segunda etapa

7.2.1 Preparación de proteínas

Por medio de la suite Schrödinger se prepararon las proteínas, para el análisis por acoplamiento molecular, analizando todas las conformaciones energéticamente viables para su estudio.

Es importante señalar que las proteínas utilizadas para el estudio se encuentran cristalizadas y analizadas por Rayos X; y su estructura 3D hidratada se obtiene de la base de datos PDB (Protein Data Bank). Se realizó minimización de energía hasta obtener la conformación más estable, como se observa en la Figura 15 existen ligeros cambios en el plegamiento de la proteína debido al proceso de minimización de energía Tabla 4.

Los aminoácidos alrededor del sitio de unión son flexibles y las proteínas se encuentran en condiciones fisiológicas de pH 7.4 y 36.5 °C.

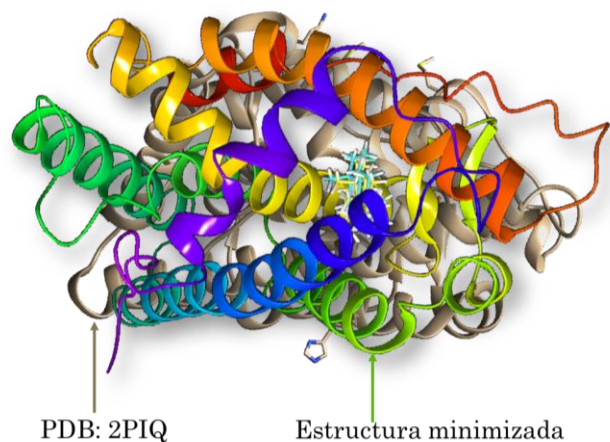


Figura 15. Estructura cristalizada de AR (ocre) y estructura proteica minimizada (colores).

7.2.2 Preparación de inhibidores y fármacos

Se utilizó la suite Schrödinger para la preparación de los inhibidores y fármacos, nuevamente se realizó la minimización energética de las estructuras, ambos tipos de molécula tuvieron flexibilidad en el acoplamiento molecular.

Con el complemento LigPrep bajo condiciones fisiológicas pH 7.4 y 36.5 °C se observaron cambios conformacionales en los inhibidores como se muestra en la Figura 16, donde señalamos con un círculo rojo los cambios en el heterociclo de masitinib acoplado con PDGFR debido a los parámetros fisiológicos. Se muestra claramente que con estos ligeros cambios las energías de acoplamiento pueden variar significativamente. Por otro lado, se encontraron 6428 isoformas, estados de protonación y/o tautómeros de los 2678 fármacos a repositionar.

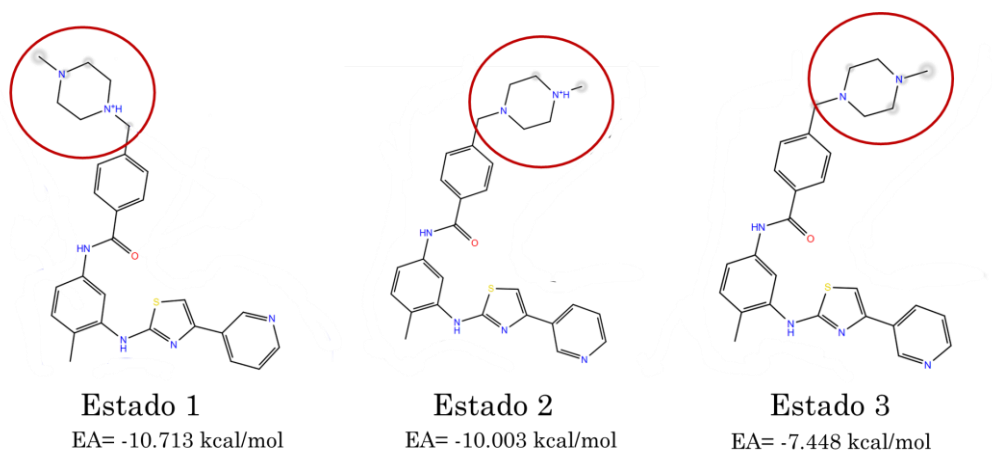


Figura 16. Cambios conformacionales de masitinib y sus EA con PDGFR.

7.2.3 Criterios que considerar para la selección de fármacos a reposicionar

Con la finalidad de seleccionar los mejores fármacos para reposicionamiento se tomaron en cuenta los siguientes criterios.

Criterio energético

La energía de afinidad obtenida en los estudios por acoplamiento molecular se relaciona con la energía libre de Gibbs y representa la suma de todas las interacciones presentes en el ensayo; entre menor es el valor, mayor es la probabilidad de que el ligando elegido interactúe con la diana de interés.

Para cada una de las proteínas de estudio se establecieron controles de tipo inhibidor o ligando endógeno como referencia de los valores de energía de acoplamiento que debían superar o igualar los fármacos candidatos de la base de datos. En cada caso, se tomó al inhibidor control con una energía de acoplamiento menos favorable como referencia a superar.

Criterios de Lipinski y Ghose (CLG)

Existen propiedades fisicoquímicas particulares que comparten los fármacos aprobados por FDA las cuales incluyen peso molecular, hidrofobicidad, polaridad, etc. Las moléculas que cumplen con dichas características se definen como “*druglike*”. Estas son propiedades importantes ya que brindan información sobre el desempeño de las moléculas en sistemas *in vivo*.

Con la finalidad de filtrar compuestos para un posterior análisis clínico se aplicaron como factores de inclusión los parámetros de **Lipinski** (peso molecular ≤ 500 , $\log P \leq 5$, aceptores de puentes de hidrógeno ≤ 10 , donadores de puentes de hidrógeno ≤ 5) y **Ghose** (peso molecular 160-480, $\log P$ -0.4 a 5.6, refractividad molar 40-130, átomos 20-70). Estos parámetros se utilizaron para determinar la biodisponibilidad, permeabilidad y absorción de una molécula.

Se consideraron dichos parámetros ya que muchas veces se aprueban fármacos, aunque no cumplan dichos criterios por la necesidad de brindar un tratamiento para una enfermedad específica, a pesar de los efectos secundarios que pueda desencadenar por su ingesta.

7.2.4 Docking molecular

Receptor de andrógenos (AR)

La proteína fue preprocesada para eliminar moléculas de agua provenientes de la cristalización, se adicionaron hidrógenos para la formación de puentes de hidrógeno. Posterior a la optimización se procedió a realizar la minimización de energía con un valor de RMSD (*Root Mean Square Deviation*) de convergencia para átomos pesados de 0.30 Å mediante campo de fuerza OPLS3e.

Se determinaron los parámetros óptimos para ambos sitios de unión del AR (2PIQ): se realizaron dos estudios de acoplamiento molecular, como se observa en la Figura 17; uno en el sitio de unión del ligando endógeno (círculo rojo) con las moléculas de testosterona (TST), dihidrotestosterona (DHT) y el inhibidor comercial flutamida, y otro en el sitio de unión alostérico (señalado en color azul) con el inhibidor RB1.

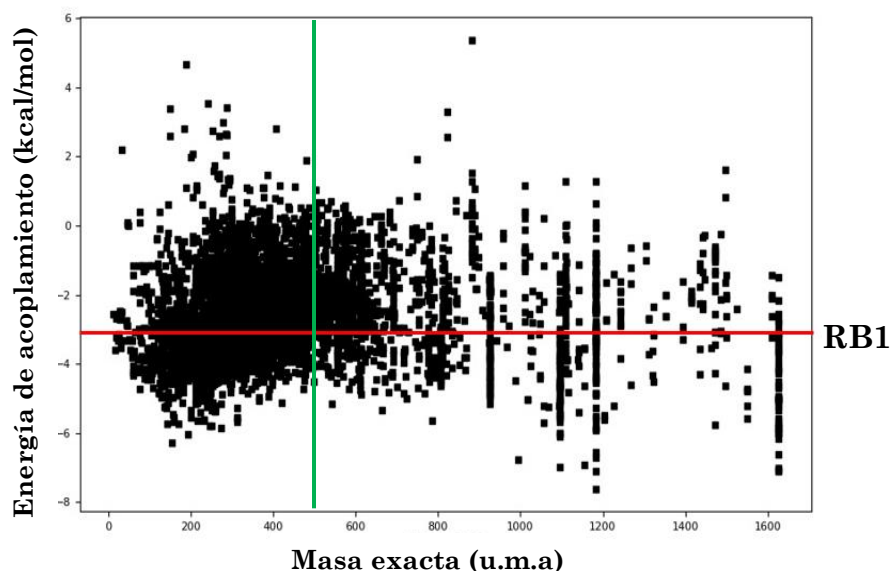


Figura 17. Cristal del Receptor de Andr6geno (AR) del PDB 2PIQ y determinaci3n de sitios de uni3n. Sitio de uni3n del ligando end3geno (c3rculo rojo) con las mol3culas de testosterona (TST), dihidrotestosterona (DHT) e inhibidor comercial flutamida y sitio de uni3n alost3rico (c3rculo azul) donde se puede unir el inhibidor RB1.

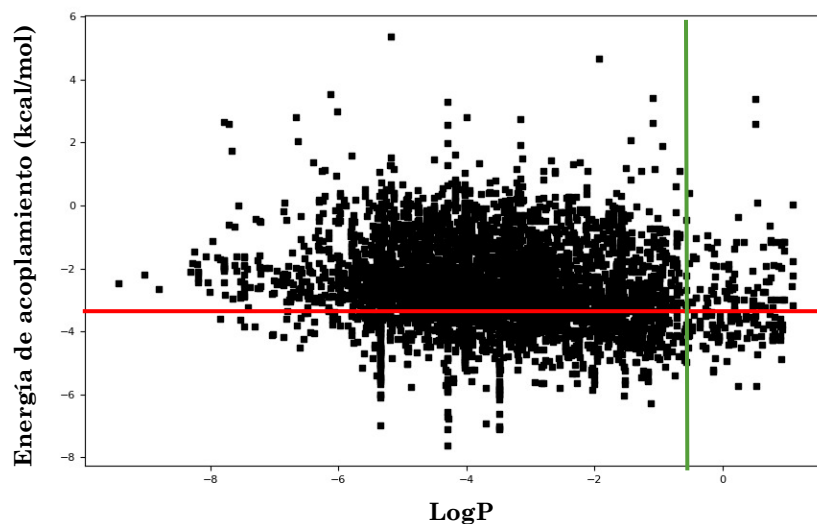
Sitio Alost3rico

Una vez determinados los par3metros 3ptimos de uni3n se realiz3 el acoplamiento molecular del AR con la base de datos de Drug Bank en el sitio del inhibidor alost3rico RB1, obteniendo con este inhibidor control su energ3a de acoplamiento (EA) que correspondi3 a **-3.42 kcal/mol**.

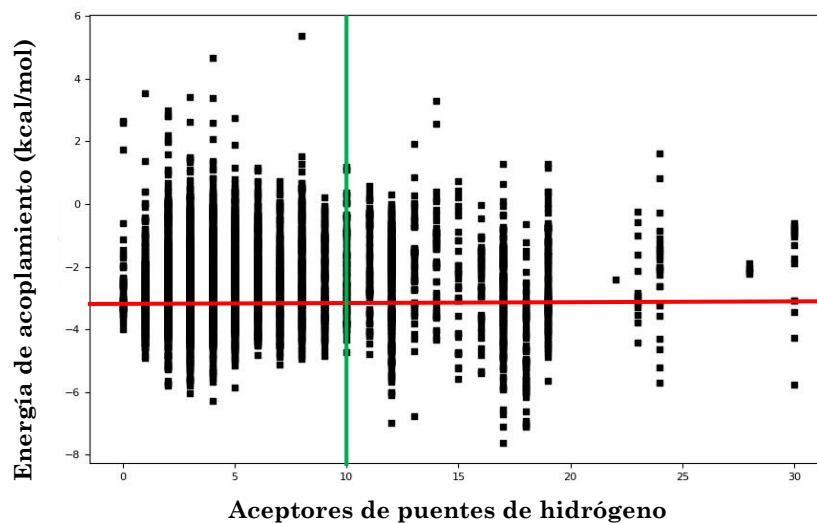
Por otro lado, en las Gráficas 1-6, podemos observar nuevamente las líneas verdes delimitando los valores máximos (LogP, aceptores de puente de hidrógeno, donadores de puente de hidrógeno) o los rangos (refractividad molar y número de átomos) que los fármacos deben tener para cumplir los CLG y aunado al filtro de EA cumplir con las características deseables en esta segunda etapa. En el anexo 1 se encuentran las gráficas correspondientes a cada proteína estudiada.



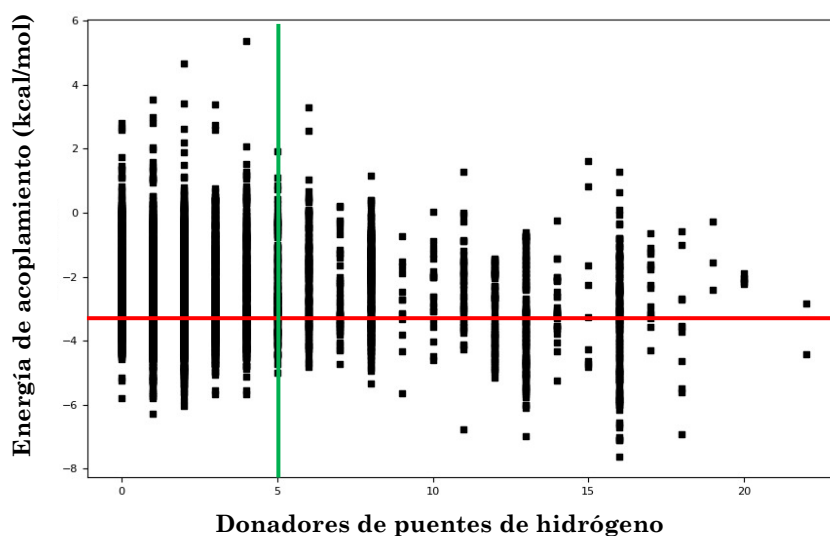
Gráfica 1. Energía de acoplamiento del *docking molecular* AR-fármacos contra la masa de las 6,428 isoformas de los 2,678 fármacos del DB. Línea roja: EA del inhibidor control RB1 y línea verde: masa exacta máxima para candidatos.



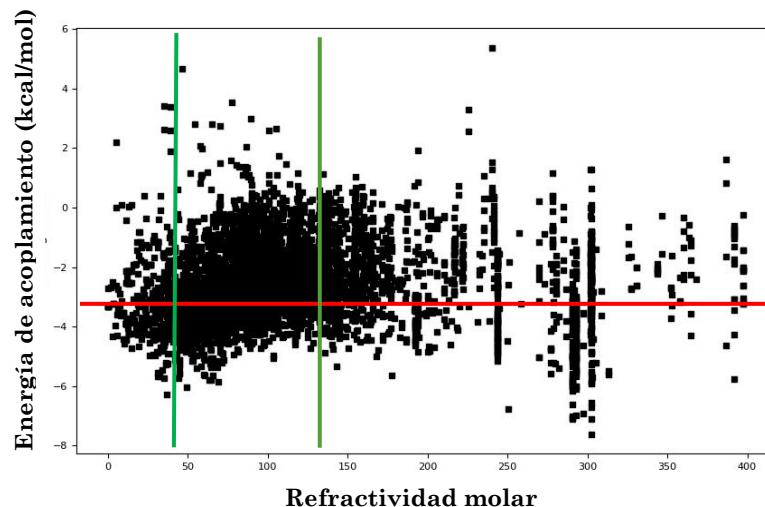
Gráfica 2. Energía de acoplamiento del *docking molecular* AR-fármacos contra LogP de las 6,428 isoformas de los 2,678 fármacos del DB. Línea roja: EA del inhibidor control RB1 y línea verde: valor de LogP máximo para candidatos.



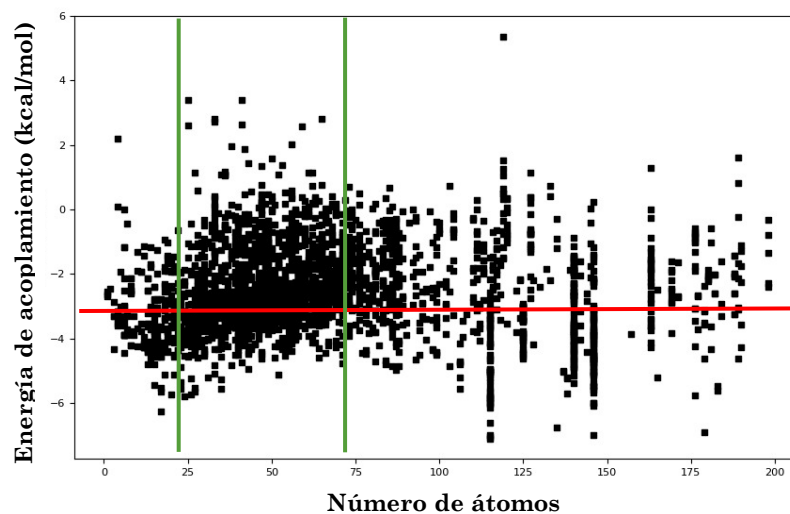
Gráfica 3. Energía de acoplamiento del *docking molecular* AR-fármacos contra aceptores de puentes de hidrógeno de las 6,428 isoformas de los 2,678 fármacos del DB. Línea roja: EA del inhibidor control RB1 y línea verde: valor máximo de aceptores de puente de hidrógeno para candidatos.



Gráfica 4. Energía de acoplamiento del *docking molecular* AR-fármacos contra donadores de puentes de hidrógeno de las 6,428 isoformas de los 2,678 fármacos del DB. Línea roja: EA del inhibidor control RB1 y línea verde: valor máximo de donadores de puentes de hidrógeno para candidatos.

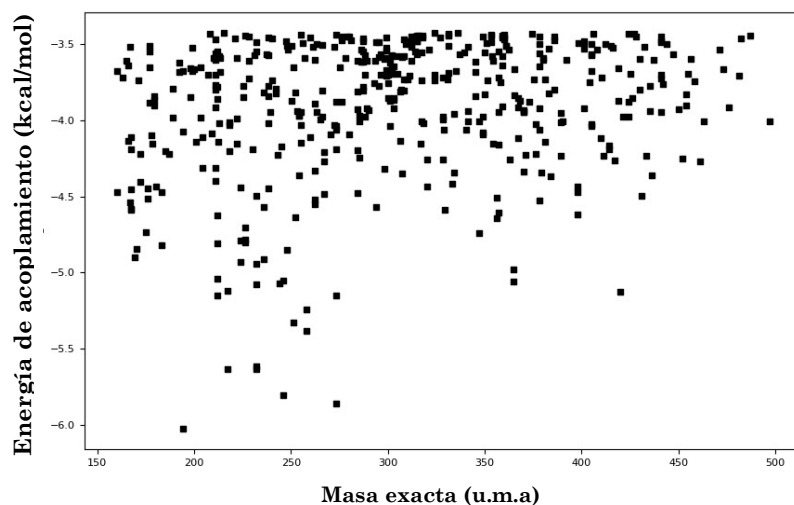


Gráfica 5. Energía de acoplamiento del *docking molecular* AR-fármacos contra refractividad molar de las 6,428 isoformas de los 2,678 fármacos del DB. Línea roja: EA del inhibidor control RB1 y líneas verdes: rango de refractividad molar para los candidatos.



Gráfica 6. Energía de acoplamiento del *docking molecular* AR-fármacos contra número de átomos de las 6,428 isoformas de los 2,678 fármacos del DB. Línea roja: EA del inhibidor control RB1 y líneas verdes: rango de número de átomos aceptable para candidatos.

Considerando todos los resultados de las gráficas 1 al 6, que muestran un gran número de interacciones, se aplicaron los filtros de EA y los CLG obteniendo los resultados que se muestran en la Gráfica 7, en donde se observa claramente cómo el número de interacciones ha disminuido, arrojando 573 tautómeros, estados de protonación y/o isoformas, las cuales corresponden a **447 fármacos**.



Gráfica 7. Energía de acoplamiento del *docking molecular* AR-fármacos contra masa exacta aplicados los filtros de EA y CLG.

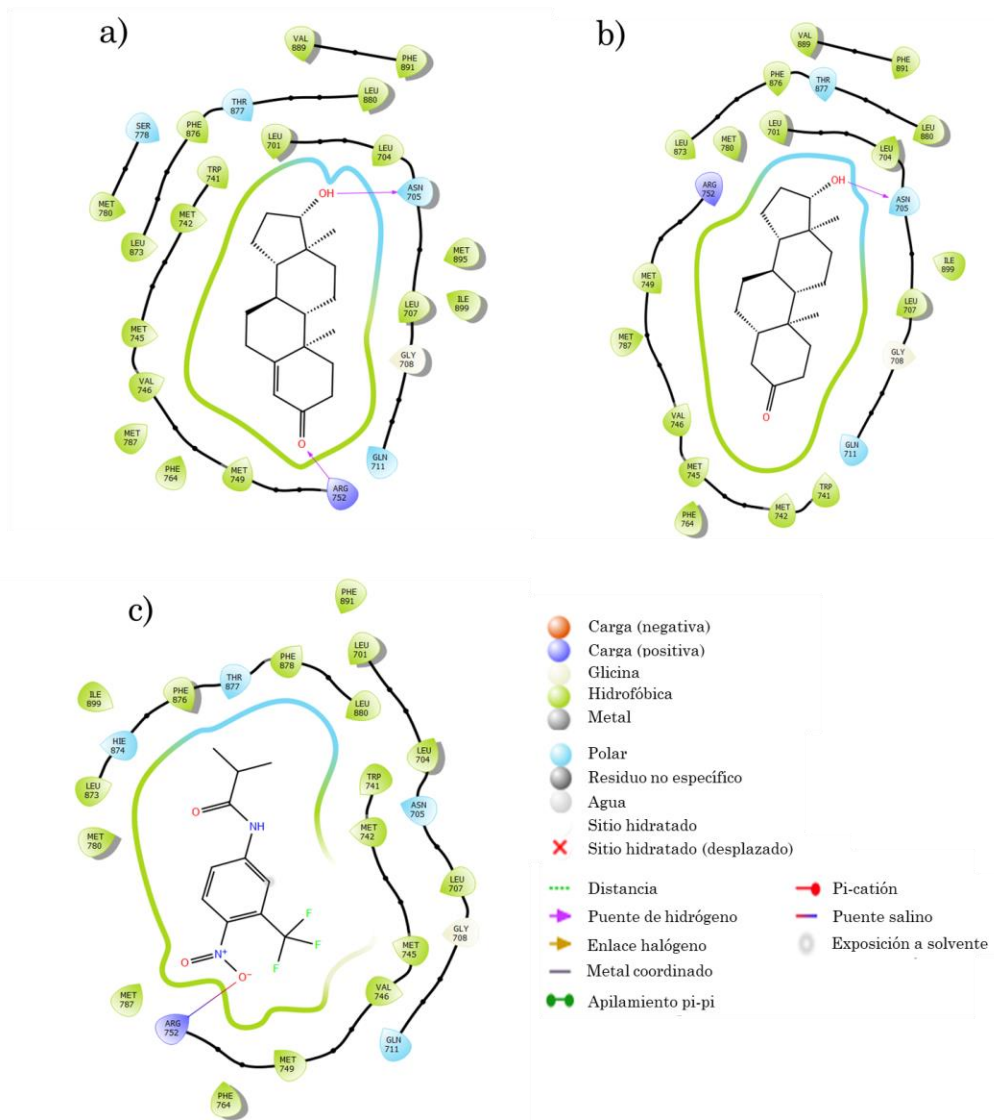
Sitio de unión del ligando endógeno

Una vez determinados los parámetros óptimos de unión con el AR, se obtuvieron las energías de acoplamiento con los ligandos endógenos (testosterona y dihidrotestosterona) y el inhibidor flutamida (inhibidor comercial), observando que los ligandos endógenos tienen una energía de acoplamiento mucho mejor que el inhibidor control, Tabla 11.

Tabla 11. Energías de acoplamiento del AR con ligandos e inhibidor control.

Ligandos endógenos o inhibidor control	Energía de acoplamiento (kcal/mol)	Sitio de unión
Testosterona	-9.8	Ligando endógeno
Dihidrotestosterona	-9.0	Ligando endógeno
Flutamida	-6.75	Ligando endógeno

Se realizó el análisis de las interacciones correspondientes a la testosterona, la dihidrotestosterona y el inhibidor comercial (flutamida) en el sitio de unión del ligando endógeno, las 3 moléculas comparten 21 aminoácidos con los cuales interaccionan Figura 19, en la Tabla 12 se muestran los residuos más importantes:

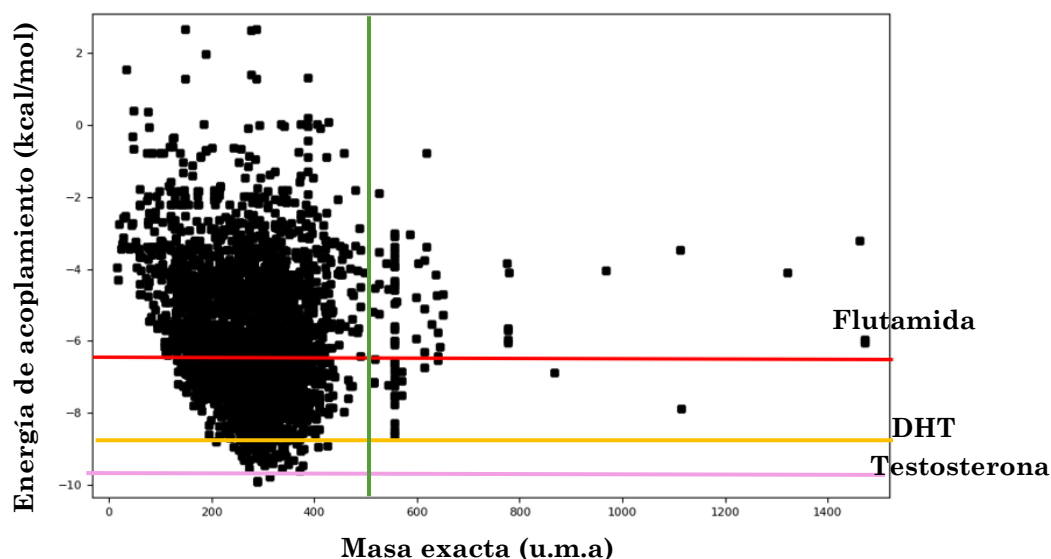


Podemos observar en la Figura 19 y en la Tabla 12 que los residuos más importantes son: Asn705, Arg752, Leu705 dado que estos interactúan por medio de puentes de hidrógeno (pdh) los cuales son más estables. Así mismo, resulta interesante que en el caso de flutamida no existen interacciones por puentes de hidrógeno, pero el conjunto de interacciones en su mayoría son hidrofóbicas que le brindan estabilidad a las moléculas para ocasionar un efecto inhibitorio.

Tabla 12. Interacciones que presentan los ligandos endógenos y flutamida con los residuos del AR.

Ligando endógeno o inhibidor control	Residuos
Testosterona	Asn705 (polar, pdh), Arg 752 (carga positiva, pdh), Val 889 (hidrofóbica)
Dihidrotestosterona	Leu705 (hidrofóbica, pdh), Val889 (hidrofóbica)
Flutamida	Interacciones hidrofóbicas en su mayoría, polares, de carga positiva y puente salino (Arg 752).

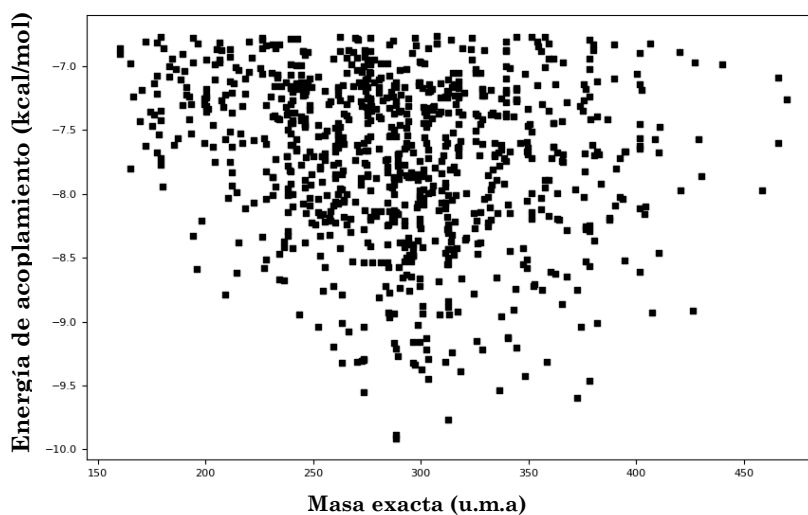
Con respecto al acoplamiento molecular del ARE con la base de datos de Drug Bank, se llevó a cabo el mismo procedimiento para el sitio de unión del ligando endógeno (LE). Podemos observar en la Gráfica 8 el resultado obtenido del acoplamiento de la proteína con la base de datos, en donde de manera global. Se observan 5432 interacciones, se tomaron en cuenta aquellas que tuvieran una EA mejor que flutamida (todas aquellas debajo de la línea roja) y que cumplieran los CLG (se muestra solo la gráfica en función de la masa como CLG, en el Anexo 1 se muestran las 6 gráficas con los diferentes CLG).



Gráfica 8. Energía de acoplamiento del *docking molecular* AR (sitio de unión del ligando endógeno)-fármacos contra la masa de las 6,428 isoformas de los 2,678 fármacos del DB.

Se aplicaron nuevamente los filtros de EA y todos los parámetros de los CLG (masa exacta, LogP, aceptores, donadores de puentes de hidrógeno, refractividad molar y número de átomos). En este caso se tomó en cuenta la EA de flutamida (-6.75 kcal/mol), debido a que los compuestos propuestos como inhibidores deben superar dicha energía para ser más afines que el inhibidor comercial. Gráfica 9, representa a 895 isoformas,

estados de protonación y/o tautómeros que interactúan, los cuales corresponden a **580 fármacos**.



Gráfica 9. Energía de acoplamiento del *docking molecular* AR (sitio de unión del ligando endógeno)-fármacos contra masa exacta aplicados los filtros de EA y CLG.

Total de fármacos que interactúan con el AR.

Para continuar con el estudio se realizó la unificación de los fármacos que interactúan tanto en el sitio alostérico (ARa) como en el sitio de unión del ligando endógeno (ARe) del AR, así como los fármacos que interactúen en ambos sitios, lo anterior se representa en el siguiente diagrama de Venn, Figura 20.



Figura 20. Total de fármacos que aparentemente interactúan con AR. Diagrama de Venn, sitio alostérico (ARa), sitio de unión del ligando endógeno (ARe).

En la Figura 20 se observan los conjuntos de los fármacos obtenidos con anterioridad a través de los filtros, se encontraron 176 fármacos que aparentemente interactúan con el sitio alostérico (Ara), 309 con el sitio de unión del ligando endógeno (Are) y 271 con los 2 sitios; finalmente se obtiene un total de **756 fármacos** para estudiar en la siguiente fase.

Receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)

El cristal utilizado para el acoplamiento molecular es el 6DUK (código PDB) con una resolución 2.20 Å, en la Figura 21 inciso a) se observa la representación 3D del acoplamiento molecular entre EGFR y lapatinib, cabe resaltar que tanto los inhibidores y fármacos interactúan dentro del sitio de unión de la proteína delimitado anteriormente con ayuda del módulo GGG.

Se calcularon las energías de acoplamiento de los inhibidores comerciales lapatinib (**-7.53 kcal/mol**) y erlotinib (**-5.7 kcal/mol**), también se estudiaron las interacciones más importantes, Figura 21, incisos b) y c), se observa una mayor cantidad de interacciones hidrofóbicas.

Podemos observar en la Tabla 13 que los residuos de EGFR que interactúan por puente de hidrógeno son: Glu749, Glu865 y Lys875 en el caso de lapatinib y Lys745 en el caso de erlotinib, la diferencia entre sus EA se puede relacionar con una menor cantidad de puentes de hidrógeno por parte de este último inhibidor.

Tabla 13. Residuos de interacción de EGFR con los inhibidores.

Inhibidor control	Residuos
Lapatinib	Glu749 (carga negativa, pdh), Glu865 (carga negativa, pdh), Lys875 (carga positiva, pdh)
Erlotinib	Lys 745 (carga positiva, pdh)

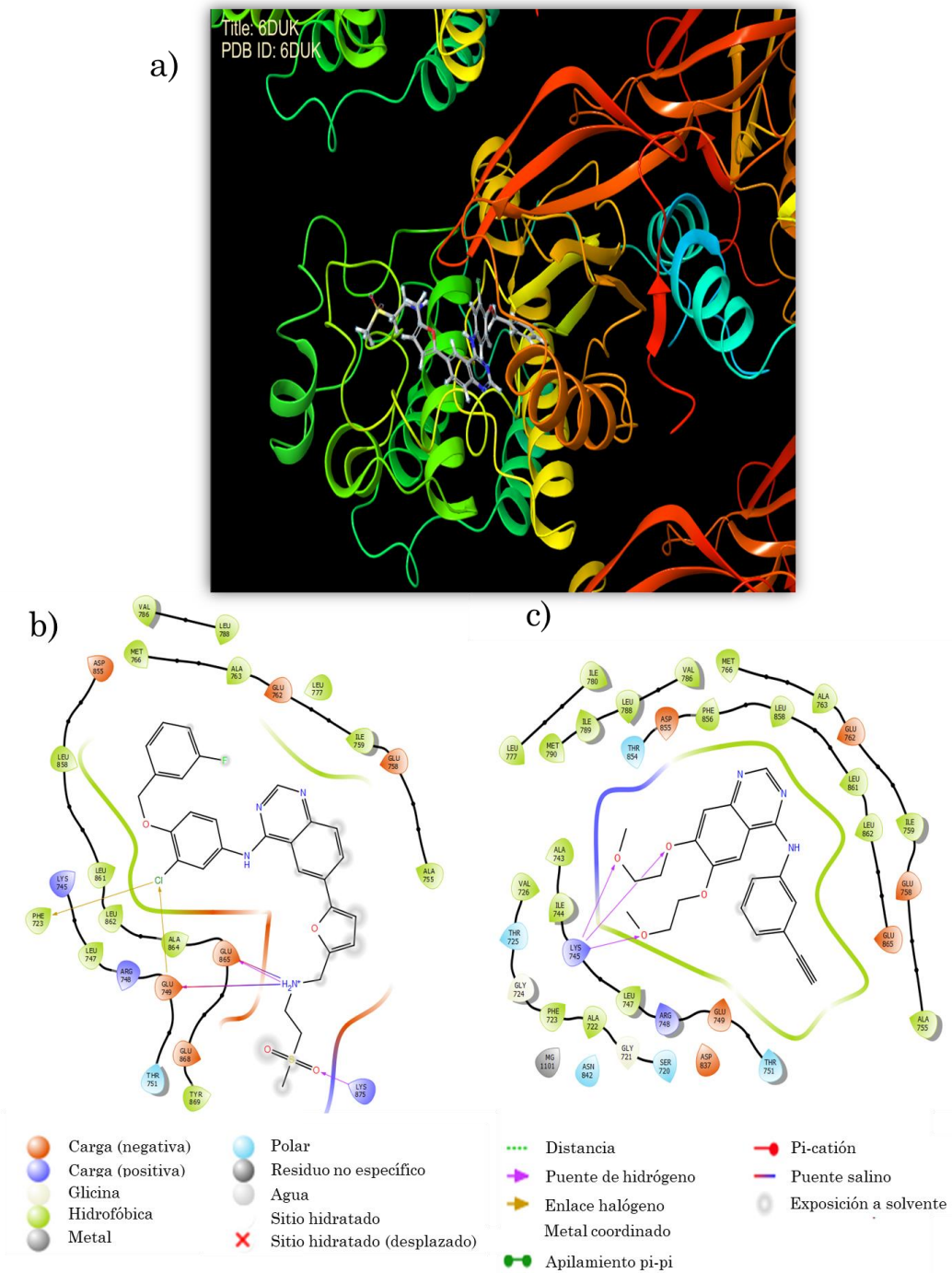
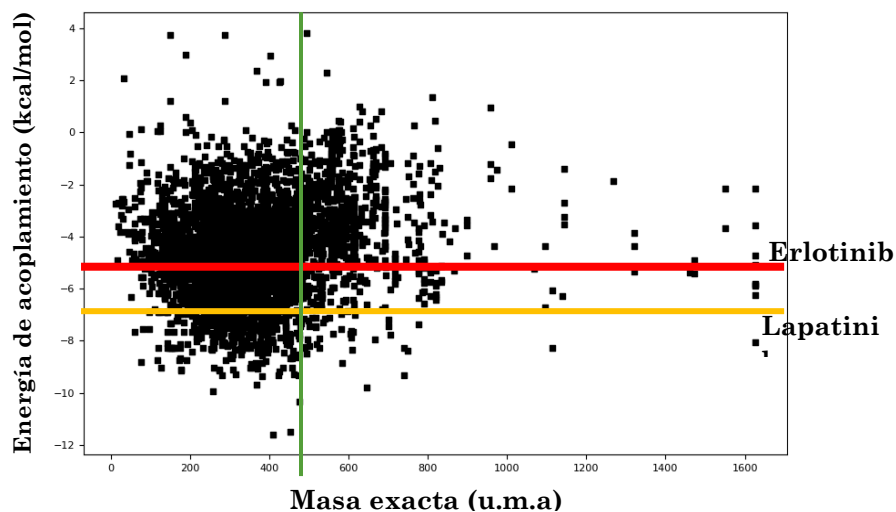


Figura 21. Representación 3D y 2D del acoplamiento entre EGFR y sus inhibidores.

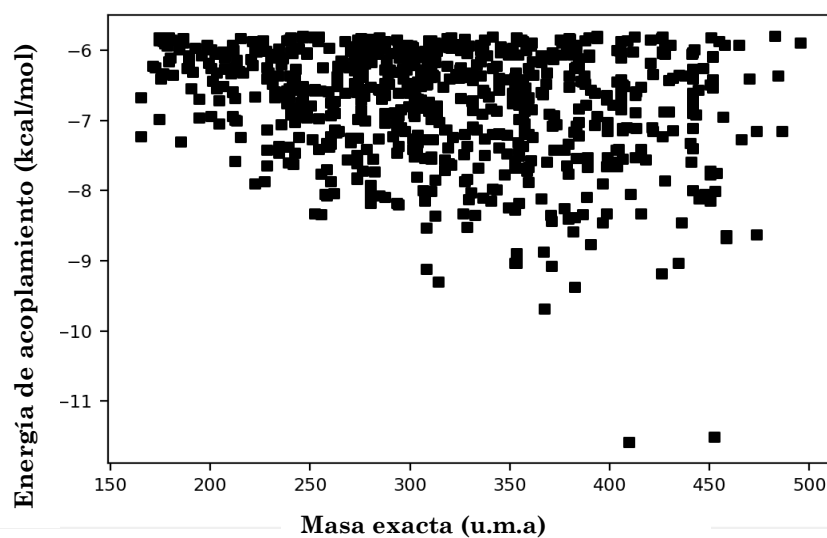
a) representación 3D del acoplamiento entre proteína y lapatinib, representación 2D de los inhibidores de EGFR b) lapatinib y c) erlotinib y las interacciones con los residuos de aminoácidos de la proteína.

Con la base de datos de Drug Bank, se obtuvieron 4550 isoformas, estados de protonación y/o tautómeros que interaccionaron de manera global con EGFR, Gráfica 10 (se muestra solo la gráfica en función de la masa como CLG, en el Anexo 1 se muestran las 6 gráficas con los diferentes CLG).



Gráfica 10. Energía de acoplamiento del *docking molecular* EGFR-fármacos contra la masa de las 6,428 isoformas de los 2,678 fármacos del DB.

Una vez aplicados los filtros de EA (con el inhibidor erlotinib) y todos los CLG, el número de interacciones disminuyó a 1403 isoformas, estados de protonación y/o tautómeros, que corresponden a **508 fármacos** para estudio posterior, Gráfica 11.



Gráfica 11. Energía de acoplamiento del *docking molecular* EGFR-fármacos contra masa exacta aplicados los filtros de EA y CLG.

Subunidad catalítica alfa de PI3K (p110 α)

El cristal utilizado para el acoplamiento molecular es el 6OAC (código PDB) con una resolución de 3.15 Å, en la Figura 22 inciso a) se observa la representación 3D del acoplamiento molecular entre p110 α y todos sus inhibidores, cabe resaltar que los inhibidores y fármacos interaccionan dentro del sitio de unión de la proteína delimitado anteriormente con ayuda del módulo GGG.

Las energías de acoplamiento de los inhibidores comerciales fueron **-8.33 kcal/mol** para omipalisib, **-8.08 kcal/mol** para alpelisib y **-7.7 kcal/mol** para el caso de burpalisib, así mismo se obtuvieron los esquemas 2D para observar los tipos de interacción de cada uno de ellos, Figura 22, incisos b), c) y d).

En la Tabla 14 se observan los residuos de p110 α que interaccionan formando un puente de hidrogeno, Val851 está presente en los 3 inhibidores, Asp933 se encuentra interaccionando en omipalisib y burpalisib, en los 3 casos se observan 3 interacciones de tipo puente de hidrógeno, pero la diferencia entre sus EA se puede relacionar con los tipos de aminoácidos que están formando dichos puentes.

Tabla 14. Interacciones de p110 α con los inhibidores.

Inhibidor control	Residuos
Omipalisib	Lys802 (carga positiva, pdh), Val851 (hidrofóbica, pdh), Asp933 (carga negativa, pdh)
Alpelisib	Val851 (hidrofóbica, pdh), Ser854 (polar, pdh), Gln859 (polar, pdh)
Burpalisib	Val851 (hidrofóbica, pdh), Asp933 (carga negativa, 2 pdh)

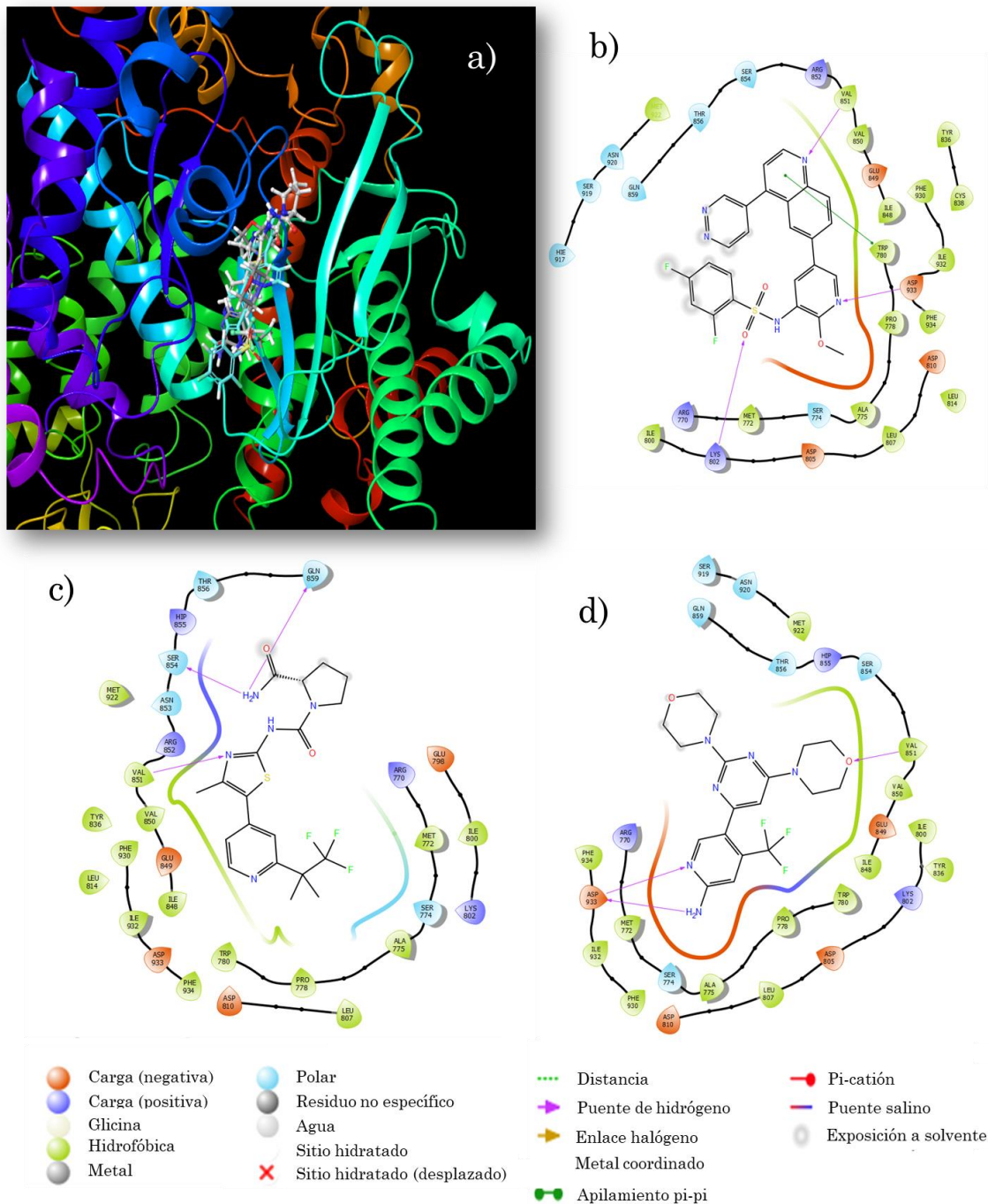
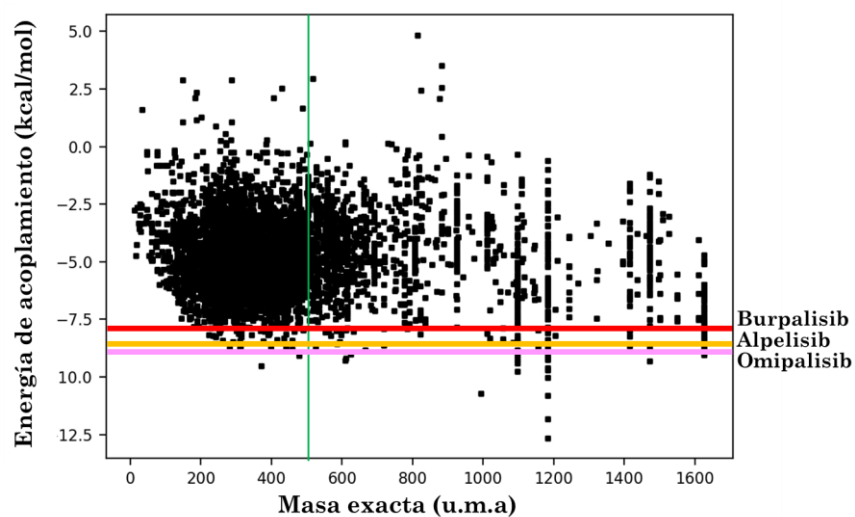


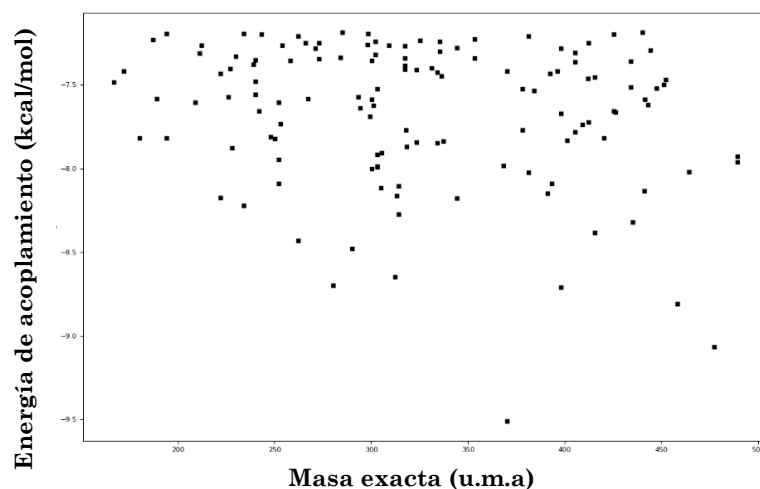
Figura 22. Representación 3D y 2D del acoplamiento entre p110α y sus inhibidores. a) representación 3D del acoplamiento entre proteína y sus inhibidores, representación 2D de los inhibidores de p110α b) omipalisib, c) alpelisib y d) burpulisib, y las interacciones con los residuos de aminoácidos de la proteína.

Por otro lado, el estudio de acoplamiento global entre p110 α y la base de datos arrojó un total de **5371** isoformas, estados de protonación y/o tautómeros que se encuentran interaccionando, Gráfica 12 (se muestra solo la gráfica en función de la masa como CLG, en el Anexo 1 se muestran las 6 gráficas con los diferentes CLG).



Gráfica 12. Energía de acoplamiento del *docking molecular* p110 α -fármacos contra la masa de las 6,428 isoformas de los 2,678 fármacos del DB.

Nuevamente se tomó en cuenta la EA en este caso de burpalisib y todos los CLG, se obtuvo 130 isoformas, tautómeros y/o estados de protonación una vez aplicados los filtros, Gráfica 13, los cuales corresponden a **115 fármacos** que continúan en el estudio.



Gráfica 13. Energía de acoplamiento del *docking molecular* p110 α -fármacos contra masa exacta aplicados los filtros de EA y CLG.

Diana de rapamicina en células de mamífero (mTOR)

El cristal utilizado para el acoplamiento molecular es el 4JSX (código PDB) con una resolución 3.50 Å, en la Figura 23 inciso a) se observa la representación 3D del acoplamiento molecular entre mTOR y TORKinib, cabe resaltar que los inhibidores y fármacos interactúan dentro del sitio de unión de la proteína delimitado anteriormente con ayuda del módulo GGG.

Las mejor EA obtenida del acoplamiento molecular entre los inhibidores control fue de **-4.89 kcal/mol** que corresponde a TORKinib, seguida de sapanisertib con **-3.93 kcal/mol**. Se analizaron los residuos aminoacídicos de mTOR que interactúan con ambos, Figura 23, incisos b) y c).

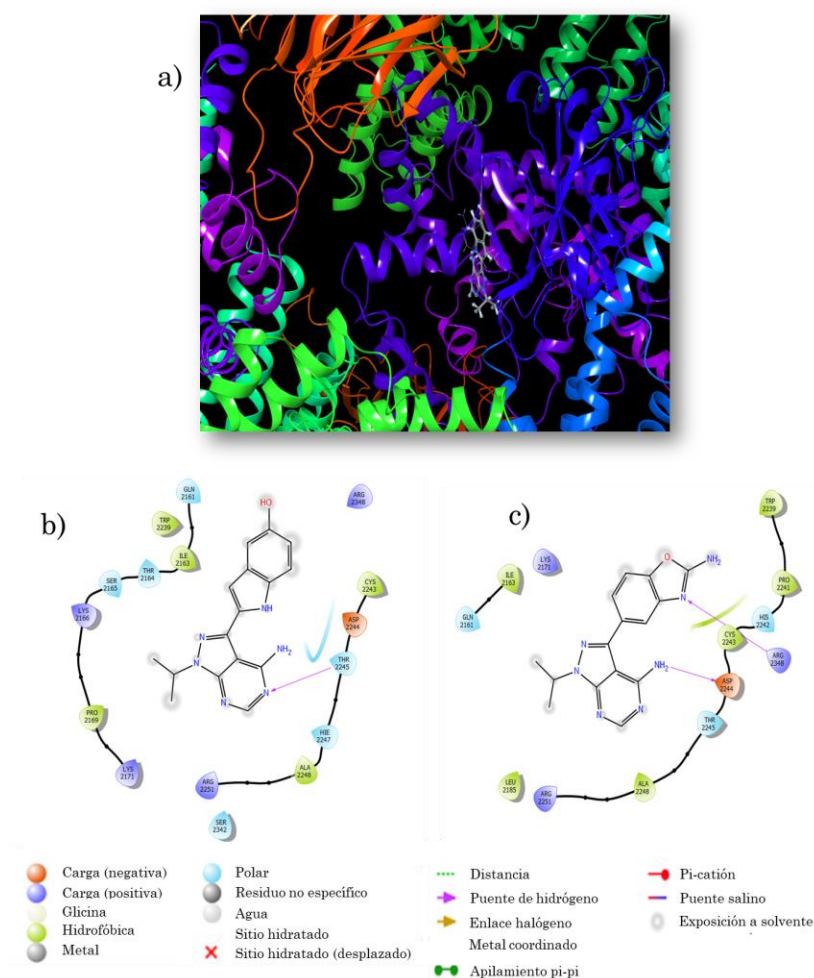


Figura 23. Representación 3D y 2D del acoplamiento entre mTOR y sus inhibidores.

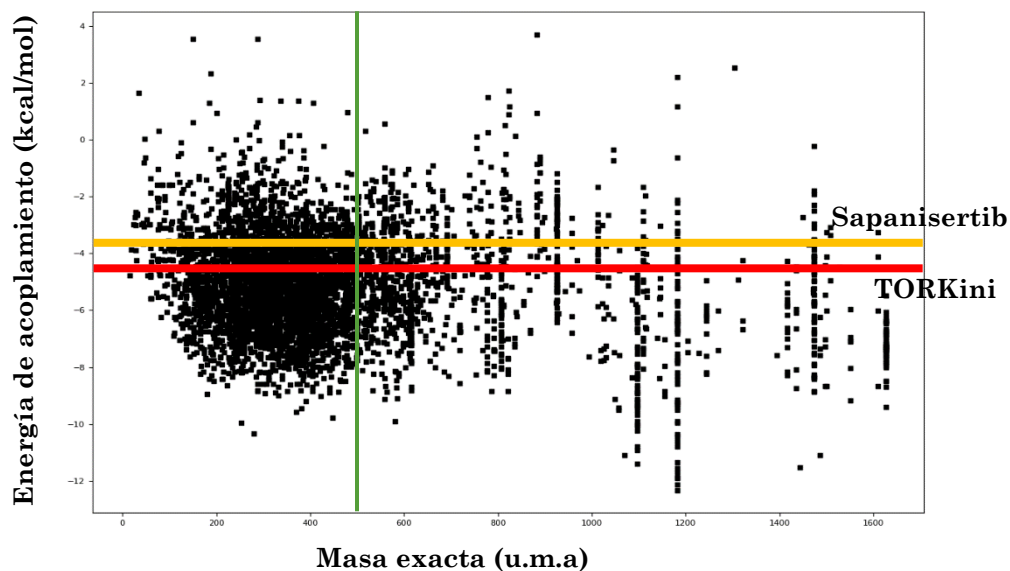
a) Representación 3D del acoplamiento entre proteína y TORKinib. Representación 2D de los inhibidores de mTOR: b) TORKinib y c) sapanisertib y las interacciones con los residuos aminoacídicos de la proteína.

En la Tabla 15 se resumen los aminoácidos de mTOR que presentan interacciones tipo puente de hidrógeno; en el caso de TORKinib solamente se presenta uno en Thr2245, por otro lado, sapanisertib presenta uno en Asp2244 y otro en Arg2348, la diferencia entre las EA se puede deber a que en el caso de TORKinib existen dos aminoácidos más interaccionando, lo cual podría darle mayor estabilidad al inhibidor, dando como resultado una EA más favorable.

Tabla 15. Interacciones de mTOR con los inhibidores.

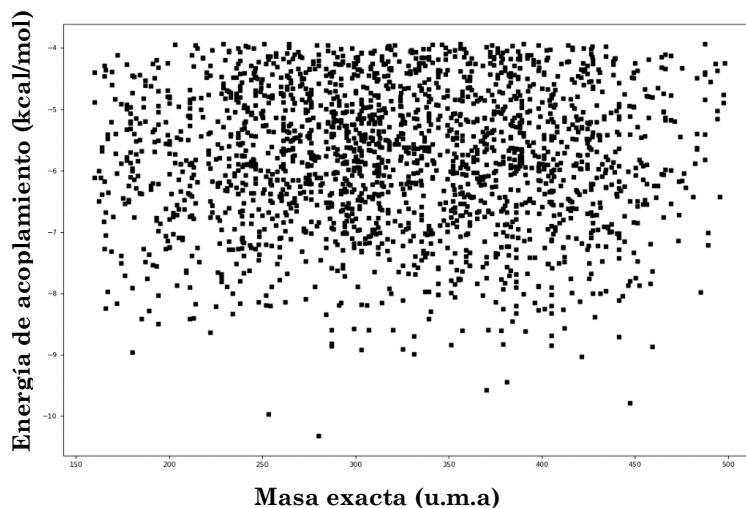
Inhibidor control	Residuos
TORKinib	Thr2245 (polar, pdh)
Sapanisertib	Asp2244 (carga negativa, pdh), Arg2348 (carga positiva, pdh)

En el estudio de acoplamiento global entre mTOR y la base de datos de Drug Bank, podemos observar 5411 tautómeros, isoformas y/o estados de protonación totales que interaccionan con la proteína en función de la masa de los fármacos, Gráfica 14 (se muestra solo la gráfica en función de la masa como CLG, en el Anexo 1 se muestran las 6 gráficas con los diferentes CLG).



Gráfica 14. Energía de acoplamiento del *docking molecular* mTOR -fármacos contra la masa de las 6,428 isoformas de los 2,678 fármacos del DB.

Una vez aplicados los filtros, el número de interacciones se redujo a 2106 tautómeros, isoformas y/o estados de protonación (Gráfica 15), lo que corresponde a **1152 fármacos**, todo esto tomándose en cuenta la EA de sapanisertib y todos los CLG.



Gráfica 15. Energía de acoplamiento del *docking molecular* mTOR-fármacos contra masa exacta aplicados los filtros de EA y CLG.

Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR)

El cristal utilizado para el acoplamiento molecular es el 5GRN (código PDB) con una resolución 1.77 Å, en la Figura 24 inciso a) se observa la representación 3D del acoplamiento molecular entre PDGFR e imatinib, cabe resaltar que los inhibidores y fármacos interactúan dentro del sitio de unión de la proteína, delimitado anteriormente con ayuda del módulo GGG.

La mejor EA obtenida por parte de los inhibidores pertenece a imatinib con **-12.03 kcal/mol**, seguido de masitinib con **-10.71 kcal/mol** y por último lenvatinib con **-6.57 kcal/mol**. En la Figura 24, incisos b), c) y d) se observan las interacciones de PDGFR con estos inhibidores.

En la Tabla 16 podemos observar los aminoácidos de PDGFR que presentan interacciones por puente de hidrógeno, los cuales son Thr674, Asp836 y Cys677 para el caso de imatinib y solo los 2 primeros en el caso de masitinib. Por otra parte, se presentan otro tipo de interacciones, tipo pi-cación en Lys627 en todos los inhibidores y de apilamiento pi-pi en donde el anillo aromático de Phe837 interactúa con grupos aromáticos de imatinib y masitinib. Podemos inferir que imatinib tiene una mejor EA debido a los tipos de interacciones que presenta, que son más estables que las encontradas en masitinib o lenvatinib, en donde este último presenta la EA menos

favorable debido a la ausencia de otro tipo de fuerzas que interaccionan en comparación a los otros 2 inhibidores.

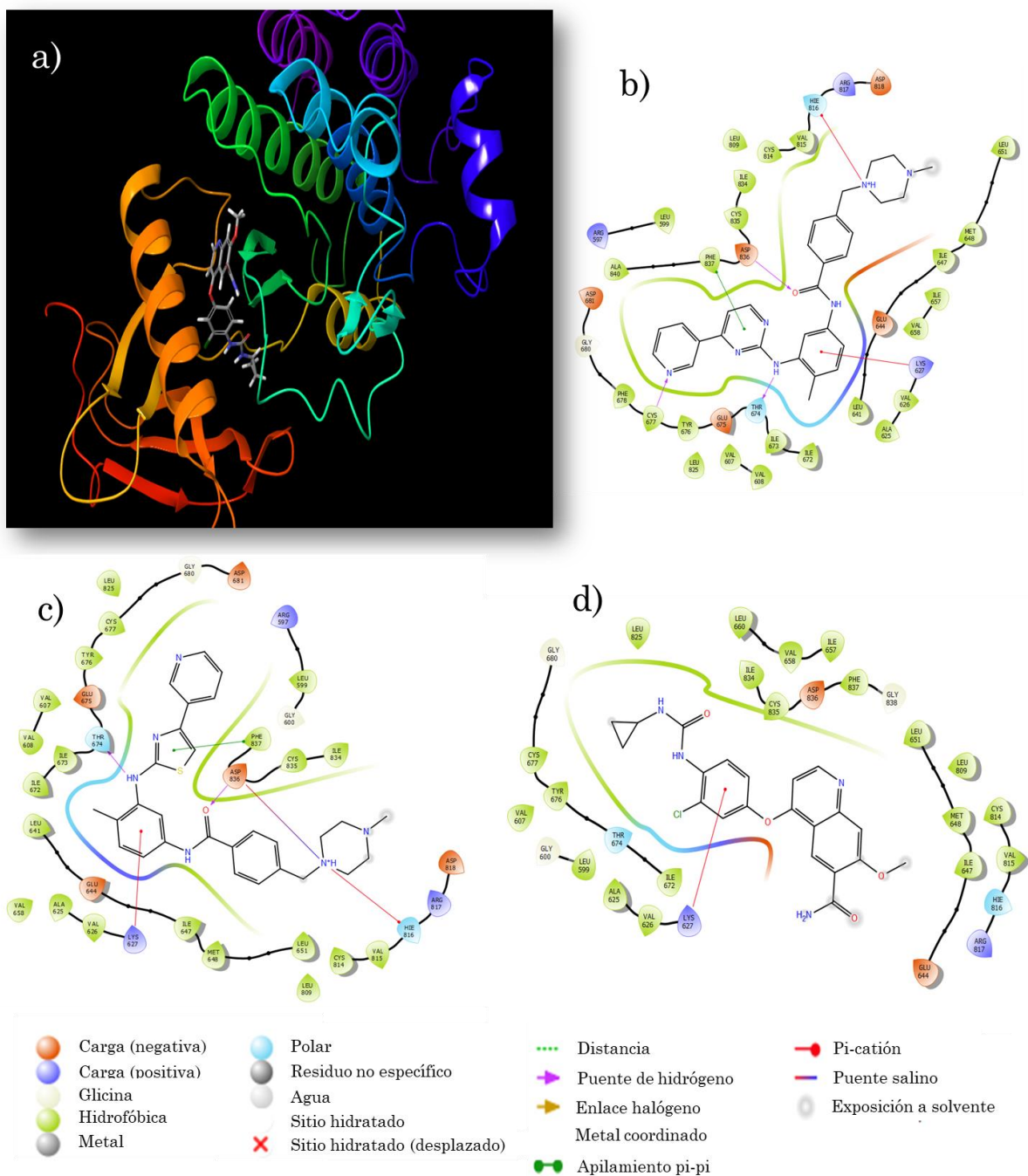
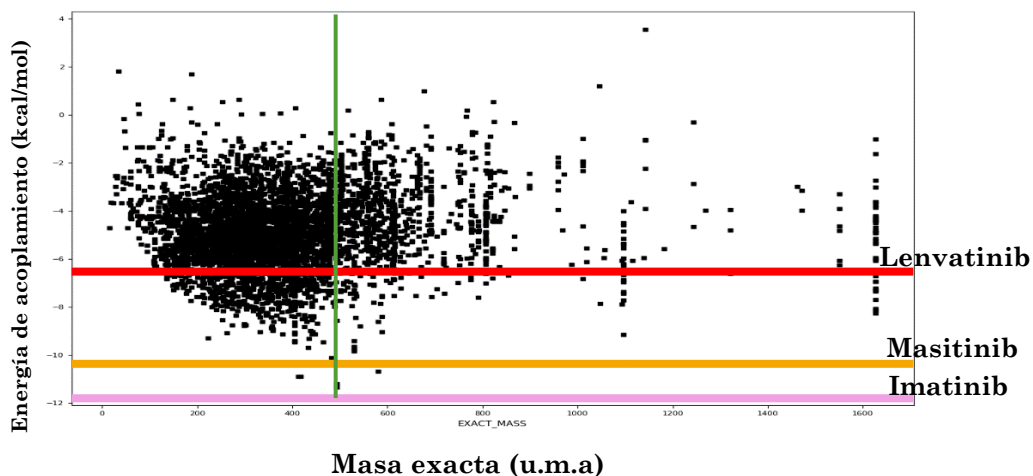


Figura 24. Representación 3D y 2D del acoplamiento entre PDGFR y sus inhibidores.
a) representación 3D del acoplamiento entre proteína e imatinib, representación 2D de los inhibidores de PDGFR b) imatinib, c) masitinib y d) lenvatinib y las interacciones con los residuos de aminoácidos de la proteína.

Tabla 16. Interacciones de PDGFR con inhibidores.

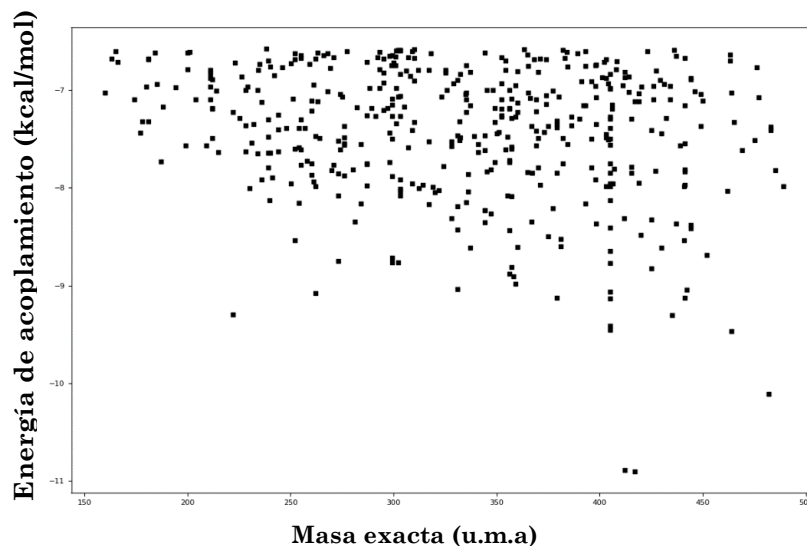
Inhibidor control	Residuos
Imatinib	Lys627 (carga positiva, pi-cation), Thr674 (Polar, pdh), Cys677 (hidrofóbica, pdh), Hie816 (polar, pi-cation), Asp836 (carga negativa, pdh, puente salino), Phe837 (hidrofóbica, pi-pi stacking)
Masitinib	Lys627 (carga positiva, pi-cation), Thr674 (Polar, pdh), Hie816 (polar, pi-cation), Asp836 (carga negativa, pdh), Phe837 (hidrofóbica, pi-pi stacking)
Lenvatinib	Lys627 (carga positiva, pi-cation)

Por otro lado, los resultados del acoplamiento molecular proteína-fármaco, arrojaron 4973 tautómeros, isoformas y/o estados de protonación que interactúan con PDGFR, Gráfica 16 (se muestra solo la gráfica en función de la masa como CLG, en el Anexo 1 se muestran las 6 gráficas con los diferentes CLG).



Gráfica 16. Energía de acoplamiento del *docking molecular* PDGFR -fármacos contra la masa de las 6,428 isoformas de los 2,678 fármacos del DB.

Nuevamente se aplicaron los filtros de EA y todos los CLG, tomándose como referencia la EA de lenvatinib, disminuyendo así la cantidad de interacciones a 440 tautómeros, isoformas y/o estados de protonación, las cuales corresponden a **312 fármacos**, Gráfica 17.



Gráfica 17. Energía de acoplamiento del *docking molecular* PDGFR-fármacos contra masa exacta aplicados los filtros de EA y CLG.

Ligando 1 de muerte programada (PD-L1)

El cristal utilizado para el acoplamiento molecular es el 5NIU (código PDB) con una resolución 2.01 Å, en la Figura 25 inciso a) se observa la representación 3D del acoplamiento molecular entre PD-L1 y BMS-202, cabe resaltar que los inhibidores y fármacos interactúan dentro del sitio de unión de la proteína delimitado anteriormente con ayuda del módulo GGG.

Por último, los inhibidores experimentales de PD-L1 presentaron una EA de **-10.77 kcal/mol**, **-9.56 kcal/mol** y **-7.22 kcal/mol** para BMS-202, BMS-1, BMS-1166 respectivamente. En la Figura 25, incisos b), c) y d) se muestran los esquemas 2D donde se presentan las interacciones entre la proteína y los inhibidores.

En la Tabla 17 se muestran los principales residuos aminoácidos de PD-L1 que interactúan con los inhibidores, siendo Phe19, Ala21 y Asp122, los cuales presentan puentes de hidrógeno en la cadena A de la proteína. Para BMS-1166 no se observa Asp122 con este tipo de interacción, además el anillo aromático de Tyr56 de la cadena B tiene una interacción tipo apilamiento pi-pi con los grupos aromáticos de BMS-202 y BMS-1, dichos inhibidores presentan mejores EA en comparación con BMS-1166, ya que cuentan con un mayor número de interacciones.

Tabla 17. Interacciones entre la proteína PD-L1 y los inhibidores.

Inhibidor control	Residuos
BMS-202	PheA19 (polar, pdh), TyrB56 (hidrofóbica, pi-pi stacking), AlaA121 (hidrofóbica, pdh), AspA122 (carga negativa, pdh)
BMS-1	TyrB56 (hidrofóbica, pi-pi stacking), AspA122 (carga negativa, pdh), LysA124 (carga positiva, pdh)
BMS-1166	PheA19 (hidrofóbica, pdh), AlaA121 (hidrofóbica, pdh)

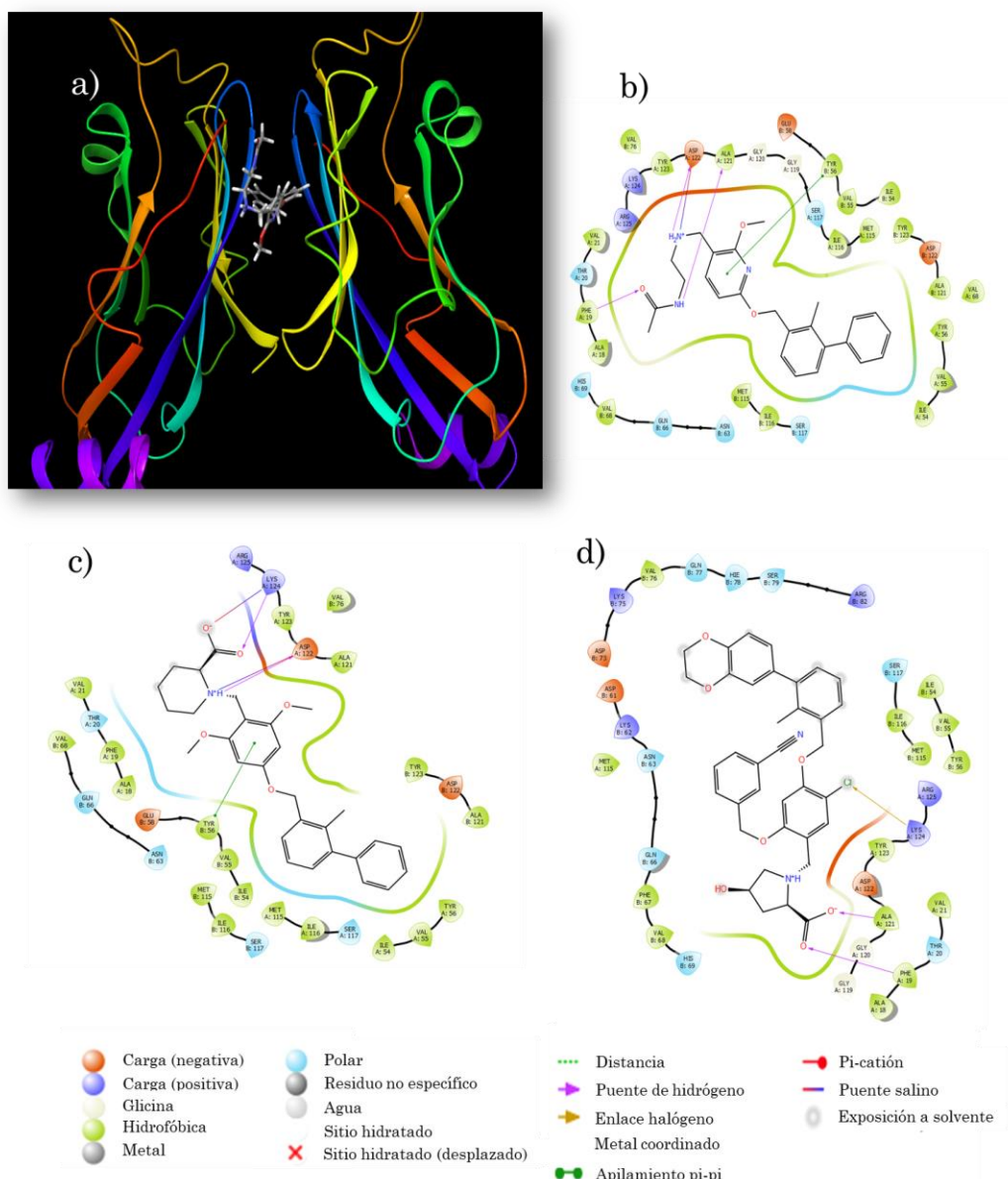
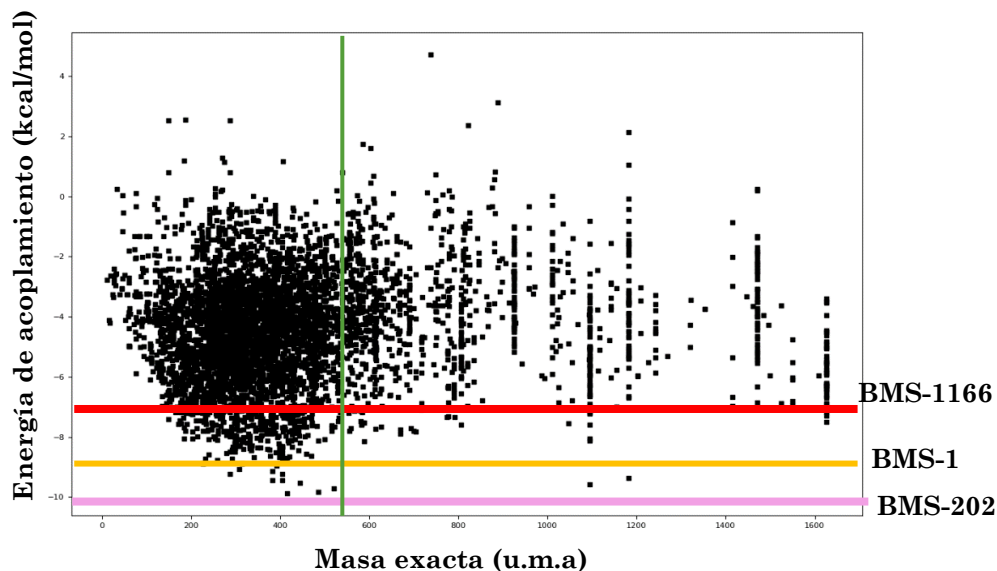


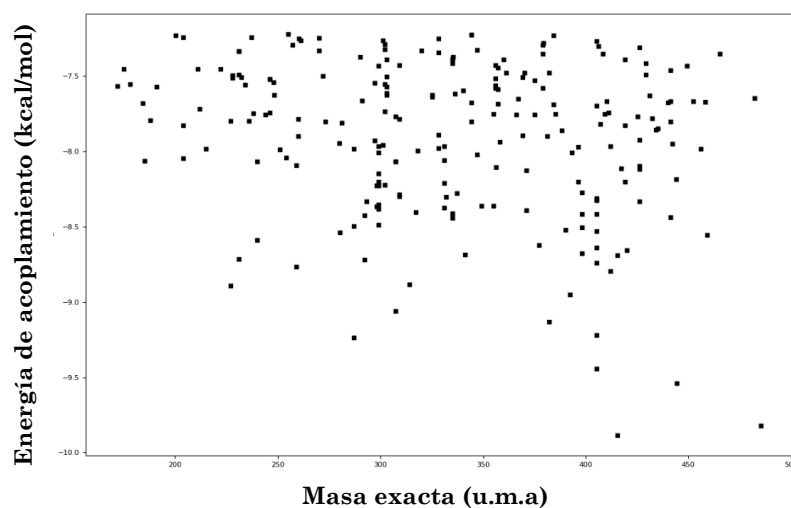
Figura 25. Representación 3D y 2D del acoplamiento entre PD-L1 y sus inhibidores. a) representación 3D del acoplamiento entre proteína y BMS-202, representación 2D de los inhibidores de PD-L1 de: a) BMS-202, b) BMS-1 y c) BMS-1166 y las interacciones con los residuos de aminoácidos de la proteína.

En el *docking molecular*, las interacciones de PD-L1 totales fueron con 5220 tautómeros, isoformas y/o estados de protonación, Gráfica 18 (se muestra solo la gráfica en función de la masa como CLG, en el Anexo 1 se muestran las 6 gráficas con los diferentes CLG).



Gráfica 18. Energía de acoplamiento del *docking molecular* PD-L1-fármacos contra la masa de las 6,428 isoformas de los 2,678 fármacos del DB.

Una vez aplicados los filtros de EA, tomando como referencia el inhibidor BMS-1166 y todos los CLG, se redujo el número de interacciones a 223 tautómeros, isoformas y/o estados de protonación, lo cual corresponde a **159 fármacos**, Gráfica 19.



Gráfica 19. Energía de acoplamiento del *docking molecular* PD-L1-fármacos contra masa exacta aplicados los filtros de EA y CLG.

En la Tabla 18 se resume el número de interacciones totales de cada proteína resultado del acoplamiento molecular con la base de datos de fármacos para reposicionar. Se observa un gran número de interacciones iniciales que con ayuda de los filtros de EA y CLG disminuyeron, arrojando un número de fármacos candidatos en esta segunda etapa menor al inicial, donde mTOR es la proteína con más candidatos (1152 fármacos) y p110 α la proteína con un menor número de candidatos (115 fármacos).

Tabla 18. Resumen de interacciones proteína-fármaco y número final de fármacos candidatos en la segunda etapa

Proteína	Interacciones totales iniciales	Interacciones aplicando los filtros	Número de fármacos finales
ARae	a: 6427 e: 5432	a: 573 e: 895	ae756
EGFR	4550	1403	508
p110 α	5371	130	115
mTOR	5411	2106	1152
PDGFR	4973	440	312
PD-L1	5220	223	159

a: sitio alostérico, b: sitio de unión del ligando endógeno

Aunque se logró disminuir el número de fármacos considerablemente es necesario realizar otro tipo de filtrado para poder delimitar los mejores candidatos para cada proteína.

7.3 Tercera etapa

Esta etapa consistió en dividir el análisis en dos, por un lado, encontrar candidatos monoproteína, es decir fármacos que se predice que solamente interactúen con solo 1 de nuestras proteínas propuestas y no con las otras 5 y, por otro lado: encontrar candidatos multiproteína, refiriéndonos a aquellos fármacos que se predice que interaccionen con más de 1 proteína a partir de los conjuntos que se expondrán más adelante.

Una vez realizados los estudios mono y multiproteína, se utilizaron las bases de datos DrugBank, PubChem, Sider 4.1 y Drugs.com para recopilar la siguiente información clínica de cada uno de los candidatos:

1. Uso / Tratamiento (actual)
2. Toxicidad
3. Lesión hepática inducida por fármacos (DILI, por sus siglas en inglés)

4. Efectos adversos
5. Contraindicaciones
6. Formulación
7. Mecanismo de acción

Se descartaron aquellos fármacos que presentaran toxicidad, efectos adversos o contraindicaciones graves, así mismo solo se consideraron fármacos con DILI C, D y E dado que no están relacionados al desarrollo de hepatotoxicidad, por otro lado la formulación oral se consideró apropiada sobre la tópica, por último el uso o tratamiento actual y el mecanismo de acción es información relevante para una posterior aplicación a nivel clínico ya que son aspectos que deben considerarse de acuerdo al perfil de los pacientes.

7.3.1 Estudios monoproteína para filtrar fármacos

Receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)

De la segunda etapa de este trabajo, se obtuvieron 508 fármacos candidatos para EGFR, y una vez realizado el estudio de exclusividad nos quedamos con 2 candidatos para la inhibición de la proteína: bumadizona y tolnaftato (Figura 26). Podemos observar que los fármacos se encuentran en la misma zona de interacción que los inhibidores control, se comparten un gran número de interacciones de tipo hidrofóbico y se observa un menor número de residuos que interaccionan.

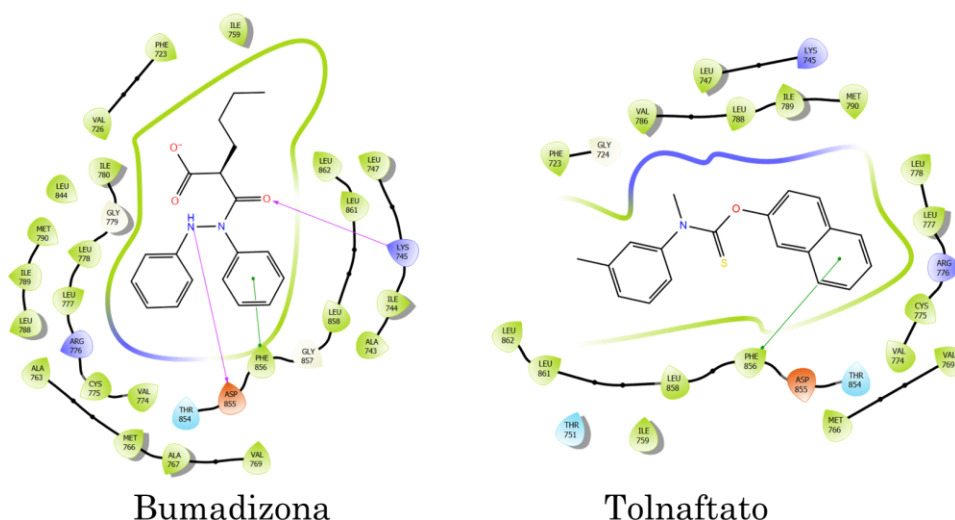


Figura 26. Estructura química de bumadizona y tolnaftato interaccionando con la proteína EGFR.

De ambos fármacos contamos con información clínica que se muestra en la Tabla 19. Para ambos casos, no se han reportado en las bases de datos consultadas los efectos tóxicos o DILI (lesión hepática inducida por fármacos). Ambos cuentan con una EA (energía de acoplamiento) buena, superando en ambos casos a erlotinib (-5.7 kcal/mol) inhibidor comercial de EGFR, e inclusive en el caso de bumadizona superando la EA de lapatinib (-7.53 kcal/mol); energéticamente ambos fármacos son buenos candidatos. Por otro lado, es importante señalar que no existen efectos adversos graves por su ingesta y en el caso de bumadizona la formulación de tipo oral facilitará estudios *in vivo* posteriores.

Tabla 19. Información clínica de los fármacos candidatos para EGFR.

Fármaco	EA	DB	Tratamiento	Propiedades	Toxicidad	DILI	Efectos adversos	Contraindicaciones	Formulación	Aprobado
Bumadizona	-8.323	DB13286	Artritis reumatoide y gota	Antiinflamatorio, antipirético y analgésico	N/R	N/R	Probados en animales	S/C	Oral	Alemania y Austria
Tolnaftato	-6.057	DB00525	Infecciones piel por hongo	Antifúngico	N/R	N/R	Reacciones alérgicas leves	Embarazadas	Crema, polvo, spray, aerosol	N/R

N/R: No Reportado, S/C: Sin Contraindicaciones.

Isoforma alfa de la subunidad catalítica de PI3K (p110 α)

De los 115 candidatos seleccionados de la segunda etapa y una vez realizado el análisis monoproteína, finalizamos con 3 candidatos importantes para inhibir a la proteína p110 α , los cuales son: enzalutamida, filgotinib y guanabenz (Figura 27). Se muestra que los fármacos comparten los residuos más importantes observados en los inhibidores control, por ejemplo: Lys802, Val851, Asp933 y Ser854.

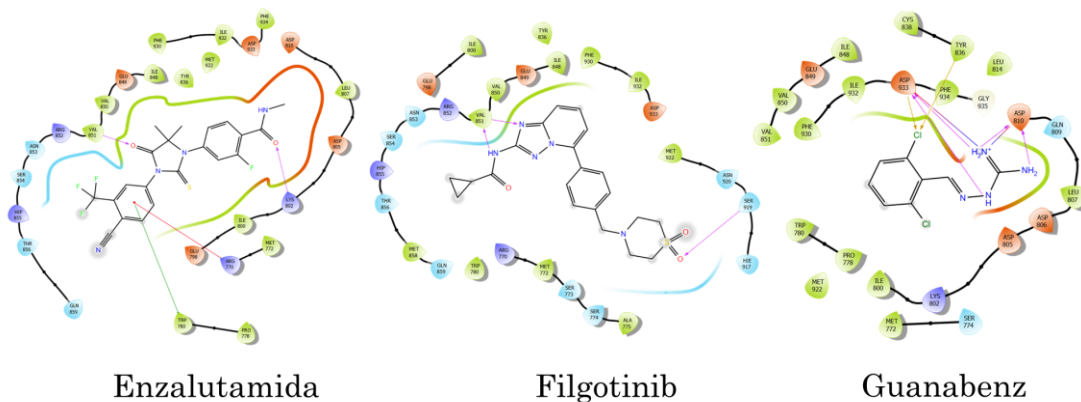


Figura 27. Estructura química de enzalutamida, filgotinib y guanabenz interaccionando con p110 α .

La información clínica de los fármacos seleccionados se muestra en la Tabla 20, en ningún caso se encontró en las bases consultadas, información relacionada con la toxicidad de estos. Enzalutamida es el único con DILI reportado en escala E, que es un valor bajo, por lo tanto, probablemente no está relacionado con la generación de daño hepático en pacientes. Además, ninguno muestra efectos adversos graves, solamente guanabenz, por lo que tendría restricciones para su administración en pacientes que no padezcan hipertensión. En los tres casos, sus formulaciones son tipo tabletas o cápsulas lo cual facilitará su aplicación en estudios *in vivo*. Habrá que profundizar los conocimientos clínicos con el fármaco enzalutamida, ya que es utilizado para el cáncer de próstata, inhiben a él AR, y puede ser una alternativa muy buena a estudiar *in vitro* con células de CMTN.

Tabla 20. Información clínica de los candidatos para p110 α .

Fármaco	EA	DB	Tratamiento	Propiedades	Farmacodinamia	Metabolismo	Eliminación	Toxicidad	DILI	Efectos adversos	Formulación
<i>Enzalutamida</i>	-8.018	DB08899	Cáncer próstata resistente a castración	Inhibidor AR	Resistencia a terapia: upregulation NF- κ B2/p52.	Hepático por CYP2C8 y CYP3A4	71% orina y 14% heces	N/R	E	Fatiga, diarrea, dolor musculoesquelético, infecciones respiratorias, ansiedad e hipertensión	Cápsulas, tabletas
<i>Filgotinib</i>	-7.658	DB14845	Artritis reumatoide	Inhibidor JAK1	Citocinas proinflamatorias: inhibe IL6	Carboxilesterasa	87% renal y 15% heces	N/R	N/R	N/R	Tableta
<i>Guanabenz</i>	-7.329	DB00629	Hipertensión	Agonista alfa 2 adrenérgico	N/R	Hepático	N/R	N/R	N/R	Contracción pupila, irritabilidad, presión baja	Tableta

N/R: No Reportado.

Cabe señalar que para el caso de la proteína p110 α , no se eliminaron aquellos fármacos que interactúan con mTOR dado que en este último filtro se compartían entre sí todas las moléculas, por lo que se optó por una eliminación de acuerdo con la EA presentada, es decir solamente se tomaron en cuenta aquellos fármacos que tuvieran una mejor energía de acoplamiento para p110 α en comparación con mTOR.

Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR)

En el caso de PDGFR después del estudio monoproteína, obtuvimos un solo candidato de los 312 fármacos filtrados en la segunda etapa: artesunato (Figura 28), se observa que comparte con los inhibidores imatinib y masitinib los residuos Lys627 con carga positiva e interacción pi-cación, Asp836 con carga negativa y un pdh, entre otros residuos de tipo hidrofóbico.

Ligando 1 de muerte programada (PD-L1)

Para la proteína PD-L1 se presentan 2 candidatos: risperidona y sacubitril (Figura 29), después del análisis monoproteína de los 159 fármacos filtrados de la segunda etapa. Podemos observar que risperidona comparte con BMS-202 los contactos con los aminoácidos AlaA121 y AspA122 con interacciones de tipo hidrofóbico y pdh y carga negativa respectivamente y una nueva interacción (AlaA18) de tipo hidrofóbico y con interacción pi-cación. Por otro lado, sacubitril comparte con BMS-1 los residuos AlaA121 de tipo hidrofóbico, LysA124 con carga positiva y TyrB56 de tipo hidrofóbico.

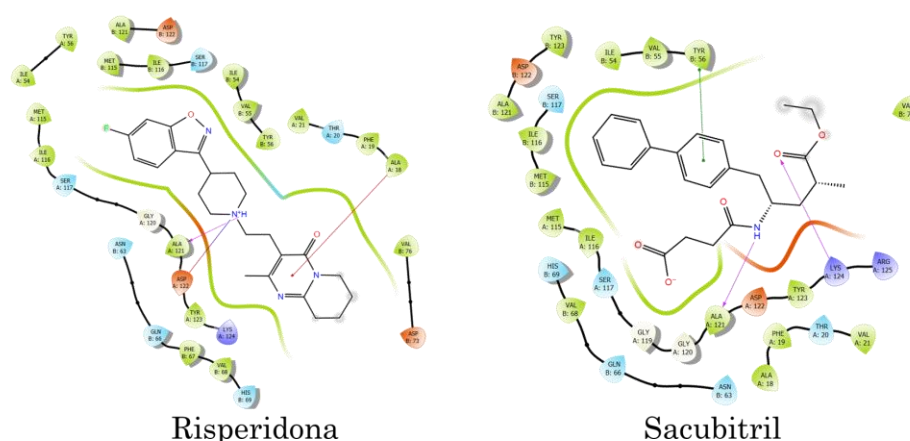


Figura 29. Estructura química de risperidona y sacubitril interactuando con PD-L1.

La información clínica de los fármacos seleccionados se muestra en la Tabla 22. Para ambos candidatos, su formulación es en tableta lo cual facilitarí su administración en estudios futuros.

Para el caso de risperidona, acorde con la escala DILI, es probable que no se presente daño hepático a las personas, además, en las bases de datos no se reportan efectos adversos, únicamente se reportan complicaciones cuando existe sobredosis. Por otro lado, sacubitril es utilizado para la prevención de riesgos cardiovasculares por lo que no presentaría un gran riesgo para los pacientes con CMTN acorde con su uso actual, sin embargo, se señala en efectos adversos y toxicidad el desarrollo de daño hepático, (aunque no se reporte en la escala DILI) por lo que sería un punto importante para tomar en cuenta.

Tabla 22. Información clínica de los candidatos para PD-L1.

Fármaco	EA	DB	Tratamiento	Propiedades	Farmacodinamia	Metabolismo	Eliminación	Toxicidad	DILI	Efectos adversos	Formulación
Risperidona	-7.668	DB00734	Antipsicótico	Decremento actividad dopaminérgica y serotoninérgica	Afinidad con receptor serotoninérgico 5-HT2A, receptor dopaminérgico D2	Citocromo hepático P450	Hígado	Sobredosis: letargia, distonía, taquicardia, bradicardia y convulsiones	Less, 3, E/C	N/R	Tableta
Sacubitril	-7.741	DB09292	Reducción de riesgo en eventos cardiovasculares	Inhibición neprilisina	N/R	Esterasas	52-68% orina y 37-48% heces	Hipotensión, hipercalemia, tos, mareo, falla renal	N/R	Problemas renales, altos niveles de K, mareo, tos	Tableta

N/R: No Reportado.

Cabe señalar que para PD-L1, no se eliminaron aquellos fármacos que interaccionaron con mTOR dado que en este último filtro se compartían todas las moléculas, por lo que se optó por una eliminación de acuerdo con la EA presentada, es decir; solamente se tomaron en cuenta aquellos fármacos que tuvieran una mejor energía de acoplamiento para PD-L1 en comparación con mTOR.

Receptor de andrógenos (AR)

Para el caso de AR se realizó un proceso de filtrado más estricto acorde con la información clínica, recordemos que en la segunda etapa obtuvimos 756 fármacos y una vez realizado el estudio monoproteína, el número se redujo a 43 fármacos, de los cuales se recopiló su información clínica. Sin embargo, 22 fueron descartados por presentar efectos adversos importantes como daño hepático, 8 fármacos fueron descartados por no existir información clínica. Por lo tanto; nos quedamos con **13 fármacos** candidatos con información clínica completa, que no reportan efectos adversos graves y su formulación no es de tipo tópico, siendo esto último importante para que su posterior uso en experimentos *in vitro*.

En la Figura 30 observamos 3 de los candidatos correspondientes al AR, en el caso de talbutal se observa interacción con los residuos Gln783 y Ser782 ambos de tipos polar y con interacciones de pdh los cuales no se comparten con los inhibidores o ligandos endógenos de AR. Por otro lado, nalbufina interactúa con Leu704 y Phe764, ambos de tipo hidrofóbico tampoco se comparten con los inhibidores o ligandos endógenos, oximorfona comparte el residuo Asn705 de tipo polar con pdh con testosterona. Aunque los fármacos presentan interacciones distintas a las observadas en los inhibidores o ligandos endógenos se puede observar que interaccionan en el mismo sitio debido a los residuos presentes.

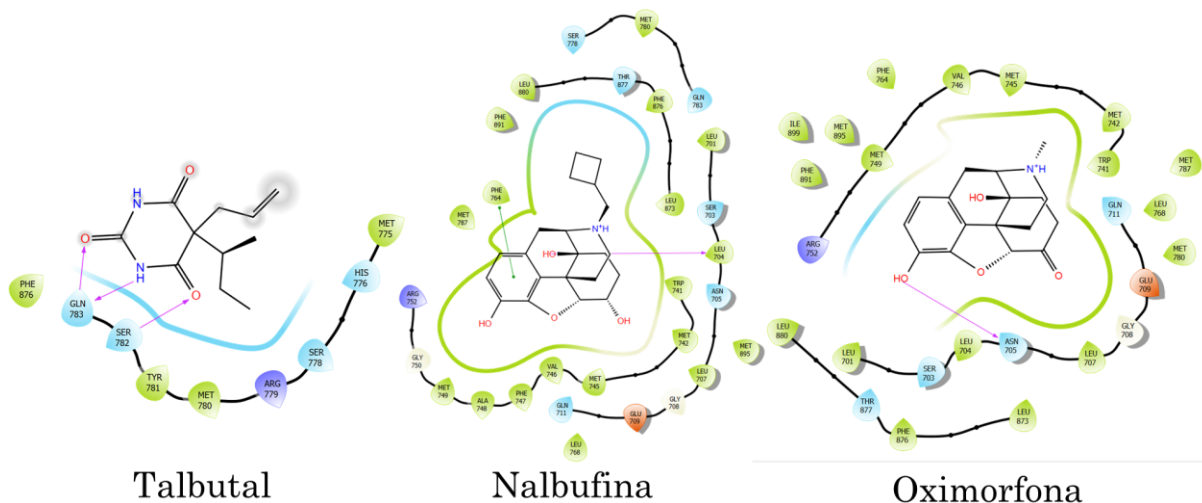


Figura 30. Fármacos candidatos para AR.

Los candidatos se clasificaron de acuerdo con el padecimiento para el cual está siendo utilizado en la actualidad (Tabla 23). Hay fármacos para enfermedades infecciosas, cardiovasculares, metabólicas, reumáticas. En el caso de los fármacos utilizados en enfermedades del sistema nervioso o hipertensión tendría que considerarse el riesgo de administrarlos en pacientes que no presenten estas enfermedades (como migraña, demencia, trastornos de sueño, consumo de alcohol o de opioides, arritmias o hipertensión). Estos fármacos pueden ofrecer una alternativa interesante para pacientes con CMTN dependiendo de las comorbilidades que tengan.

Tabla 23. Clasificación de candidatos para AR por padecimiento

Padecimiento	Tratamiento				
Enfermedades infecciosas	Antibiótico <ul style="list-style-type: none"> • Ticarcilina 				
Enfermedades del sistema nervioso	Migraña <ul style="list-style-type: none"> • Talbutal 	Trastornos de sueño <ul style="list-style-type: none"> • Amobarbital 	Alzheimer-demencia <ul style="list-style-type: none"> • Memantina 	Trastornos asociados al consumo de alcohol <ul style="list-style-type: none"> • Nalmefeno 	Sobredosis de opioides <ul style="list-style-type: none"> • Naloxona
Trastornos asociados al dolor	Analgésico <ul style="list-style-type: none"> • Nalbufina • Oximorfona 	Anestésico <ul style="list-style-type: none"> • Tiopentato 			
Enfermedades cardiovasculares	Arritmias <ul style="list-style-type: none"> • Disopiramida 	Hipertensión <ul style="list-style-type: none"> • Mecamilamina 			
Trastornos nutricionales y metabólicos	Anemia <ul style="list-style-type: none"> • Ascorbato de hierro 				
Enfermedades reumáticas	Artritis <ul style="list-style-type: none"> • Acetato de cortisona 				

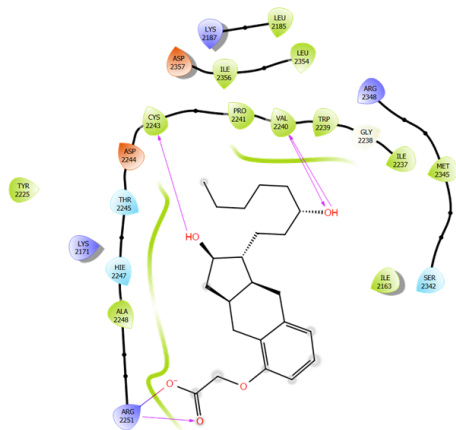
Diana de rapamicina en células de mamífero (mTOR)

En la segunda etapa para mTOR se obtuvieron 1152 fármacos, una vez realizado el análisis monoproteína se redujeron a 253, debido a que aún es amplio el número de candidatos, los filtros de selección con la información clínica se hicieron más estrictos. Se descartaron 71 fármacos por presentar efectos adversos, 89 por presentar datos incompletos y 11 porque haber sido retirados del mercado. Por todo lo anterior, nos quedamos con 64 fármacos, los cuales no generan efectos secundarios graves, se cuenta con la información completa y no son de formulación tópica. Sin embargo, consideramos que aún era un número elevado de candidatos para reposicionar por lo que se utilizó la EA del inhibidor comercial TORKinib (-4.89 kcal/mol) como línea de corte y únicamente **42 fármacos** lo superaron. En la Figura 31 podemos observar algunos de los fármacos candidatos para la proteína mTOR, varios de ellos comparten los residuos observados en TORKinib y sapanisertib (inhibidores control), por otro lado, se observan nuevos residuos que interactúan en la misma zona.

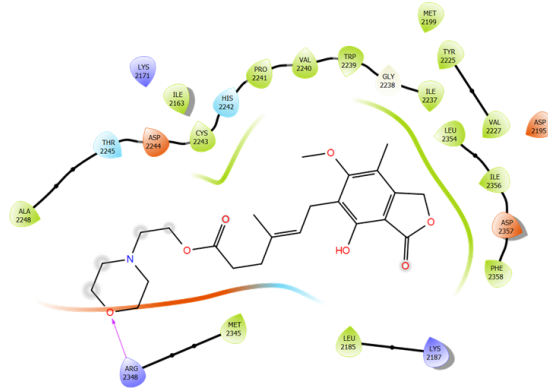
Los fármacos candidatos fueron agrupados de acuerdo con el padecimiento en el cual están siendo utilizados en la actualidad (Tabla 24). Es importante considerar el riesgo existente al administrar los fármacos utilizados para el tratamiento de trastornos mentales y del comportamiento, enfermedades del sistema nervioso central e hipertensión a pacientes que no presenten una de estas patologías. Por el contrario, los fármacos utilizados para enfermedades infecciosas podrían ser un buen punto de partida para futuros estudios *in vivo*.

Tabla 24. Clasificación de fármacos candidatos para mTOR por padecimiento.

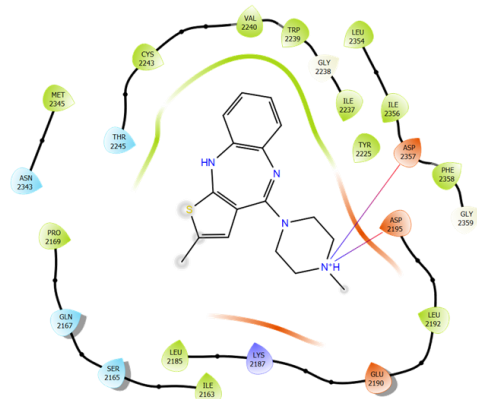
Padecimiento	Número de fármacos
Enfermedades infecciosas	8
Trastornos mentales y de comportamiento	5
Enfermedades del sistema nervioso	3
Enfermedades del aparato respiratorio	4
Enfermedades cardiovasculares	14
Enfermedades de sangre y órganos hematopoyéticos	2
Enfermedades del sistema gastro-esofágico	2
Síndromes autoinflamatorios	2
Enfermedades reumáticas	1
Enfermedades oculares	1



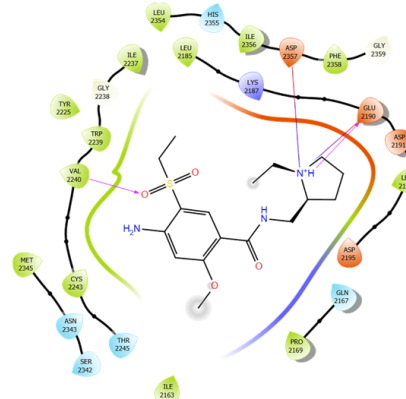
Treprostinil



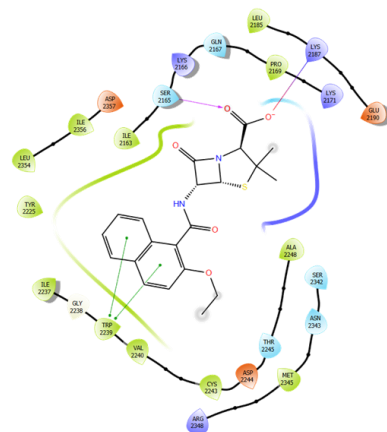
Micofenolato de mofetilo



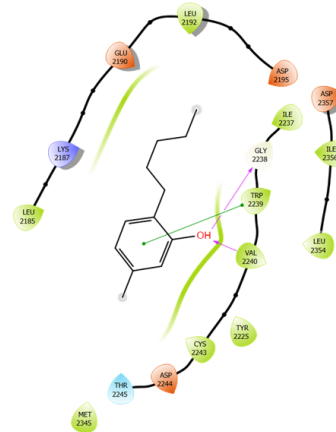
Olanzapina



Amisulprida



Nafcilina



Amilmetacresol

Figura 31. Candidatos de la proteína mTOR.

7.3.2 Estudios multiproteína

Conjunto 1 (AR y EGFR)

Existen 3 patrones reportados en pacientes con CM que relacionan a las proteínas AR y EGFR, el primer caso se da cuando existe una sobreexpresión de AR lo cual está asociado a la generación de quimioresistencia. Por otro lado, puede existir una sobreexpresión de EGFR, lo cual está asociado con un mal pronóstico, debido a que se relaciona con rutas de señalización que ayudan a la proliferación celular de las células malignas. Por último se puede presentar una sobreexpresión en ambas proteínas lo cual estaría relacionado a la generación de quimioresistencia y procesos que ayuden al mantenimiento y desarrollo de células tumorales [24]. Por lo anterior, se planteó el estudio multiproteína de AR y EGFR para las pacientes que presenten sobreexpresión en ambas proteínas.

Como primer paso se aplicó la teoría de conjuntos para determinar cuáles fármacos interactuaban con las proteínas a estudiar, Figura 32. Así, se encontraron 150 fármacos que se predice que interactúan con EGFR, ARa y ARe, de los cuales, únicamente **44 fármacos** interactúan de manera exclusiva con AR y EGFR.

Cabe señalar que en este caso no se eliminaron los fármacos que interactúan con mTOR, y únicamente se tomó en cuenta a los candidatos que superaran las EA de mTOR.



Figura 32. Teoría de conjuntos de interacciones de fármacos con AR y EGFR.

De los 44 fármacos obtenidos; 27 fueron descartados por presentar efectos adversos graves, 6 se descartaron por no contar con la información clínica completa, 3 ya han sido retirados del mercado y solamente **8 fármacos** no presentaron efectos adversos. De los 8 candidatos seleccionados; 7 presentaron una mejor energía de acoplamiento para AR

en el sitio alostérico y uno para EGFR. En la Figura 33, se pueden observar algunos candidatos para el conjunto 1 en las dos proteínas de interés, EGFR y AR en ambos sitios.

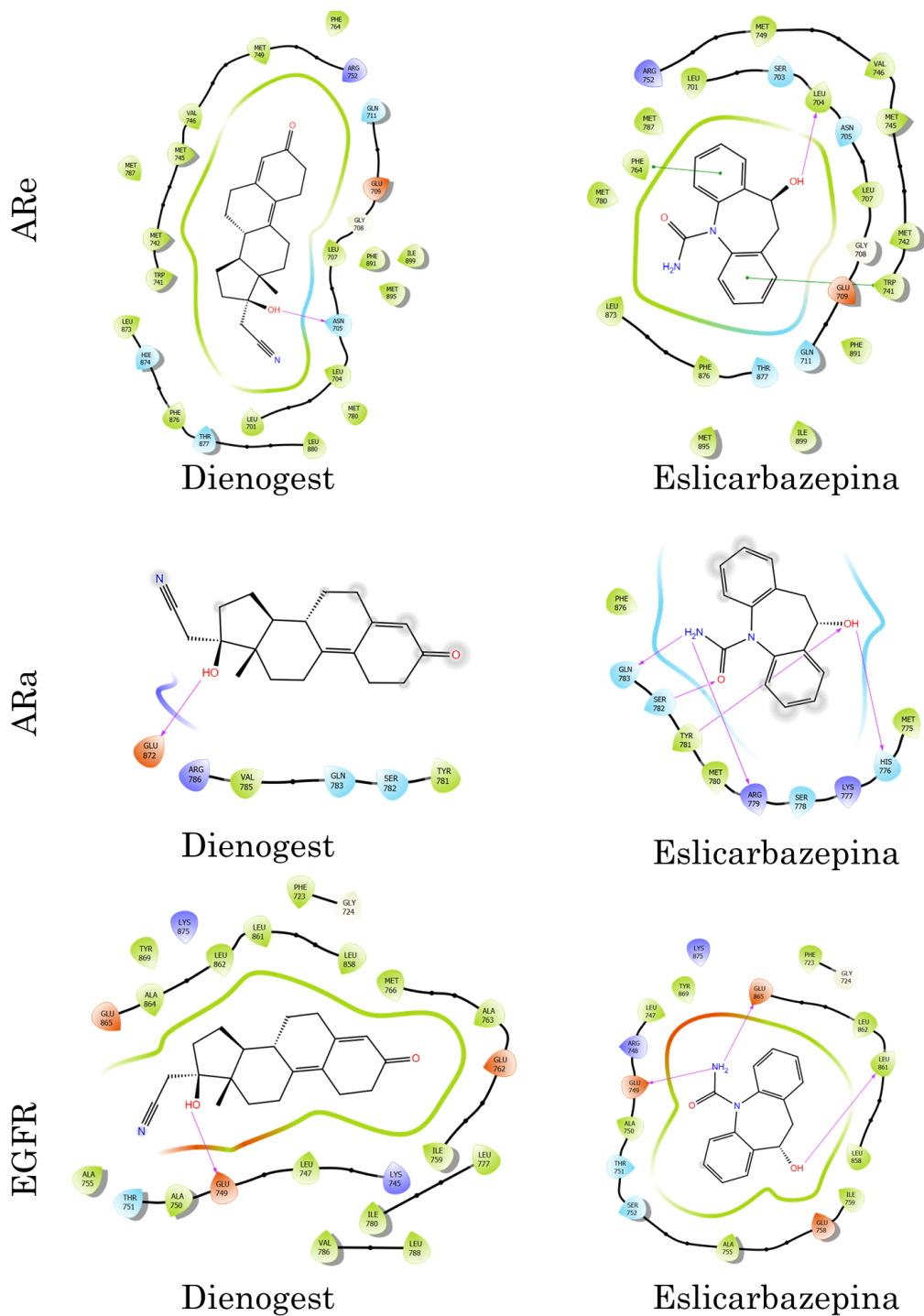


Figura 33. Fármacos candidatos para el conjunto 1 (EGFR y AR).

Los fármacos candidatos, se agruparon de acuerdo con los padecimientos para los cuales son utilizados en la actualidad (Tabla 25). Se tendría que considerar el riesgo de utilizar los fármacos prescritos para el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso y trastornos mentales y del comportamiento en pacientes que no presenten este tipo de padecimientos, así como dosis y el tipo de trastorno.

Tabla 25. Clasificación de fármacos candidatos para EGFR y AR por padecimiento.

Padecimiento	Tratamiento	Fármaco
Trastornos mentales y de comportamiento	Esquizofrenia	<ul style="list-style-type: none"> • Molindona
Enfermedades del sistema nervioso	Antiepilépticos	<ul style="list-style-type: none"> • Zonisamida • Eslicarbazepina
Enfermedades del aparato respiratorio	Descongestionante	<ul style="list-style-type: none"> • Pseudoefedrina
Enfermedades cardiovasculares	Arritmias	<ul style="list-style-type: none"> • Tocainida
Trastornos nutricionales y metabólicos	Obesidad	<ul style="list-style-type: none"> • Lorcaserina • Mazindol
Trastornos hormonales	Anticonceptivos	<ul style="list-style-type: none"> • Dienogest

Conjunto 2 (EGFR, p110 α , mTOR)

Existen evidencias que relacionan la vía de señalización PI3K/AKT/mTOR en el desarrollo de la enfermedad en el CMTN. En la Figura 10, (previamente mostrada en la introducción, página 15) muestra que para poder activar la ruta tiene que ocurrir la fosforilación de HER o EGFR desencadenando la participación de las proteínas PI3K, AKT, mTOR, RAS y MEK y finalmente la transcripción de genes involucrados en procesos de proliferación celular, invasión y supervivencia de las células malignas. Por lo que, se han propuesto moléculas que inhiban a las proteínas que participan en dicha ruta dado que los inhibidores comerciales actuales han mostrado una baja eficacia o incluso la generación de hepatotoxicidad por la ingesta de los mismo [29].

Por lo anterior, resulta de nuestro interés la búsqueda de nuevos fármacos que logren inhibir a las proteínas que están participando en la ruta PI3K/AKT/mTOR. Así, en el presente estudio seleccionamos a las proteínas EGFR, p110 α y mTOR.

En primer lugar, se aplicó la teoría de conjuntos para relacionar aquellos fármacos que interaccionarán con las proteínas a estudiar, la Figura 34 muestra la selección de 86 moléculas que interaccionan con las 3 proteínas y una vez realizado el análisis de exclusividad se encontraron **7 candidatos**; 3 que presentan una mejor energía de acoplamiento con p110 α y 4 con mTOR.

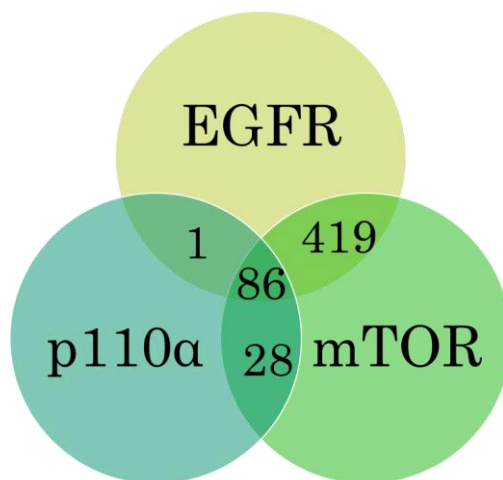


Figura 34. Teoría de conjuntos de interacciones de fármacos con EGFR, p110 α y mTOR.

En la Figura 35 podemos observar dos de los fármacos candidatos para el conjunto 2, comparten algunas interacciones con los inhibidores correspondientes a cada una de las proteínas de estudio.

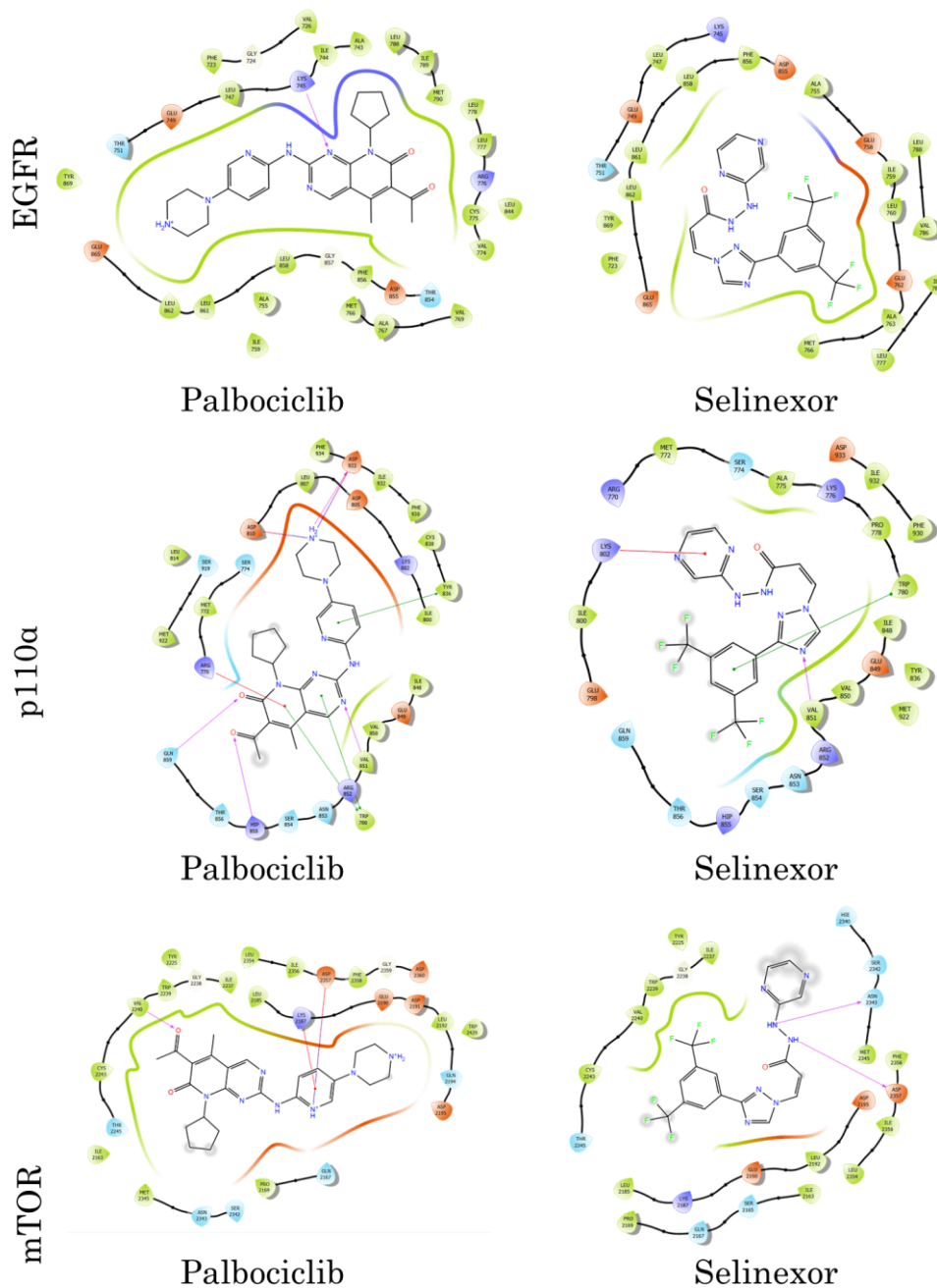


Figura 35. Candidatos para el conjunto 2 (EGFR, p110α y mTOR).

Es importante señalar que se cuenta con la información clínica completa de estos 7 candidatos, Tabla 26. No presentan efectos adversos graves. Se debe considerar el riesgo de administrar doxazosina a aquellas pacientes que no presenten hipertensión, por otro lado, los demás candidatos son buenas opciones para seguir con la investigación. Es interesante recalcar que el fármaco palbociclib se usa en el tratamiento del cáncer de mama HR+, por lo que será interesante profundizar en los resultados de estos reportes,

así como, estudiar este fármaco *in vitro* en cultivo de tejidos de CMTN. Otro fármaco interesante para probar será azelastina, puede ser una buena alternativa para pacientes de CMTN que no tengan alergias.

Tabla 26. Clasificación de candidatos para EGFR, p110 α y mTOR por padecimiento.

Padecimiento	Tratamiento	
Enfermedades hepáticas	Enfermedad crónica del hígado • Ademetonina	
Enfermedades cardiovasculares	Hipertensión • Doxazosina	
Enfermedades de la sangre y órganos hematopoyéticos	Linfoma No Hodgkin • Pixantrona	Mieloma múltiple • Selinexor
Enfermedades genéticas	Fibrosis quística • Ivacaftor	
Cáncer	Cáncer de mama HR+ • Palbociclib	
Alergias	Rinitis, Conjuntivitis • Azelastina	

Candidatos finales de la tercera etapa

Fármacos monoproteína

Con relación con el estudio monoproteína se obtuvieron un total de 63 candidatos, siendo mTOR la proteína con un mayor número de fármacos con 42 y PDGFR la de menor número contando solamente con 1 candidato, Tabla 27.

Recordemos que cada una de estas proteínas está relacionada a un subtipo de CMTN, excepto para el caso de EGFR y mTOR las cuales están presentes en los subtipos BL2 y M, esta información es relevante ya que las propuestas de terapia pueden ir dirigidas a inhibir una proteína específica o a atacar a uno o más subtipos de CMTN acorde a las características que presente la paciente.

Como información adicional, en el anexo 2, se encuentran las EA de cada una de las proteínas con sus respectivos fármacos candidatos y sus inhibidores control, donde se observa que todos los fármacos candidatos tienen mejor EA que los inhibidores control.

Tabla 27. Fármacos monoproteína candidatos seleccionados por subtipo de CMTN.

Subtipo CMTN	Monoproteína	Número de fármacos
LAR	ARae	13
BL2/M	EGFR	2
BL1	p110 α	3
BL2/M	mTOR	42
MSL	PDGFR	1
IM	PD-L1	2

Fármacos multiproteína

Se obtuvieron un total de 15 candidatos en los estudios multiproteína (Tabla 28); 8 para el caso del conjunto 1 y 7 fármacos para el conjunto 2. Este tipo de análisis es relevante ya que como pudimos observar, en las pacientes con CMTN se presentan alteraciones en proteínas relacionadas con rutas implicadas en el desarrollo, mantenimiento y migración de células tumorales.

Así mismo, estos estudios se relacionan con subtipos de CMTN específicos, por ejemplo; para el conjunto 1 los subtipos relacionados son BL2, M y LAR y para el conjunto 2 los subtipos asociados son BL1, BL2 y M, éstos últimos presentan un comportamiento similar en las pacientes ya que están involucrados en procesos de proliferación celular.

Como información adicional, en el anexo 2, se encuentran las EA de cada una de las proteínas con sus respectivos fármacos candidatos.

Tabla 28. Fármacos multiproteína candidatos seleccionados por subtipo de CMTN.

Subtipo CMTN	Multiproteína	Número de fármacos
BL2, M y LAR	Conjunto 1 (EGFR, AR)	8
BL1, BL2 y M	Conjunto 2 (EGFR, mTOR, p110 α)	7

Fármacos clasificados por padecimiento

En la Tabla 29 se muestra el total de fármacos candidatos para reposicionar clasificados por su uso en diferentes padecimientos y de acuerdo con los estudios de acoplamiento molecular, los filtros de EA, CLG y parámetros clínicos. Se tienen 63 fármacos con probable actividad monoproteína y 15 con probable actividad multiproteína, de los últimos, 8 fármacos interactúan con dos proteínas y 7 con tres proteínas.

Como se ha mencionado anteriormente, se debe tener precaución con aquellos fármacos relacionados con trastornos mentales y de comportamiento, con enfermedades del sistema nervioso, hipertensión y otro tipo de alteración ya que no serían indicados para su administración para aquellas pacientes que no presenten dicha enfermedad debido a que pueden ser nocivas.

El presente trabajo aporta información sobre una gran cantidad de fármacos candidatos para reposicionamiento para el tratamiento del CMTN, en donde a lo largo del análisis realizado mostraron una excelente EA calculada *in silico*, pasando cada uno de los filtros establecidos y en su gran mayoría acorde a la información clínica reportada; no presentan efectos adversos graves en humanos.

Es importante dar continuidad al estudio, en modelos *in vivo* o *in vitro* de CMTN para validar las propuestas de reposicionamiento planteadas en el presente trabajo.

No menos importante sería la aprobación de los fármacos propuestos por expertos clínicos y de instancias sanitarias con la finalidad de probar a mediano plazo dichos medicamentos en las pacientes con CMTN de acuerdo con el perfil clínico que presenten. Así mismo, sería importante considerar la factibilidad con la que estos fármacos pueden obtenerse.

Finalmente, la búsqueda de nuevos inhibidores para las proteínas propuestas es relevante, debido a que muchos de los fármacos encontrados en el mercado, presentan efectos adversos o pierden eficacia a lo largo del tiempo. El reposicionar fármacos ya aprobados facilita los estudios preclínicos y clínicos para comprobar su eficacia y abarata los costos de producción e investigación. Así mismo, abre la posibilidad de proponer nuevas terapias para las pacientes con CMTN, quienes son tratadas principalmente con quimioterapia dado que no existe un tratamiento dirigido para este tipo de CM.

Tabla 29. Fármacos candidatos totales clasificados por padecimiento y tipo de estudio.

Padecimiento	Fármacos monoproteína	Fármacos para 2 proteínas (AR-EGFR)	Fármacos para 3 proteínas (EGFR-mTOR-p110α)
Enfermedades infecciosas	11	-	-
Trastornos mentales y de comportamiento	6	1	-
Enfermedades del sistema nervioso	8	2	-
Enfermedades del aparato respiratorio	4	1	1
Trastornos asociados al dolor	3	-	-
Enfermedades cardiovasculares	18	1	1
Enfermedades de sangre y órganos hematopoyéticos	2	-	2
Enfermedades del sistema gastro-esofágico	2	-	-
Trastornos nutricionales y metabólicos	1	2	-
Síndromes autoinflamatorios	2	-	-
Enfermedades reumáticas	4	-	-
Enfermedades oculares	1	-	-
Trastornos hormonales	-	1	-
Enfermedades hepáticas	-	-	1
Enfermedades genéticas	-	-	1
Cáncer	1	-	1
TOTAL	63	8	7

8 CONCLUSIONES

Se obtuvieron 78 fármacos como parte de un estudio de reposicionamiento contra el CMTN, de los cuales se predice por los análisis *in silico*, que 63 fármacos interactúan de forma exclusiva con una sola proteína, 8 fármacos con 2 proteínas (EGFR, AR) y 7 fármacos con 3 proteínas (EGFR, mTOR, p110 α).

Los 78 fármacos propuestos en este trabajo contra el CMTN han sido aprobados por la FDA y otras agencias sanitarias y actualmente se utilizan en una amplia gama de padecimientos, lo que implica que son seguros para proponer nuevos tratamientos contra el cáncer de mama que permitan mejorar la calidad de vida de las pacientes.

En este trabajo se expone la importancia y el uso de tecnologías computacionales basado en proteínas blanco como herramienta fundamental para proceso de reposicionamiento de fármacos candidatos, con posible potencial de nuevo uso como agentes terapéuticos antitumorales para el CMTN. Hará falta la fase pre-clínica (*in vitro*) y clínica (*in vivo*) para su posible utilización en corto plazo en el sector salud.

9 PERSPECTIVAS DEL TRABAJO

Considerando que los estudios bioinformáticos apoyan de forma importante en la predicción, será necesario realizar los estudios experimentales de dichos fármacos para confirmar su efecto en la inhibición de las funciones de las proteínas estudiadas relacionadas con el CMTN.

Como primer paso, en estudios *in vitro* se plantea la selección de líneas celulares de cada uno de los subtipos de CMTN y probar el efecto de inhibición de los fármacos.

Después la realización de experimentos en modelos *in vivo* de CMTN para evaluar aquellos fármacos que muestren resultados interesantes en la etapa *in vitro*.

Con los recursos bioinformáticos se podrían realizar estudios de dinámica molecular o de relación cuantitativa estructura-actividad (QSAR) para mejorar la predicción de las actividades biológicas de los fármacos.

10 BIBLIOGRAFÍA

- [1] S. H. Hassanpour and M. Dehghani, “Review of cancer from perspective of molecular,” *J. Cancer Res. Pract.*, 2017.
- [2] The Global Cancer Observatory (Globocan) and GLOBOCAN, “The Global Cancer Observatory - All cancers,” *Int. Agency Res. Cancer - WHO*, vol. 929, pp. 1–2, 2020.
- [3] The Global Cancer Observatory (Globocan), “Mexico Source: Globocan 2020,” *Int. Agency Res. Cancer WHO*, vol. 929, pp. 1–2, 2020.
- [4] Y. Feng *et al.*, “Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis,” *Genes and Diseases*. 2018.
- [5] K. Polyak, “Breast cancer: Origins and evolution,” *Journal of Clinical Investigation*. 2007.
- [6] C. Neophytou, P. Boutsikos, and P. Papageorgis, “Molecular mechanisms and emerging therapeutic targets of triple-negative breast cancer metastasis,” *Frontiers in Oncology*. 2018.
- [7] M. Khoshakhlagh, A. Soleimani, M. Moradi, and A. Avan, “Therapeutic potential of pharmacological TGF- β signaling pathway inhibitors in the pathogenesis of breast cancer,” *Biochem. Pharmacol.*, vol. 164, no. December 2018, pp. 17–22, 2019.
- [8] B. D. Lehmann *et al.*, “Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies,” *J. Clin. Invest.*, 2011.
- [9] A. I. Phipps *et al.*, “Body size, physical activity, and risk of triple-negative and estrogen receptor-positive breast cancer,” *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, vol. 20, no. 3, pp. 454–463, 2011.
- [10] C. Hernández-Álvarez, C. Romo-Aguirre, and C. Ortiz-de Iturbide, “Cáncer de mama triple negativo: frecuencia y características en el Hospital Ángeles Pedregal,” *Acta Médica Grup. Ángeles*, 2017.
- [11] G. I. Uscanga-Perales *et al.*, “Genetic alterations of triple negative breast cancer (TNBC) in women from northeastern Mexico,” *Oncol. Lett.*, 2019.
- [12] G. I. Uscanga-Perales, S. K. Santuario-Facio, and R. Ortiz-López, “Triple negative breast cancer: Deciphering the biology and heterogeneity,” *Med. Univ.*, 2016.
- [13] M. A. Medina *et al.*, “Triple-negative breast cancer: A review of conventional and advanced therapeutic strategies,” *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2020.
- [14] L. A. Carey *et al.*, “The triple negative paradox: Primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes,” *Clin. Cancer Res.*, 2007.
- [15] W. M. Sikov *et al.*, “Impact of the addition of carboplatin and/or bevacizumab to neoadjuvant once-per-week paclitaxel followed by dose-dense doxorubicin and cyclophosphamide on pathologic complete response rates in stage II to III triple-negative breast cancer: CALGB 40603 (A,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 33, no. 1, pp. 13–

21, 2015.

- [16] M. Martín *et al.*, “Fluorouracil, doxorubicin, and cyclophosphamide (FAC) versus FAC followed by weekly paclitaxel as adjuvant therapy for high-risk, node-negative breast cancer: Results from the GEICAM/2003-02 study,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 31, no. 20, pp. 2593–2599, 2013.
- [17] B. D. Lehmann, J. A. Pietenpol, and A. R. Tan, “Triple-Negative Breast Cancer: Molecular Subtypes and New Targets for Therapy,” *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. B.*, no. 35, pp. e31–e39, 2015.
- [18] P. Bouwman and J. Jonkers, “Molecular Pathways : How Can BRCA-Mutated Tumors Become Resistant to PARP Inhibitors ?,” vol. 20, no. 3, pp. 540–548, 2014.
- [19] M. Hubalek, T. Czech, and H. Müller, “Biological Subtypes of Triple-Negative Breast Cancer,” *Breast Care*, vol. 12, no. 1, pp. 8–14, 2017.
- [20] J. J. Chan, T. J. Y. Tan, and R. A. Dent, “Are there any clinically relevant subgroups of triple-negative breast cancer in 2018?,” *J. Oncol. Pract.*, vol. 14, no. 5, pp. 281–289, 2018.
- [21] H. Masuda *et al.*, “Differential response to neoadjuvant chemotherapy among 7 triple-negative breast cancer molecular subtypes,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 19, no. 19, pp. 5533–5540, 2013.
- [22] A. Santonja *et al.*, “Triple negative breast cancer subtypes and pathologic complete response rate to neoadjuvant chemotherapy,” *Oncotarget*, vol. 9, no. 41, pp. 26406–26416, 2018.
- [23] L. Yin, J. J. Duan, X. W. Bian, and S. C. Yu, “Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress,” *Breast Cancer Res.*, vol. 22, no. 1, pp. 1–13, 2020.
- [24] A. Anestis, I. Zoi, A. G. Papavassiliou, and M. V. Karamouzis, “Androgen receptor in breast cancer-clinical and preclinical research insights,” *Molecules*, vol. 25, no. 2, pp. 1–11, 2020.
- [25] M. A. Rice, S. V. Malhotra, and T. Stoyanova, “Second-generation antiandrogens: From discovery to standard of care in castration resistant prostate cancer,” *Front. Neurol.*, vol. 10, no. AUG, pp. 1–12, 2019.
- [26] A. E. Maennling *et al.*, “Molecular targeting therapy against egfr family in breast cancer: Progress and future potentials,” *Cancers (Basel)*, vol. 11, no. 12, 2019.
- [27] J. Pascual and N. C. Turner, “Targeting the PI3-kinase pathway in triple-negative breast cancer,” *Ann. Oncol.*, vol. 30, no. 7, pp. 1051–1060, 2019.
- [28] K. Ito, H. Ogata, N. Honma, K. Shibuya, and T. Mikami, “Expression of mtor signaling pathway molecules in triple-negative breast cancer,” *Pathobiology*, vol. 86, no. 5–6, pp. 315–321, 2019.
- [29] R. L. B. Costa, H. S. Han, and W. J. Gradishar, “Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in triple-negative breast cancer: a review,” *Breast Cancer Res. Treat.*, vol. 169, no. 3, pp. 397–406, 2018.
- [30] S. Jansson *et al.*, “The PDGF pathway in breast cancer is linked to tumour aggressiveness, triple-negative subtype and early recurrence,” *Breast Cancer Res.*

- Treat.*, vol. 169, no. 2, pp. 231–241, 2018.
- [31] I. Carvalho, F. Milanezi, A. Martins, R. M. Reis, and F. Schmitt, “Overexpression of platelet-derived growth factor receptor α in breast cancer is associated with tumour progression,” *Breast Cancer Res.*, vol. 7, no. 5, pp. 788–795, 2005.
- [32] R. M. Manzat Saplacan *et al.*, “The Role of PDGFs and PDGFRs in Colorectal Cancer,” *Mediators Inflamm.*, vol. 2017, 2017.
- [33] W. Y. Sun, Y. K. Lee, and J. S. Koo, “Expression of PD-L1 in triple-negative breast cancer based on different immunohistochemical antibodies,” *J. Transl. Med.*, vol. 14, no. 1, pp. 1–12, 2016.
- [34] R. Thomas, G. Al-Khadairi, and J. Decock, “Immune Checkpoint Inhibitors in Triple Negative Breast Cancer Treatment: Promising Future Prospects,” *Front. Oncol.*, vol. 10, no. February, pp. 1–17, 2021.
- [35] Y. Jiang, M. Chen, H. Nie, and Y. Yuan, “PD-1 and PD-L1 in cancer immunotherapy: clinical implications and future considerations,” *Hum. Vaccines Immunother.*, vol. 15, no. 5, pp. 1111–1122, 2019.
- [36] J. P. Jourdan, R. Bureau, C. Rochais, and P. Dallemagne, “Drug repositioning: a brief overview,” *J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 72, no. 9, pp. 1145–1151, 2020.
- [37] S. Kumar, S. Chowdhury, and S. Kumar, “In silico repurposing of antipsychotic drugs for Alzheimer’s disease,” *BMC Neurosci.*, pp. 1–16, 2017.
- [38] Y. Masoudi-sobhanzadeh, Y. Omid, M. Amanlou, and A. Masoudi-nejad, “Genomics Drug databases and their contributions to drug repurposing,” *Genomics*, vol. 112, no. 2, pp. 1087–1095, 2020.
- [39] X.-Y. Meng, H.-X. Zhang, M. Mezei, and M. Cui, “Molecular Docking: A powerful approach for structure-based drug discovery,” *Curr Comput Aided Drug Des.*, vol. 7, no. 2, pp. 146–157, 2011.
- [40] Y. Matsuzaki, N. Uchikoga, and M. Ohue, “Rigid-Docking Approaches to Explore Protein – Protein Interaction Space,” 2016.
- [41] S. J. Teague, “IMPLICATIONS OF PROTEIN FLEXIBILITY FOR DRUG DISCOVERY,” vol. 2, no. July, 2003.
- [42] S. Maestro, “Schrödinger Release 2021-3.” .
- [43] H. M. Berman *et al.*, “The Protein Data Bank,” vol. 28, no. 1, pp. 235–242, 2000.
- [44] C. To *et al.*, “HHS Public Access,” vol. 9, no. 7, pp. 926–943, 2020.
- [45] E. Estébanez-Perpiñá *et al.*, “A surface on the androgen receptor that allosterically regulates coactivator binding,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 104, no. 41, pp. 16074–16079, 2007.
- [46] D. Rageot, B. T., E. Keles, and *et al.*, “(S)-4-(Difluoromethyl)-5-(4-(3-methylmorpholino)-6-morpholino-1,3,5-triazin-2-yl)pyridin-2-amine (PQR530), a Potent, Orally Bioavailable, and Brain-Penetrable Dual Inhibitor of Class I PI3K and mTOR Kinase,” *J Med Chem*, vol. 62, pp. 6241–6261, 2019.
- [47] H. Yang *et al.*, “mTOR kinase structure, mechanism and regulation by the rapamycin-binding domain,” *Nature*, vol. 497, no. 7448, pp. 217–223, 2015.

- [48] X. E. Yan and C. H. Yun, “5GRN,” *Crystal structure of PDGFRA in Complex with WQ-C-159*, 2017. .
- [49] L. Skalniak *et al.*, “Inhibitor-Moleküle + biologische Tests für PD-1/PD-L1,” *Oncotarget*, vol. 8, no. 42, pp. 72167–72181, 2017.
- [50] Selleckchem, “Lapatinib (GW-572016).” [Online]. Available: <https://www.selleckchem.com/products/lapatinib.html>.
- [51] Selleckchem, “Erlotinib (OSI-774).” [Online]. Available: <https://www.selleckchem.com/products/erlotinib.html>.
- [52] Selleckchem, “Omipalisib (GSK2126458).” [Online]. Available: <https://www.selleckchem.com/products/gsk2126458.html>.
- [53] Selleckchem, “Buparlisib (BKM120).” [Online]. Available: <https://www.selleckchem.com/products/BKM-120.html>.
- [54] Selleckchem, “Alpelisib (BYL719).” [Online]. Available: <https://www.selleckchem.com/products/byl719.html>.
- [55] Selleckchem, “Sapanisertib (MLN0128).” [Online]. Available: <https://www.selleckchem.com/products/ink128.html>.
- [56] Selleckchem, “Torkinib (PP242).” [Online]. Available: <https://www.selleckchem.com/products/PP242.html>.
- [57] Selleckchem, “Imatinib (STI571).” [Online]. Available: [https://www.selleckchem.com/products/Imatinib\(STI571\).html](https://www.selleckchem.com/products/Imatinib(STI571).html).
- [58] Selleckchem, “Lenvatinib (E7080).” [Online]. Available: <https://www.selleckchem.com/products/E7080.html>.
- [59] Selleckchem, “Masitinib (AB1010).” [Online]. Available: [https://www.selleckchem.com/products/Masitinib-\(AB1010\).html](https://www.selleckchem.com/products/Masitinib-(AB1010).html).
- [60] Selleckchem, “BMS202 (PD-1/PD-L1 inhibitor 2).” [Online]. Available: <https://www.selleckchem.com/products/pd-1-pd-l1-inhibitor-2.html>.
- [61] Selleckchem, “BMS-1 (PD-1/PD-L1 inhibitor 1).” [Online]. Available: <https://www.selleckchem.com/products/pd-1-pd-l1-inhibitor-1.html>.
- [62] Selleckchem, “BMS-1166.” [Online]. Available: <https://www.selleckchem.com/products/bms-1166.html>.
- [63] Selleckchem, “Flutamide.” [Online]. Available: [https://www.selleckchem.com/products/Flutamide\(Eulexin\).html](https://www.selleckchem.com/products/Flutamide(Eulexin).html).
- [64] D. S. Wishart *et al.*, “DrugBank 5.0: A major update to the DrugBank database for 2018,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 46, no. D1, pp. D1074–D1082, Jan. 2018.
- [65] A. C. Garrido-Castro, N. U. Lin, and K. Polyak, “Insights into Molecular Classifications of Triple-Negative Breast Cancer: Improving Patient Selection for Treatment,” *Cancer Discov.*, Jan. 2019.
- [66] C. Damaskos *et al.*, “Triple-negative breast cancer: The progress of targeted therapies and future tendencies,” *Anticancer Res.*, vol. 39, no. 10, pp. 5285–5296, 2019.

- [67] J. Mehanna, F. G. H. Haddad, R. Eid, M. Lambertini, and H. R. Kourie, “Triple-negative breast cancer: Current perspective on the evolving therapeutic landscape,” *Int. J. Womens. Health*, vol. 11, pp. 431–437, 2019.
- [68] J. L. da Silva, N. C. Cardoso Nunes, P. Izetti, G. G. de Mesquita, and A. C. de Melo, “Triple negative breast cancer: A thorough review of biomarkers,” *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2020.
- [69] J. C. Yao, C. N. Clarke, and D. B. Evans, “Pancreatic neuroendocrine tumors,” *DeVita, Hellman, Rosenberg’s Cancer Princ. Pract. Oncol.*, vol. 22, no. 23, pp. 1353–1367, 2018.
- [70] B. Verret, J. Cortes, T. Bachelot, F. Andre, and M. Arnedos, “Efficacy of PI3K inhibitors in advanced breast cancer,” *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.*, vol. 30, no. 10, pp. x12–x20, 2019.
- [71] K. Nakai, M. C. Hung, and H. Yamaguchi, “A perspective on anti-EGFR therapies targeting triple-negative breast cancer,” *Am. J. Cancer Res.*, vol. 6, no. 8, pp. 1609–1623, 2016.
- [72] J. Wheler *et al.*, “Revisiting clinical trials using EGFR inhibitor-based regimens in patients with advanced non-small cell lung cancer: A retrospective analysis of an MD Anderson Cancer Center phase I population,” *Oncotarget*, vol. 4, no. 5, pp. 772–784, 2013.
- [73] R. Hatem *et al.*, “Targeting mTOR pathway inhibits tumor growth in different molecular subtypes of triple-negative breast cancers,” *Oncotarget*, vol. 7, no. 30, pp. 48206–48219, 2016.
- [74] J. He *et al.*, “Multi-targeted kinase inhibition alleviates mTOR inhibitor resistance in triple-negative breast cancer,” *Breast Cancer Research and Treatment*, vol. 178, no. 2, pp. 263–274, 2019.
- [75] M. Joglekar-Javadekar *et al.*, “Characterization and Targeting of Platelet-Derived Growth Factor Receptor alpha (PDGFRA) in Inflammatory Breast Cancer (IBC),” *Neoplasia (United States)*, vol. 19, no. 7, pp. 564–573, 2017.
- [76] B. Cerbelli *et al.*, “PD-L1 Expression in TNBC: A Predictive Biomarker of Response to Neoadjuvant Chemotherapy?,” *Biomed Res. Int.*, vol. 2017, 2017.
- [77] M. Chen, Y. Yang, K. Xu, L. Li, J. Huang, and F. Qiu, “Androgen Receptor in Breast Cancer: From Bench to Bedside,” *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, vol. 11, no. September, pp. 1–11, 2020.
- [78] M. Xu *et al.*, “Prognostic Significance of Androgen Receptor Expression in Triple Negative Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis,” *Clin. Breast Cancer*, vol. 20, no. 4, pp. e385–e396, 2020.
- [79] L. Gerratana *et al.*, “Androgen receptor in triple negative breast cancer: A potential target for the targetless subtype,” *Cancer Treat. Rev.*, vol. 68, no. June, pp. 102–110, 2018.
- [80] S. D. Knight *et al.*, “Discovery of GSK2126458, a highly potent inhibitor of PI3K and the mammalian target of rapamycin,” *ACS Med. Chem. Lett.*, vol. 1, no. 1, pp. 39–43, 2010.

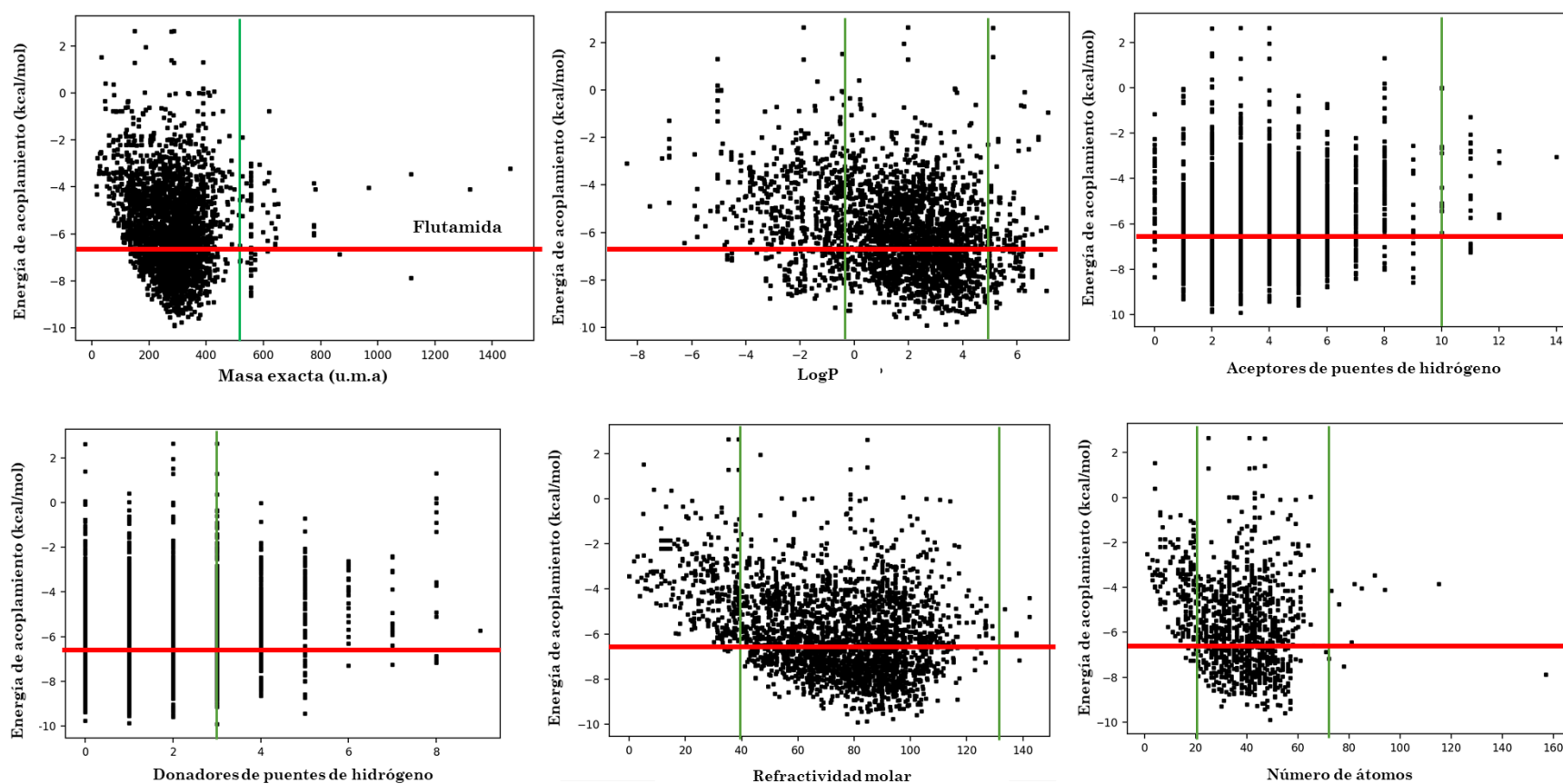
- [81] J. G. Greger *et al.*, “Combinations of BRAF, MEK, and PI3K/mTOR inhibitors overcome acquired resistance to the BRAF inhibitor GSK2118436 dabrafenib, mediated by NRAS or MEK mutations,” *Mol. Cancer Ther.*, vol. 11, no. 4, pp. 909–920, 2012.
- [82] M. T. Burger *et al.*, “Identification of NVP-BKM120 as a potent, selective, orally bioavailable class I PI3 kinase inhibitor for treating cancer,” *ACS Med. Chem. Lett.*, vol. 2, no. 10, pp. 774–779, 2011.
- [83] Z. Zheng, S. I. Amran, P. E. Thompson, and I. G. Jennings, “Isoform-selective inhibition of phosphoinositide 3-kinase: Identification of a New Region of nonconserved amino acids critical for p110 α inhibition,” *Mol. Pharmacol.*, vol. 80, no. 4, pp. 657–664, 2011.
- [84] E. Park *et al.*, “NVP-BKM120, a novel PI3K inhibitor, shows synergism with a STAT3 inhibitor in human gastric cancer cells harboring KRAS mutations,” *Int. J. Oncol.*, vol. 40, no. 4, pp. 1259–1266, 2012.
- [85] T. Li, Y. H. Ling, I. D. Goldman, and R. Perez-Soler, “Schedule-dependent cytotoxic synergism of pemetrexed and erlotinib in human non-small cell lung cancer cells,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 13, no. 11, pp. 3413–3422, 2007.
- [86] E. Buck *et al.*, “Rapamycin synergizes with the epidermal growth factor receptor inhibitor erlotinib in non-small-cell lung, pancreatic, colon, and breast tumors,” *Mol. Cancer Ther.*, vol. 5, no. 11, pp. 2676–2684, 2006.
- [87] B. Higgins *et al.*, “Antitumor activity of erlotinib (OSI-774, Tarceva) alone or in combination in human non-small cell lung cancer tumor xenograft models,” *Anticancer. Drugs*, vol. 15, no. 5, pp. 503–512, 2004.
- [88] Z. Bago-Horvath *et al.*, “Synergistic effects of erlotinib and everolimus on bronchial carcinoids and large-cell neuroendocrine carcinomas with activated EGFR/AKT/mTOR pathway,” *Neuroendocrinology*, vol. 96, no. 3, pp. 228–237, 2012.
- [89] D. W. Rusnak *et al.*, “The effects of the novel, reversible epidermal growth factor receptor/ErbB-2 tyrosine kinase inhibitor, GW2016, on the growth of human normal and tumor-derived cell lines in vitro and in vivo,” *Mol. Cancer Ther.*, vol. 1, no. 2, pp. 85–94, 2001.
- [90] B. Apsel *et al.*, “Targeted polypharmacology: Discovery of dual inhibitors of tyrosine and phosphoinositide kinases,” *Nat. Chem. Biol.*, vol. 4, no. 11, pp. 691–699, 2008.
- [91] M. E. Feldman *et al.*, “Active-site inhibitors of mTOR target rapamycin-resistant outputs of mTORC1 and mTORC2,” *PLoS Biol.*, vol. 7, no. 2, pp. 0371–0383, 2009.
- [92] B. Hoang *et al.*, “Targeting TORC2 in multiple myeloma with a new mTOR kinase inhibitor,” *Blood*, vol. 116, no. 22, pp. 4560–4568, 2010.
- [93] M. E. Feldman *et al.*, “Targeting TORC2 in multiple myeloma with a new mTOR kinase inhibitor,” *Nat. Chem. Biol.*, vol. 23, no. 2, pp. 4560–4568, 2010.
- [94] M. L. Ballinger *et al.*, “Masitinib demonstrates anti-proliferative and pro-apoptotic activity in primary and metastatic feline injection-site sarcoma cells,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 13, no. 1, pp. 234–240, 2012.

- [95] J. C. Yao *et al.*, “Clinical and in vitro studies of imatinib in advanced carcinoid tumors,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 13, no. 1, pp. 234–240, 2007.
- [96] M. L. Ballinger *et al.*, “Imatinib inhibits vascular smooth muscle proteoglycan synthesis and reduces LDL binding in vitro and aortic lipid deposition in vivo,” *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 14, no. 6 B, pp. 1408–1418, 2010.
- [97] P. Dubreuil *et al.*, “Masitinib (AB1010), a potent and selective tyrosine kinase inhibitor targeting KIT,” *PLoS One*, vol. 4, no. 9, 2009.
- [98] K. Guzik *et al.*, “Development of the Inhibitors That Target the,” *Molecules*, vol. 24, no. 2071, pp. 1–30, 2019.
- [99] J. Simard, I. Luthy, J. Guay, A. Bélanger, and F. Labrie, “Characteristics of interaction of the antiandrogen flutamide with the androgen receptor in various target tissues,” *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 44, no. 3, pp. 261–270, 1986.
- [100] I. A. Luthy, D. J. Begin, and F. Labrie, “Androgenic activity of synthetic progestins and spironolactone in androgen-sensitive mouse mammary carcinoma (Shionogi) cells in culture,” *J. Steroid Biochem.*, vol. 31, no. 5, pp. 845–852, 1988.
- [101] B. Marchetti and F. Labrie, “Characteristics of flutamide action on prostatic and testicular functions in the rat,” *J. Steroid Biochem.*, vol. 29, no. 6, pp. 691–698, 1988.

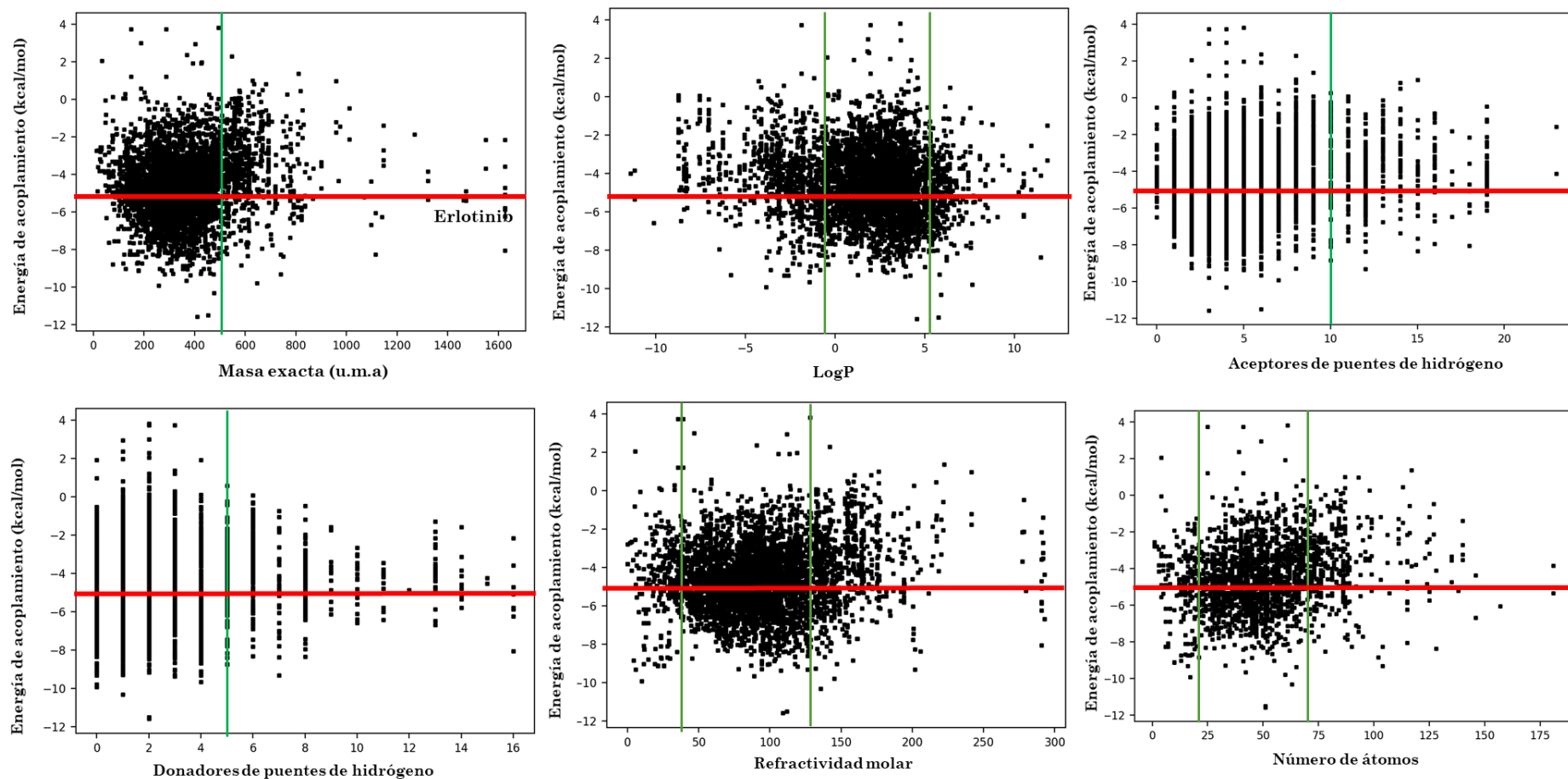
11 ANEXOS

Anexo 1.

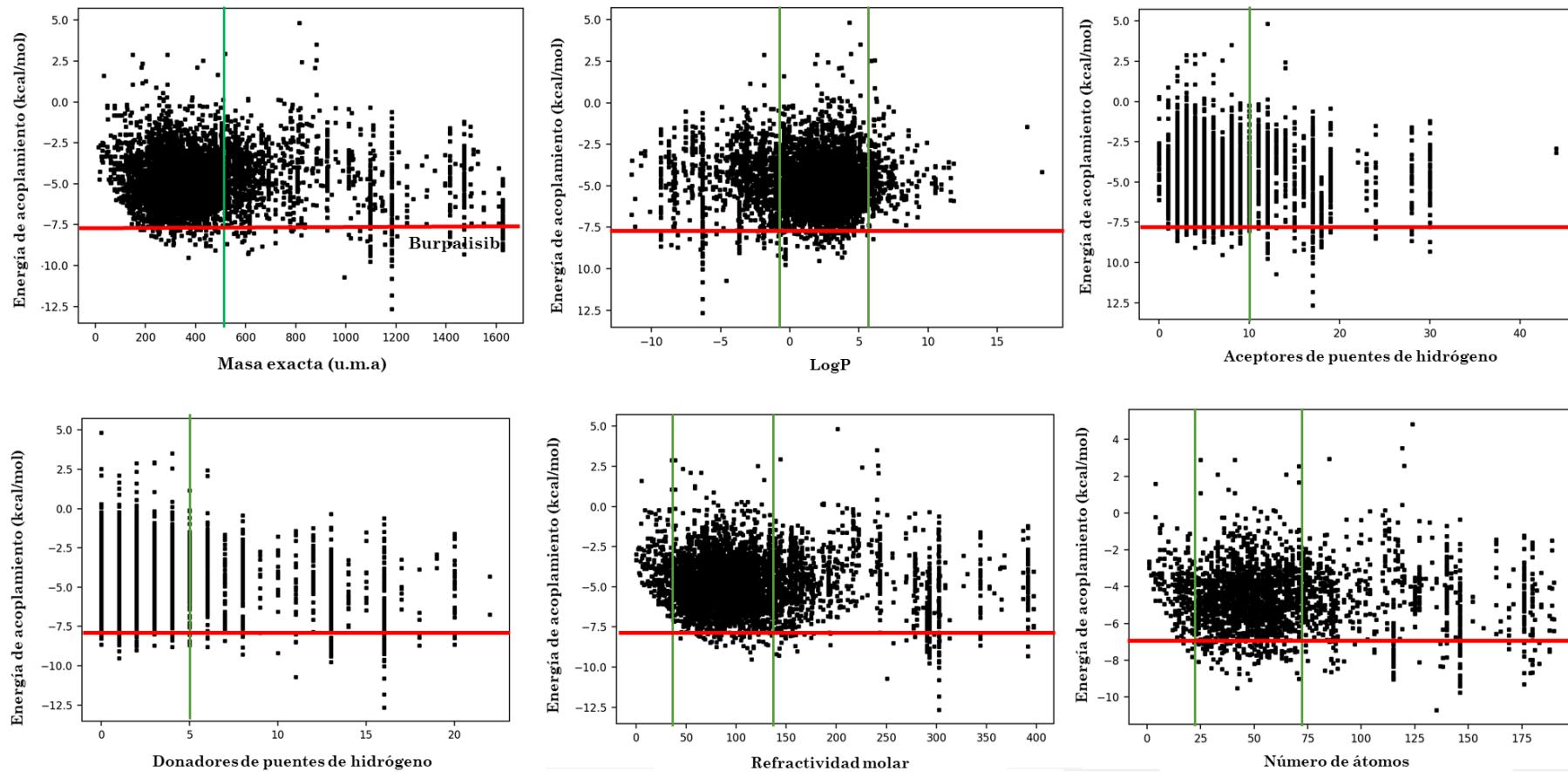
Gráficas CLG de AR sitio de unión del ligando endógeno



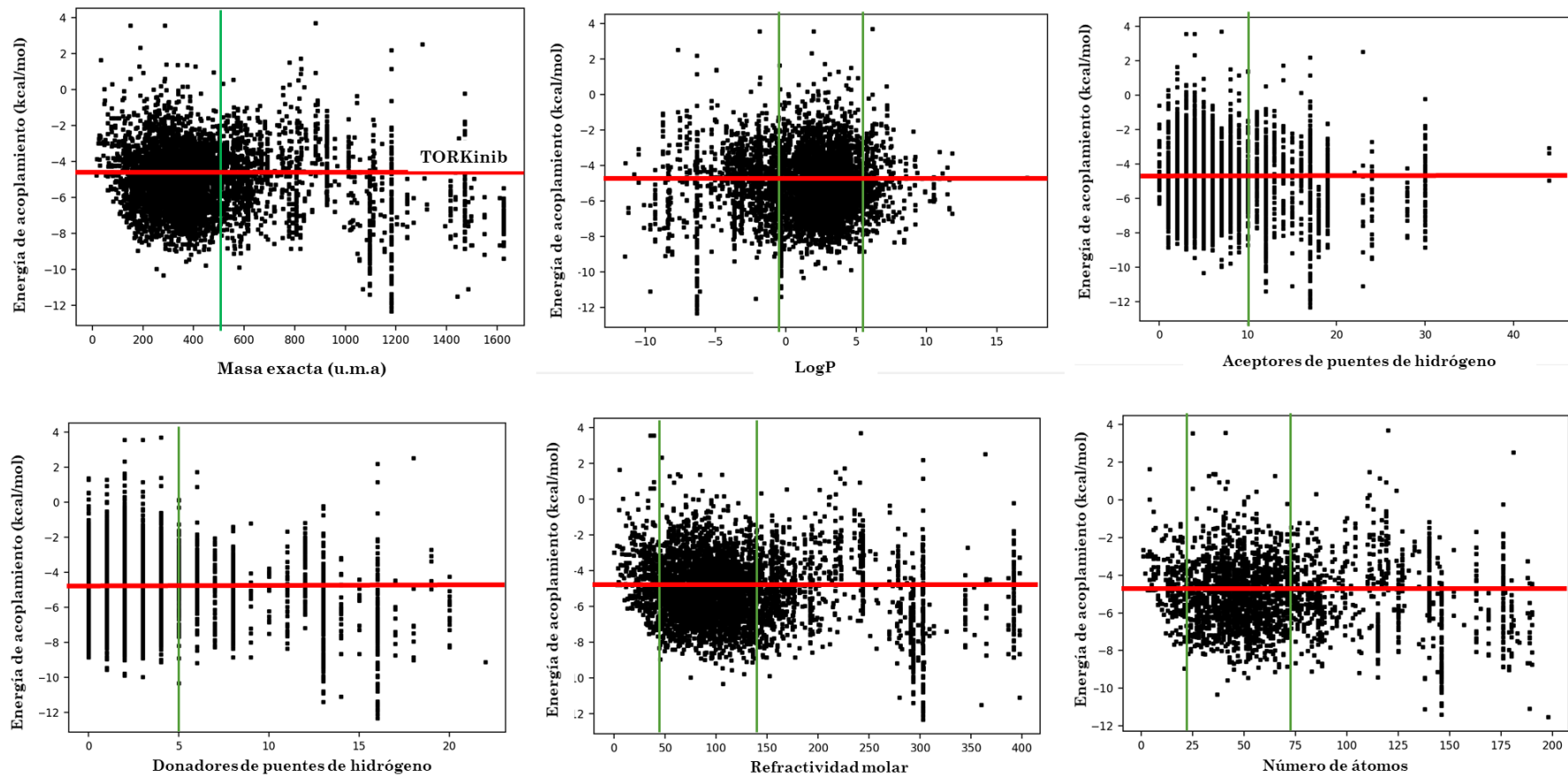
Gráficas CLG de EGFR



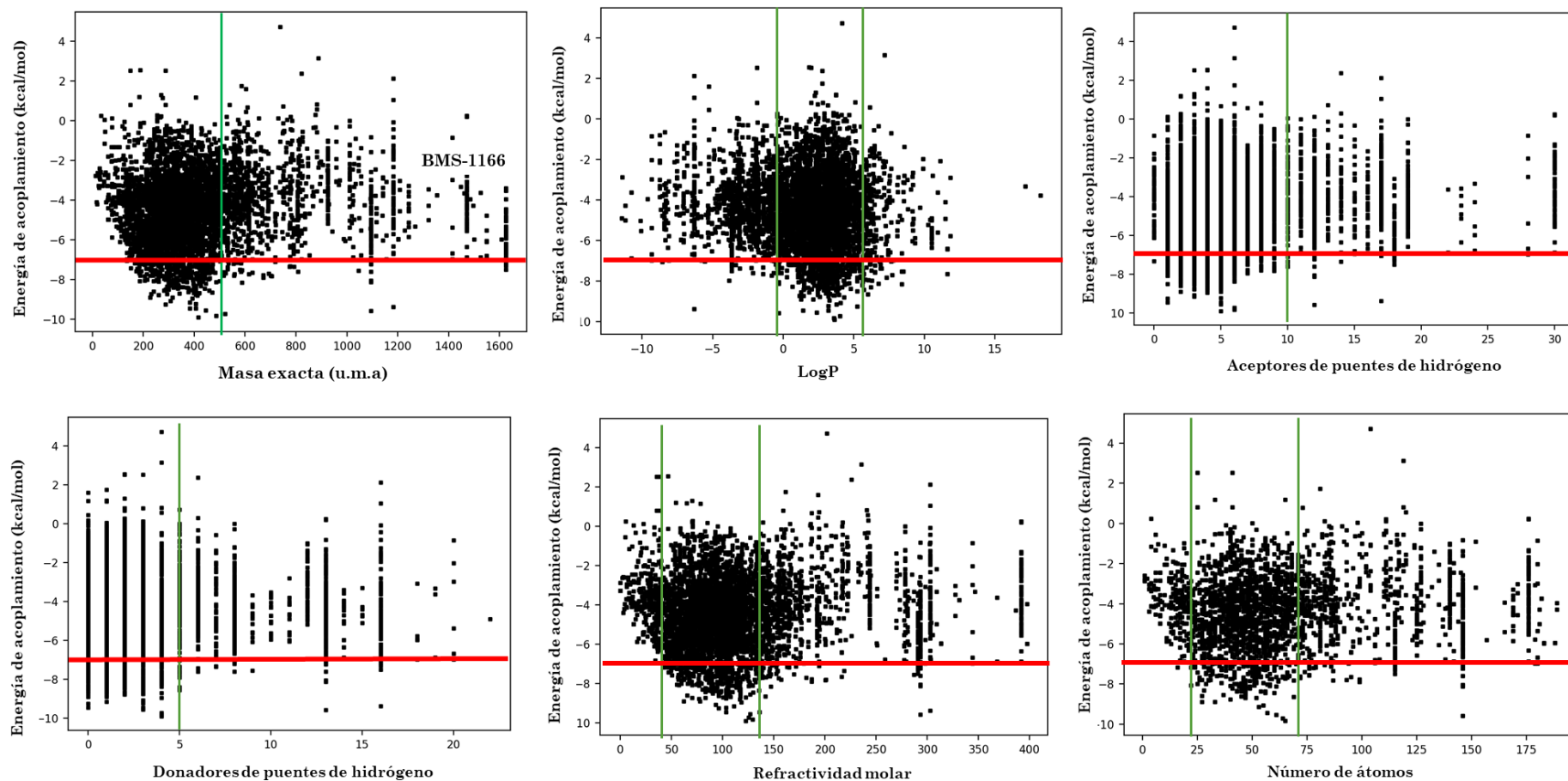
Gráficas CLG de p110 α



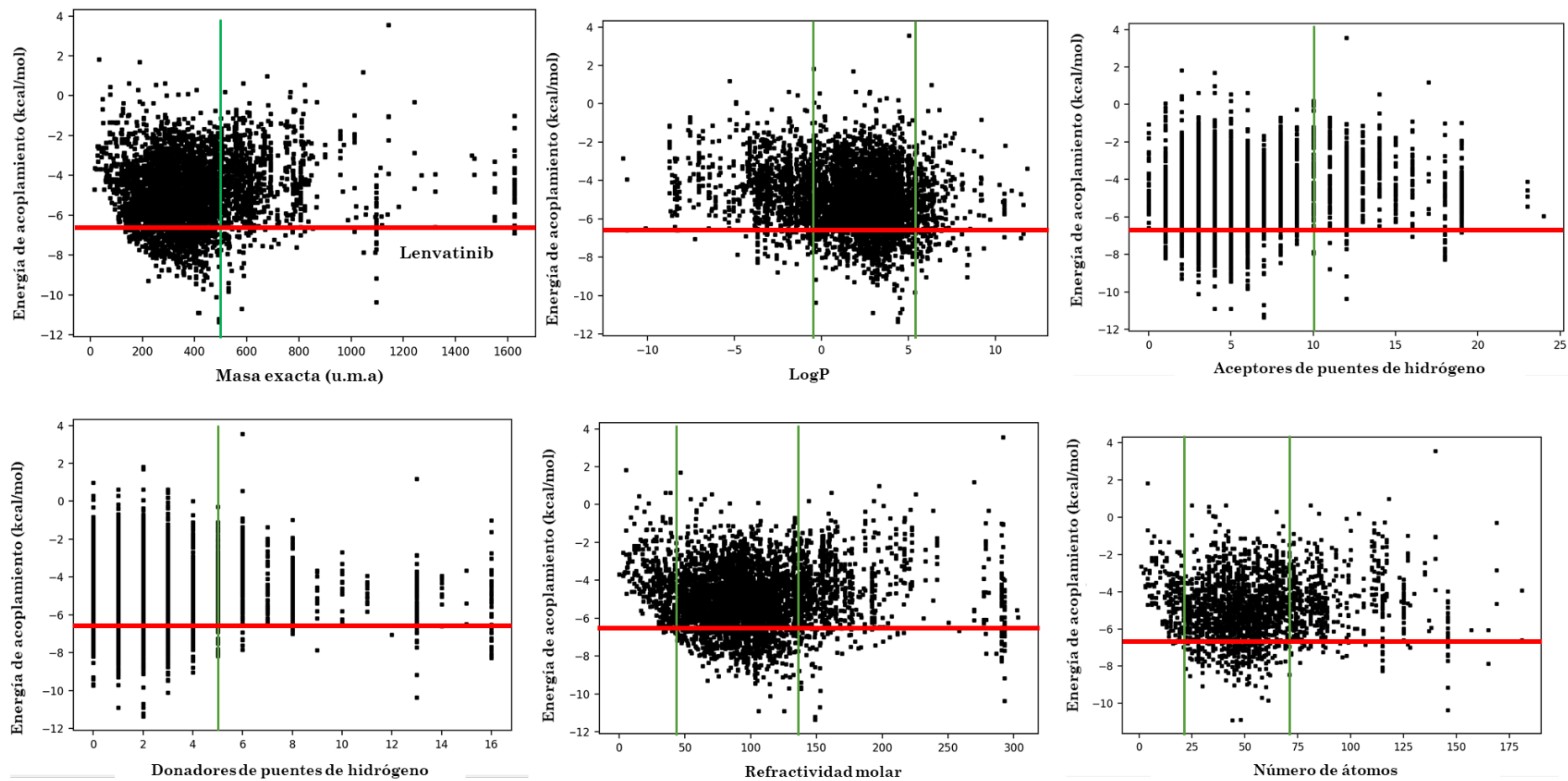
Gráficas CLG de mTOR



Gráficas de CLG para PD-L1



Gráficas de CLG de PDGFR



Anexo 2

Energías de acoplamiento de los fármacos candidatos para reposicionamiento monoproteína

Proteína	Fármaco	EA (kcal/mol)	Inhibidor y EA (kcal/mol)
EGFR	Bumadizona	-8.323	Lapatinib = -7.53
	Tolnaftato	-6.057	Erlotinib = -5.78
P110A	Enzalutamida	-8.018	Omipalisib = 8.33
	Filgotinib	-7.658	Alpelisib = -8.08
	Guanabenz	-7.329	Burpalisib = -7.76
PDGFR	Artesunato	-6.611	Imatinib = -12.03 Masitinib = -10.71 Lenvatinib = -6.57
PD-L1	Risperidona	-7.668	BMS-202 = -10.77
	Sacubitril	-7.741	BMS-1 = -9.56 BMS-1166 = -7.22
ARa	Talbutal	-4.932	RB1 = -3.42
	Amobarbital	-4.805	
	Mecamilamina	-4.589	
	Ticarcilina	-4.368	
	Ascorbato ferroso	-3.651	
ARe	Nalbufina	-7.948	Flutamida = -6.75
	Nalmefeno	-7.279	
	Acetato de cortisona	-7.182	
	Disopiramida	-7.094	
ARae	Tiopental	-3.822	
	Oximorfona	-3.876	
	Memantina	-3.902	
	Naloxona	-3.458	

Proteína	Fármaco	EA (kcal/mol)	Inhibidor y EA (kcal/mol)
mTOR	Treprostinil	-7.147	TORKinib = -4.89 Sapanisertib = -3.93
	Micofneolato de mofetilo	-6.912	
	Olanzapina	-6.774	
	Amisulprida	-6.751	
	Nafcilina	-6.623	
	Amilmetacresol	-6.504	
	Fisostigmina	-6.197	
	Ranitidina	-6.192	
	Colchisina	-6.166	
	Atenolol	-6.158	
	Hidroxicina	-6.038	
	Trandolapril	-5.977	
	Moxifloxacino	-5.975	
	Trimetoprima	-5.831	
	Valdecoxib	-5.826	
	Venlafaxina	-5.806	
	Escitalopram	-5.786	
	Metoprolol	-5.752	
	Procarbazina	-5.727	
	Sulfametoxazol	-5.711	
	Cefdinir	-5.694	
	Loratadina	-5.676	
	Moxonidina	-5.67	
	Benzatropina	-5.656	
	Nizatidina	-5.643	
	Papaverina	-5.621	
	Prasugrel	-5.62	
	Guaifenesina	-5.561	
	Benazepril	-5.551	
	Oxibutinina	-5.506	
	Oxacilina	-5.483	
	Ramipril	-5.475	
	Felodipina	-5.469	
	Clevidipina	-5.436	
Levocetirizina	-5.379		
Pimavanserina	-5.378		
Amlodipino	-5.366		
Levamlodipina	-5.366		
Propantelina	-5.366		
Dicloxacilina	-5.175		
Pitolisant	-5.04		
Captopril	-5.008		

Energías de acoplamiento de los fármacos candidatos para reposicionamiento multiproteína.

Conjunto 1				
Fármaco	EA (kcal/mol)			
	ARa	ARe	EGFR	mTOR
Dienogest	-3.705	-9.315	-6.351	-7.029
Eslicarbazepina	-5.111	-8.762	-5.808	-6.486
Lorcaserina	-3.872	-8.587	-6.074	-6.864
Mazindol	-4.475	-8.571	-8.067	-4.695
Molindona	-3.475	-8.408	-6.385	-6.829
Pseudoefedrina	-3.748	-6.976	-7.228	-6.18
Tocainida	-3.683	-7.411	-5.965	-5.693
Zonnisamida	-4.624	-7.831	-6.687	-6.111

Conjunto 2			
Fármaco	EA (kcal/mol)		
	EGFR	p110a	mTOR
Ademetionina	-6.639	-7.281	-6.152
Azelastina	-7.164	-7.209	-7.573
Doxazosina	-6.535	-7.497	-7.473
Ivacaftor	-6.604	-7.433	-5.049
Palbociclib	-8.089	-7.519	-9.791
Pixantrona	-6.246	-7.234	-7.553
Selinexor	-6.917	-7.62	-8.047