



UNIVERSIDAD PERUANA  
**CAYETANO HEREDIA**

**FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA**  
**“Alberto Cazorla Talleri”**

**Reposicionamiento *in silico* de fármacos  
antiparasitarios como inhibidores de la glutaminasa  
GAC, una enzima sobreexpresada en células  
cancerosas**

**Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico**

**Autor**

Bach. Pedro Francisco Huerta Roque

**Asesora**

PhD.MSc. Claudia Machicado Rivero

Lima - Perú

2023

**UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA**  
"Alberto Cazorla Talleri"



**Reposicionamiento *in silico* de fármacos antiparasitarios como inhibidores de la glutaminasa GAC, una enzima sobreexpresada en células cancerosas**

Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

**Autor**

Bach. Pedro Francisco Huerta Roque

**Asesora**

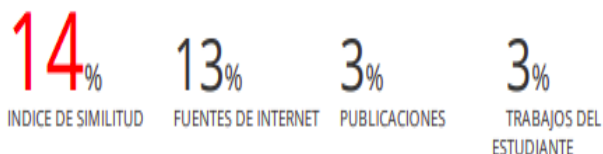
PhD.MSc. Claudia Machicado Rivero

Lima - Perú

2023

Reposicionamiento *in silico* de fármacos antiparasitarios como inhibidores de la glutaminasa GAC, una enzima sobreexpresada en células cancerosas

INFORME DE ORIGINALIDAD



FUENTE QUE CONTIENE COINCIDENCIAS

**1** Submitted to Universidad Peruana Cayetano Heredia **2%**  
Trabajo del estudiante

2%

★ Submitted to Universidad Peruana Cayetano Heredia  
Trabajo del estudiante

Excluir citas Activo

Excluir coincidencias Apagado

Excluir bibliografía Activo

<b>Índice</b>	
<b>Resumen</b>	1
<b>Abstract</b>	2
<b>1. Introducción</b>	3
1.1 Epidemiología del cáncer	3
1.2 Biología del cáncer	3
1.3 Glutaminasas	5
1.4 Retos en el desarrollo de fármacos	9
1.5 Reposicionamiento <i>in silico</i> de fármacos con indicaciones aprobadas	10
<b>2. Pregunta de Investigación y Objetivos</b>	12
2.1 Problema de investigación	12
2.2 Pregunta de investigación	13
2.1 Objetivo general	13
2.1 Objetivos específicos	13
<b>3. Metodología</b>	14
3.1 Tipo de investigación	14
3.2 Muestras	14
3.3 Preparación de ligandos	15
3.4 Preparación de estructuras proteicas	17
3.5 Cribado virtual	18
3.6 Validación del acoplamiento molecular	19
3.7 Simulaciones de dinámica molecular	20
3.8 Análisis de trayectorias	21
<b>4. Resultados</b>	24
4.1 Ensayos del cribado virtual	24
4.2 Ensayos de dinámicas molecular	29
4.3 MM/PBSA	35
<b>5. Discusión</b>	37
<b>6. Conclusiones</b>	41
<b>7. Referencias bibliográficas</b>	42
<b>8. Anexos</b>	49

## **Resumen**

En los últimos años, ha crecido el interés por diseñar nuevos inhibidores de glutaminasas codificadas por *GLS1*, ya que esas enzimas se encuentran sobreexpresadas en diferentes tipos de cáncer y favorecen el metabolismo de la glutamina. Este último es un nutriente esencial para la proliferación de células cancerosas, por lo que inhibiendo la glutaminasa, se busca disminuir sustancialmente la glutamina y con ello la proliferación del tumor. Sin embargo, sólo se han descrito pocos inhibidores de glutaminasas y la mayoría presentan baja solubilidad. Por ello, en el presente estudio se propuso identificar medicamentos antiparasitarios que mostraran afinidad por la glutaminasa GAC, mediante simulaciones de acoplamiento y dinámica molecular: reposicionamiento *in silico*. Los ensayos de acoplamiento molecular predijeron a Posaconazol, Mebendazol y Mefloquina como potenciales inhibidores de GAC. A partir de las simulaciones de dinámica molecular, se encontró que Posaconazol presenta similar estabilidad y energía de afinidad que los controles positivos en su unión al sitio alostérico de la glutaminasa GAC. También, Mefloquina se mantiene estable en el sitio alostérico pero genera diferentes cambios conformacionales sobre GAC. No obstante, el Mebendazol no mantiene su estabilidad en el sitio de unión alostérico y su unión por GAC no sería viable. Con los hallazgos del presente trabajo, se podrán realizar estudios para demostrar *in vitro* la afinidad de Posaconazol y Mefloquina por GAC y si ello resulta positivo, validar el mecanismo de acción de Posaconazol y Mefloquina sobre las células cancerosas a través de la inhibición de las glutaminasas.

**Palabra clave:** Cáncer, glutaminasa GAC, reposicionamiento, inhibidores, simulaciones teóricas, acoplamiento molecular, dinámica molecular.

## **Abstract**

In recent years, interest has grown in designing new GLS1-encoded glutaminase inhibitors, since these enzymes are overexpressed in different types of cancer and favor glutamine metabolism. The latter is an essential nutrient for the proliferation of cancer cells, so by inhibiting glutaminase, it is sought to reduce glutamine substantially and with it the proliferation of the tumor. However, only a few glutaminase inhibitors have been described and most have low solubility and specificity. Therefore, the present study proposed identifying antiparasitic drugs that show an affinity for GAC glutaminase through coupling simulations and molecular dynamics: *in silico* repositioning. Molecular docking assays predicted posaconazole, mebendazole, and mefloquine as potential GAC inhibitors. From molecular dynamics simulations, it was found that Posaconazole exhibits similar stability and affinity energy as positive controls in its binding to the GAC glutaminase allosteric site. Also, Mefloquine remains stable at the allosteric site but generates different conformational changes on GAC. However, Mebendazole does not maintain its stability in the allosteric binding site and its binding by GAC would not be viable. With the findings of this work, studies can be carried out to demonstrate *in vitro* the affinity of Posaconazole and Mefloquine for GAC and, if this is positive, validate the mechanism of action of Posaconazole and Mefloquine on cancer cells through glutaminase inhibition.

**Keywords:** Cancer, GAC glutaminase, repositioning, inhibitors, theoretical simulations, molecular docking, molecular dynamics.

# I. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Epidemiología del cáncer

El cáncer es una de las principales causas de muerte en todas las regiones del mundo, independientemente del Índice de desarrollo humano de cada país. Según las estimaciones de GLOBOCAN, en el año 2020 hubo 19,3 millones de nuevos casos de cáncer y aproximadamente 10 millones de muertes. Se estima que, en el año 2040, se produzcan 28,4 millones de nuevos casos de cáncer. El cáncer de mama femenino es el que mayormente se diagnostica, seguido del cáncer de pulmón, colorrectal, de próstata y de estómago. No obstante, el cáncer de pulmón es el que ocasiona más muertes en el mundo, seguido del cáncer colorrectal, del hígado, del estómago y de mama femenino (1). En el Perú, en el año 2020, se estimaron 69 869 nuevos casos de cáncer y 34 976 defunciones, siendo los cánceres de próstata, mama, estómago, colorrectal y cuello uterino los que registraron mayor incidencia entre la población peruana (2).

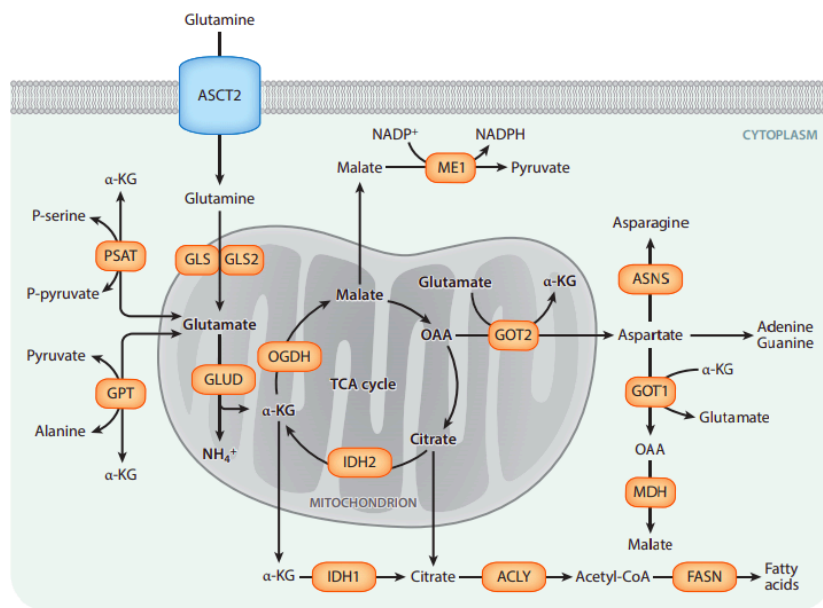
## 1.2 Biología del cáncer

El cáncer es un conjunto de enfermedades que se caracterizan por el desarrollo anormal de las células, las cuales se dividen de manera incontrolada y reducen su tasa de apoptosis (3). El cáncer puede desarrollarse en cualquier parte del cuerpo, como en los pulmones, en el seno, en el colón o en la sangre, y se destaca por invadir tejidos cercanos (4). Los diferentes tipos de cáncer son ocasionados por mutaciones en genes que regulan el crecimiento y la división celular. Los cambios genéticos que causan el cáncer raramente se heredan de los padres. Por el contrario, la mayor parte de los casos de cáncer son somáticos, es decir, se generan como resultado de la exposición a determinados factores de riesgo, como agentes cancerígenos, el sedentarismo, la obesidad, el tabaquismo, entre otros (3,4).

Para satisfacer sus requisitos bioenergéticos y biosintéticos, las células cancerosas mantienen la señalización mitogénica activa, evaden la actividad de los supresores de tumores, resisten a la muerte celular programada, mantienen un potencial replicativo ilimitado, principalmente por la formación continua de los telómeros, inducen la

angiogénesis, son capaces de diseminarse a otros tejidos del cuerpo, evaden la respuesta inmunológica y reprograman su metabolismo energético para favorecer su capacidad proliferativa (5). A todas estas características se les conoce como “*hallmarks*” del cáncer, ya que están presentes siempre en el tejido canceroso (6).

Dado el incremento en la división celular, el metabolismo energético de las células cancerosas es muy activo. Así, las principales vías metabólicas reprogramadas en las células cancerosas (alteraciones metabólicas que permiten obtener y utilizar nutrientes para sostener la proliferación desregulada) son la glucólisis aeróbica y la glutaminólisis que se caracterizan por un catabolismo excesivo de glucosa y glutamina, respectivamente (7). La glutaminólisis es el proceso mediante el cual las células convierten la glutamina en metabolitos del ciclo del ácido tricarboxílico (TCA). Primero, la glutamina se convierte en glutamato a través de las enzimas glutaminasas. Luego, el glutamato se convierte en  $\alpha$ -cetoglutarato por la glutamato deshidrogenasa o por un grupo de transaminasas (**Figura 1**). Muchos tipos de cáncer dependen de este conjunto de reacciones anapleróticas para mantener la integridad de los intermediarios del ciclo del TCA, los cuales son precursores metabólicos críticos para la generación de aminoácidos no esenciales, nucleótidos, lípidos y glutatión. Por lo tanto, el metabolismo de la glutamina es indispensable para la proliferación de las células cancerosas (8).



**Figura 1. Metabolismo de glutamina.** La glutamina se absorbe en las células a través del transportador ASCT2. Las glutaminasas (*GLS* o *GLS2*) catalizan la primera reacción de la glutaminólisis. El glutamato formado se metaboliza a  $\alpha$ -cetoglutarato ( $\alpha$ -KG) mediante la acción de la glutamato deshidrogenasa (GLUD). El malato del ciclo del TCA se puede exportar al citoplasma para generar NADPH y piruvato a través de la enzima málica (ME). El oxalacetato (OAA) se puede convertir en aspartato, que permite la generación de asparagina y la síntesis de nucleótidos. El citrato del ciclo de TCA se puede exportar fuera de la mitocondria para la síntesis *de novo* de ácidos grasos. Figura tomada de Yang (8).

### 1.3 Glutaminasas

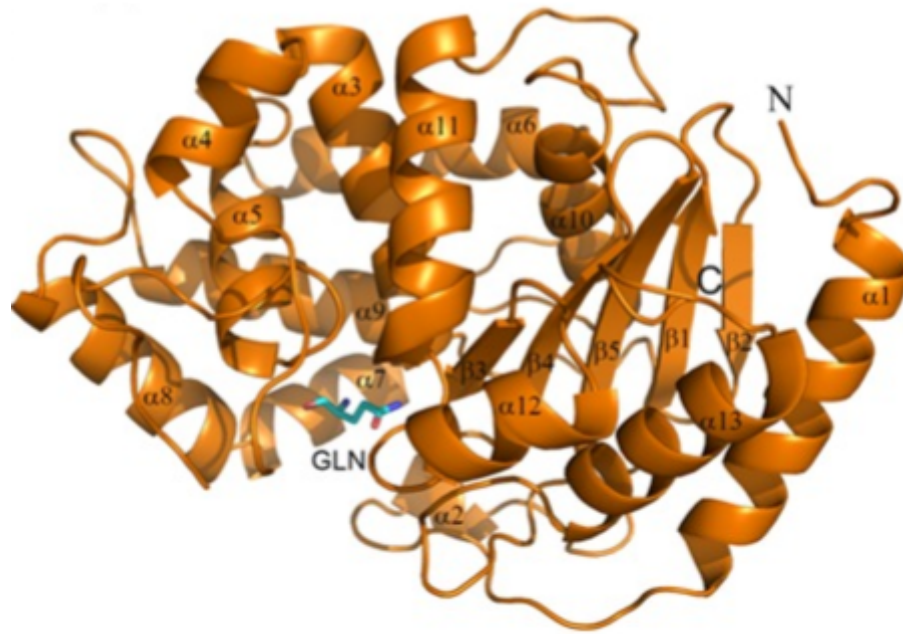
El primer paso de la glutaminólisis es controlado por la glutaminasa, la cual se encuentra sobreexpresada en diferentes tipos de cáncer, como en el cáncer de hígado y de colon, favoreciendo el metabolismo de la glutamina. Por lo tanto, inhibir su función es una estrategia prometedora para el tratamiento del cáncer.

La glutaminasa se expresa en humanos como dos isoenzimas: la glutaminasa de tipo renal codificada por *GLS1* y la glutaminasa de tipo hepático codificada por *GLS2*. El gen *GLS1* está ubicado en el cromosoma 2, consta de 19 exones y codifica dos isoformas de glutaminasa, por el empalme alternativo de los exones. La primera es la



forma más larga llamada glutaminasa de tipo renal (KGA) compuesta por 18 exones (exones 1-14 + 16-19) y la segunda es una forma más corta llamada glutaminasa C (GAC), que contiene los primeros 15 exones del gen. Ambas isoformas son inactivas como dímeros, pero muestran actividad catalítica cuando se encuentran como tetrameros. Estas enzimas se sobreexpresan en las células cancerosas y cumplen un rol importante en el desarrollo de neoplasias como la leucemia mieloide aguda, el cáncer de mama, el cáncer colorrectal, el cáncer de riñón, el cáncer de pulmón, el melanoma y el cáncer de páncreas. Por el contrario, el gen *GLS2* que está ubicado en el cromosoma 12 y contiene 18 exones, codifica dos isoformas: la glutaminasa de tipo hepático (LGA), que carece del exón 1, y la glutaminasa B (GAB). Estas enzimas no se sobreexpresan en las células cancerosas y se postula que actúan como supresores de tumores (9).

Las dos isoformas codificadas por *GLS1* presentan una alta identidad de secuencia y sus dominios catalíticos se pliegan de manera similar. La isoforma KGA tiene una longitud de 669 aminoácidos, mientras que GAC tiene una secuencia de 598 aminoácidos. Ambas secuencias son idénticas hasta el aminoácido 550 y difieren en sus extremos C-terminales. KGA presenta un péptido señal mitocondrial (residuos 1-16), una secuencia para un receptor nuclear - NR box (residuos 139-143), un dominio catalítico (residuos 221-533), tres repeticiones de ankyrin (557-650) y una señal de degradación - KEN box (residuos 656-658). En GAC, también los primeros 16 residuos representan una secuencia de localización mitocondrial, sin embargo, después de su localización en las mitocondrias, los primeros 72 residuos de esta enzima se eliminan. El resto de la proteína consta de tres dominios: el dominio N-terminal, el dominio catalítico [**Figura 2**] y el dominio C-terminal. Cabe mencionar que la isoforma GAC es la que se expresa con mayor frecuencia en células cancerosas (9,10,11).

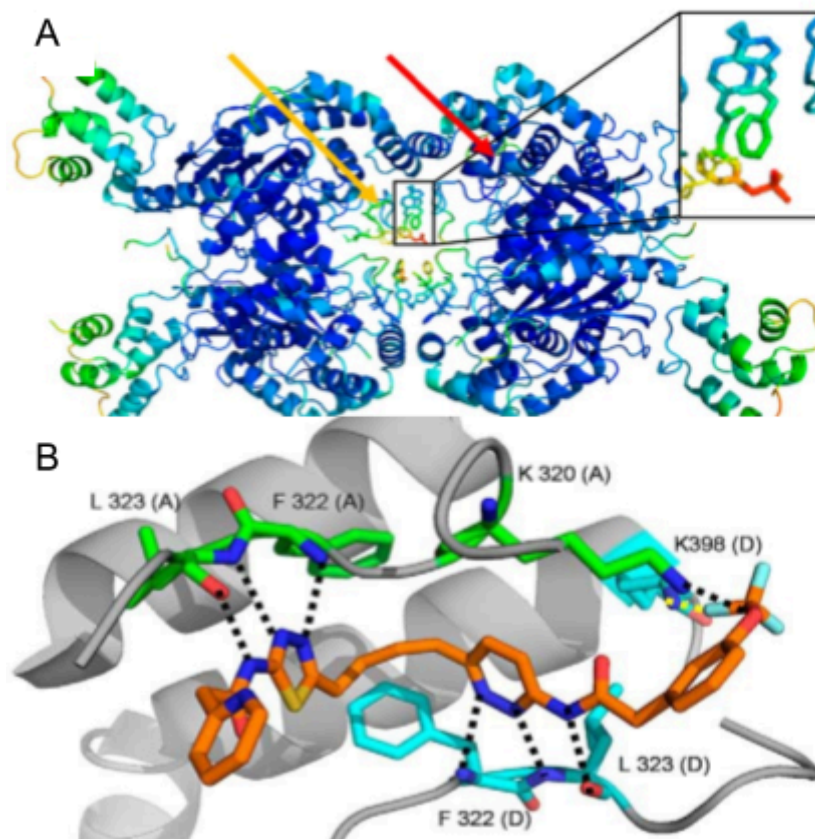


**Figura 2. Estructura del dominio catalítico de KGA unido a L-glutamina (GLN).** El dominio catalítico de las glutaminasas está conformado por dos subdominios: el subdominio I (residuos Ile221-Pro281 y Cys424 -Leu533) comprende una hoja  $\beta$  antiparalela de cinco hebras ( $\beta 2 \downarrow \beta 1 \uparrow \beta 5 \downarrow \beta 4 \uparrow \beta 3 \downarrow$ ) rodeada por seis hélices  $\alpha$  y varios bucles y el subdominio II (Phe282-Thr423) que consta principalmente de siete hélices  $\alpha$ . Código PDB: 3CZD. Figura tomada de Thangavelu (11).

El rol fundamental de las enzimas codificadas por *GLS1* en el desarrollo de cáncer, ha permitido que en los últimos años diversos grupos de investigación se enfoquen en desarrollar inhibidores específicos contra estas glutaminasas. Los primeros inhibidores desarrollados contra las glutaminasas fueron moléculas análogas a la glutamina, como acivicina o DON (12). No obstante, estos inhibidores no son específicos para las glutaminasas sino que inhiben la actividad de otras enzimas que también utilizan como sustrato la glutamina (13). En consecuencia, los inhibidores miméticos de glutaminasa generan toxicidad y no pueden ser usados en la práctica clínica.

Para solucionar ese problema, se busca inhibir a las glutaminasas de forma específica mediante inhibidores alostéricos. El primer inhibidor alostérico descubierto fue la dibenzofenantridina-968, que se une a la interfaz monómero-monómero del dímero de GAC. No obstante, se ha demostrado que esta molécula no tiene ningún efecto inhibitorio contra las enzimas que se encuentran activadas. Esta deficiencia y su alta hidrofobicidad

limitan su aplicación clínica (14,15). El segundo inhibidor no mimético desarrollado es BPTES, que se une a la interfaz dímero-dímero de las isoformas codificadas por *GLSI* para formar un tetrámero inactivo de la enzima (16). Sin embargo, los estudios sobre BPTES sólo se han quedado en fase preclínica debido a su baja solubilidad (17). Por ello, se han desarrollado una serie de derivados de BPTES con mejores propiedades farmacológicas. Dentro de ellos se encuentra la molécula CB-839, el único inhibidor de *GLSI* que se viene administrando a humanos en ensayos clínicos para cánceres de tumores sólidos y líquidos (18,19). El sitio de unión de CB-839 es hidrofóbico y está conformado por los residuos Leu323, Phe322, Leu321 y Lys320 del bucle de activación de cada monómero (residuos 316-332) y por los aminoácidos Tyr394 y Lys398 de las hélice  $\alpha$  que forman la interfaz dímero-dímero (10,11) [Figura 3].



**Figura 3. Estructura tridimensional de la glutaminasa GAC en complejo con CB-839.** **A.** Se muestra la estructura de GAC con el inhibidor CB-839 (PDB: 5HL1). La flecha amarilla indica el bucle de activación del monómero. CB-839 se une en la interfaz de dos bucles de activación, en consecuencia, hay dos inhibidores por cada tetrámero. La flecha roja indica el sitio activo de la enzima. **B.** El sitio alostérico de

GAC se caracteriza por formar puentes de hidrógeno con CB-839. La mayoría de estas interacciones se forman entre los anillos heteroatómicos del inhibidor y grupos amina o amida de Phe322, Leu323, Tyr394 (interacción no mostrada) y Lys398; figura tomada de Huang (9).

Una estrategia para encontrar nuevos inhibidores de glutaminasas es el cribado *in silico*, que consiste en tamizar una librería de compuestos en el sitio de unión de la enzima, simulando el acoplamiento molecular (docking) entre ambas moléculas y empleando herramientas computacionales. Recientemente, se han reportado dos nuevos inhibidores de la glutaminasa de tipo renal (KGA) empleando esta técnica: el braquianteraósido A8 y la fisapubescina. El primer compuesto, se obtuvo después de realizar el acoplamiento molecular de 18 triterpenoides de nor-oleanano contra KGA. De ellos, el braquianteraósido A8 se une con mayor afinidad a KGA. Además, el ensayo de inhibición enzimática indicó que el valor de  $IC_{50}$  del braquianteraósido A8 es de 6.10  $\mu$ M, un valor similar al de BPTES ( $IC_{50} = 8.60 \mu$ M) (19, 20). También, se demostró que esta molécula induce apoptosis en células cancerosas. El segundo compuesto se identificó a partir del acoplamiento molecular de 6 withanólidos no miméticos a glutamina, simulados en el sitio activo de la KGA. En este caso, el ensayo predijo que la fisapubescina se unía con mayor afinidad a la KGA. Posteriormente, los experimentos de inhibición enzimática y los ensayos en líneas celulares cancerosas demostraron que la fisapubescina es un potente inhibidor de la KGA (21). Con toda esa evidencia, se postula que el descubrimiento de estos dos nuevos inhibidores (Braquianteraósido A8 y Fisapubescina) a partir de productos naturales pueden potencialmente ser usados para la terapia anticancerígena.

#### **1.4 Retos en el desarrollo de fármacos**

El cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo. Una estrategia para reducir la tasa de mortalidad por cáncer es el desarrollo de nuevos fármacos anticancerígenos. Para ello se debe evaluar la eficacia, la toxicidad, los perfiles farmacocinéticos y farmacodinámicos del fármaco en estudios basados en células y animales. Luego, mediante ensayos clínicos se debe demostrar la seguridad y eficacia del fármaco en humanos. Estos ensayos comprenden cuatro fases: en la fase I, se prueba

el nuevo fármaco en un grupo pequeño de personas para evaluar su seguridad, en la fase II se evalúa la seguridad y eficacia en una cohorte de personas más grande (varios cientos), en la fase III se evalúa la eficacia en grandes grupos de participantes (de varios cientos a varios miles), finalmente en la fase IV, que se realiza después de la comercialización del fármaco, se monitorea la efectividad y cualquier efecto adverso del fármaco en la población en general. Si el fármaco resulta eficaz en los ensayos de fase III, recibe la aprobación de la FDA. A pesar de la gran inversión de la industria farmacéutica en investigación y desarrollo farmacéutico (I+D), el número de nuevos medicamentos aprobados por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) es reducido (22).

Se calcula que solo 1 de cada 5000 a 10000 posibles agentes anticancerígenos recibe la aprobación de la FDA y solo el 5% de los medicamentos que ingresan a los ensayos clínicos de fase I son finalmente aprobados (22). Esto ocurre porque el desarrollo de fármacos *de novo* abarca diferentes etapas (estudios preclínicos y clínicos) que deben demostrar la seguridad y eficacia del fármaco.

### **1.5 Reposicionamiento *in silico* de drogas con indicaciones aprobadas**

El cribado *in silico* de medicamentos aprobados por la FDA para el descubrimiento de nuevos fármacos anticancerígenos ha tenido buenos resultados en los últimos años. Por ejemplo, para encontrar nuevos inhibidores de la hexoquinasa 2 (HK2), que se encuentra sobreexpresada en varios tumores sólidos, se realizó un cribado virtual utilizando la estructura cristalizada de HK2 y una biblioteca de 2924 medicamentos y nutracéuticos aprobados que se encuentra depositada en la base de datos de ZINC. A esta estrategia se le denomina reposicionamiento *in silico*, ya que testea, en computadora, la afinidad de fármacos (aprobados para una indicación) en dianas asociadas con patologías para las cuales aún no cuentan con aprobación. De todos los compuestos, la benserazida, aprobado por la FDA para el tratamiento adyuvante de la enfermedad de Parkinson, se identificó como un posible inhibidor de HK2 ya que los resultados de acoplamiento molecular mostraron que este compuesto se une con mayor afinidad al sitio de unión al sustrato (23). En base a estos resultados, se realizó un

ensayo *in vitro* de inhibición enzimática donde se demostró que la benserazida inhibe la HK2. Posteriormente, se evaluó el efecto *in vivo* de la benserazida en ratones portadores de tumores, donde la inyección intraperitoneal de benserazida a 300 y 600 mg/kg suprimió el crecimiento del cáncer y no generó toxicidad (23). Finalmente, la benserazida se reposicionó de adyuvante en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson a posible medicamento anticancerígeno.

Otro ejemplo de reposicionamiento de fármacos se aplicó en el descubrimiento de nuevos inhibidores de ERK2, la cual es una quinasa promotora de la supervivencia de células cancerosas y es un objetivo importante en el cáncer de mama. Para ello, se empezó haciendo un cribado virtual mediante acoplamiento molecular de ERK2 con 1447 fármacos aprobados por la FDA, depositados en la base de datos de DrugBank. De los resultados se identificó al amprenavir, un antiviral contra el VIH, como inhibidor de ERK2, demostrándose que el fármaco se une de forma competitiva con el sitio de unión a ATP de la ERK2 (24). Posteriormente, mediante ensayos *in vitro* se determinó que el amprenavir inhibe la actividad quinasa de ERK2 e induce la apoptosis en células de cáncer de mama humano MCF-7.

Además, mediante ensayos *in vivo*, se demostró que los ratones inyectados diariamente con 45 mg/kg/día de amprenavir inhiben eficazmente el crecimiento de xenoinjertos tumorales MCF-7 (24). Estos estudios demuestran que el reposicionamiento de fármacos, que se vale de métodos computacionales en una etapa inicial, es una estrategia esencial para el descubrimiento de nuevos fármacos que precede a los estudios preclínicos.

## II. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN Y OBJETIVOS

### 2.1 Problema de investigación

En los últimos años, ha crecido el interés por diseñar nuevos inhibidores de glutaminasas codificadas por *GLSI*, ya que esas enzimas se encuentran sobreexpresadas en diferentes tipos de cáncer y favorecen el metabolismo de la glutamina. Este último es un nutriente esencial para la proliferación de células cancerosas, por lo que inhibiendo la glutaminasa, se busca disminuir sustancialmente la glutamina y con ello la proliferación del tumor. Sin embargo, solo se han descrito pocos inhibidores de glutaminasas y la mayoría presentan baja solubilidad. Hasta el momento, el compuesto CB-839, un inhibidor alostérico de las glutaminasas, es el único que está siendo utilizado en ensayos clínicos, en combinación con otros fármacos, para el tratamiento de múltiples tumores sólidos y líquidos (19). Entonces, debido a la escasez de medicamentos para el tratamiento del cáncer y al elevado costo, así como la gran cantidad de tiempo que requiere el desarrollo de fármacos *de novo*, es necesario identificar nuevos inhibidores de glutaminasas de forma más rápida y económica.

Para ello, una estrategia a utilizar es el reposicionamiento o reutilización de fármacos, que empieza por hacer un cribado virtual basado en la estructura tridimensional (3D) de la diana terapéutica. Este método emplea herramientas bio- y químio-informáticas que sugieren afinidad molecular del medicamento sobre una diana terapéutica (25). La ventaja de esta estrategia es que ya se conocen los parámetros farmacocinéticos, farmacodinámicos y de toxicidad de estos fármacos y si se demuestra que inhiben a las glutaminasas, podrían testearse más rápidamente en estudios clínicos de fase II y III (19).

En el presente estudio, buscamos identificar medicamentos antiparasitarios que mostraran afinidad por la glutaminasa GAC, mediante un cribado *in silico* de una biblioteca de antiparasitarios y simulaciones de dinámica molecular, estrategia definida como reposicionamiento *in silico*. La elección de compuestos antiparasitarios en nuestro estudio se debe a la evidencia previa, de estudios *in vitro* e *in vivo*, que han demostrado la actividad anticancerígena de algunos compuestos antiparasitarios (26). El

reposicionamiento *in silico* de estos medicamentos deberá demostrarse en posteriores estudios experimentales. En consecuencia, identificar fármacos antiparasitarios como inhibidores de la glutaminasa GAC supondría una disminución significativa en los costos del tratamiento para el cáncer ya que la mayoría de estos son de bajo costo (22).

## **2.2 Pregunta de investigación**

Empleando simulaciones de cribado virtual y dinámica molecular, ¿muestran los fármacos antiparasitarios afinidad por la glutaminasa GAC?

## **2.3 Objetivo general**

Identificar compuestos antiparasitarios afines a la glutaminasa GAC mediante simulaciones de cribado virtual y dinámica molecular.

## **2.4 Objetivos específicos**

- Preparar las estructuras tridimensionales de la glutaminasa GAC y de los antiparasitarios para los ensayos de acoplamiento molecular.
- Simular el acoplamiento de los antiparasitarios con el sitio alostérico de la glutaminasa GAC mediante cribado virtual y validar los resultados.
- Evaluar la estabilidad de los complejos enzima-ligando mejor puntuados mediante dinámica molecular y describir sus interacciones intermoleculares.



### III. METODOLOGÍA

#### 3.1 Tipo de investigación

Esta investigación es de tipo experimental *in silico*, exploratoria, ya que a través de herramientas computacionales se busca identificar nuevos inhibidores para la glutaminasa GAC. A continuación, se muestra el flujograma de trabajo [Figura 4]. Cada etapa se describirá a detalle en las siguientes secciones.

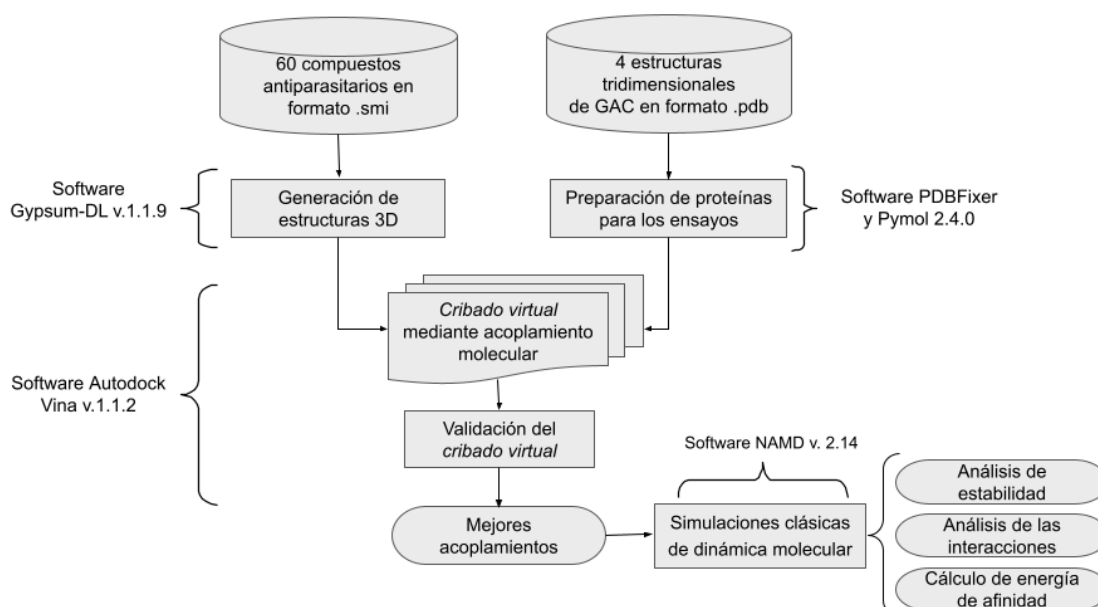


Figura 4. Flujograma de la metodología empleada en el estudio.

#### 3.2 Muestras

Está constituida por 4 estructuras tridimensionales (3D) de la glutaminasa GAC (resueltas experimentalmente por difracción de rayos X) y por una biblioteca de 60 fármacos antiparasitarios aprobados por la FDA. Se emplearon diversos recursos bioinformáticos, enlistados en el Anexo 1.

### 3.3 Preparación de ligandos

Las bases de datos de DrugBank (27) y ChEMBL (28) contenían 60 fármacos antiparasitarios aprobados por la FDA para uso humano (**Tabla 1**). Estos compuestos se descargaron en el formato .smi, el cual contiene la información estructural. Luego, mediante el software Gypsum-DL versión 1.2.0 (29) se construyeron las estructuras 3D de cada molécula. Brevemente, Gypsum-DL genera las estructuras bidimensionales de una librería de compuestos considerando tanto los estados alternativos de ionización, en un rango de pH de 6,4 a 8,4, como las formas tautoméricas, la isomerización de los dobles enlaces (*cis* o *trans*) y los centros quirales. Posteriormente, el programa genera las estructuras 3D en formato .sdf considerando las conformaciones alternativas de los anillos no aromáticos y optimizando las geometrías de los compuestos mediante el uso de un campo de fuerza UFF. Los ligandos optimizados se convirtieron a formato .pdbqt utilizando el script de Python 'prepare\_ligand4.py' de AutoDockTools v.1.5.6 (30). Finalmente, a cada molécula se le asignó todos sus enlaces rotables y el script les añadió automáticamente las cargas de Gasteiger.

**Tabla 1.** Antiparasitarios aprobados para uso humano disponibles en DrugBank y ChEMBL

<b>Tipo de estructura</b>	<b>Fármaco</b>	<b>Código DrugBank</b>	<b>ChEMBL</b>
Benzimidazoles	Albendazol	DB00518	CHEMBL1483
	Tiabendazol	DB00730	CHEMBL625
	Mebendazol	DB00643	CHEMBL685
	Triclabendazol	DB12245	CHEMBL1086440
Nitroimidazoles	Tinidazol	DB00911	CHEMBL1220
	Metronidazol	DB00916	CHEMBL137
	Benznidazol	DB11989	CHEMBL110
	Secnidazol	DB12834	CHEMBL498847
	Nimorazol	DB12172	CHEMBL435966
	Ornidazol	DB13026	CHEMBL1449676
Quinolinas	Quinidina	DB00908	CHEMBL1294
	Amodiaquina	DB00613	CHEMBL682
	Quinina	DB00468	CHEMBL170
	Prazicuantel	DB01058	CHEMBL976
	Primaquina	DB01087	CHEMBL506
	Oxamniquina	DB01096	CHEMBL847
	Hidroxicloroquina	DB01611	CHEMBL1535
	Tafenoquina	DB06608	CHEMBL298470
	Pirvinio	DB06816	CHEMBL1201303
	Diyodohidroxiquinolina	DB09115	CHEMBL86754
	Cloroquina	DB00608	CHEMBL76
	Clorquinaldol	DB13306	CHEMBL224325
Lactonas macrocíclicas	Ivermectina	DB00602	CHEMBL1200633
	Moxidectina	DB11431	CHEMBL2104415
	Espiramicina	DB06145	CHEMBL453514
Lactonas sesquiterpénicas	Artesunato	DB09274	CHEMBL361497
	Artenimol	DB11638	CHEMBL252518
	Arteméter	DB06697	CHEMBL566534
	Artemotil	DB13851	CHEMBL301267
	Artemisina	DB13132	CHEMBL567597
Sulfonamidas	Sulfadiazina	DB00359	CHEMBL439
	Sulfametopirazina	DB00664	CHEMBL1525826
	Sulfadoxina	DB01299	CHEMBL1539
Piperazinas	Piperazina	DB00592	CHEMBL1412
	Dietilcarbamazina	DB00711	CHEMBL684
	Posaconazol	DB01263	CHEMBL1397
Naftacenocarboxamidas policíclicas	Doxiciclina	DB00254	CHEMBL1433
	Clortetraciclina	DB09093	CHEMBL404520
Pirimidinas	Pirantel	DB11156	CHEMBL1626223
	Pirimetamina	DB00205	CHEMBL36
Nitrofuranos	Furazolidona	DB00614	CHEMBL1103
	Nifurtimox	DB11820	CHEMBL290960

Derivados de fenoles	Hexilresorcinol	DB11254	CHEMBL443605
	Cloroxilenol	DB11121	CHEMBL398440
	Furoato de diloxanida	DB14638	CHEMBL1334860
Quinolonas	Mefloquina	DB00358	CHEMBL416956
Benzamidas	Nitazoxanida	DB00507	CHEMBL1401
Salicilanilidas	Niclosamida	DB06803	CHEMBL1448
Sulfonas	Dapsona	DB00250	CHEMBL1043
Imidazotiazoles	Levamisol	DB00848	CHEMBL1454
Amidinas	Pentamidina	DB00738	CHEMBL55
Biguanidas	Proguanil	DB01131	CHEMBL1377
Triazinas	Cicloguanil	DB14763	CHEMBL747
Quinazolinas	Trimetrexato	DB01157	CHEMBL119
Naftoquinonas	Atovacuna	DB01117	CHEMBL1450
Fluorenos	Lumefantrina	DB06708	CHEMBL38827
Fenantrenos	Halofantrina	DB01218	CHEMBL1107
Glicósidos de aminociclitolos	Paromomicina	DB01421	CHEMBL370143
Fluoroaminoácidos	Eflornitina	DB06243	CHEMBL830
Fosfocolinas	Miltefosina	DB09031	CHEMBL125

### 3.4 Preparación de estructuras proteicas

Se obtuvieron del Protein Data Bank (PDB; 31) 4 estructuras 3D de GAC co-cristalizadas con un inhibidor alostérico y con una resolución menor a 2.7 Å (*Tabla 2*). El acoplamiento molecular de los ligandos con las diferentes conformaciones de la proteína GAC simulará la flexibilidad del sitio alostérico de la enzima y mejorará la predicción de los acoplamientos. Se descargaron las estructuras tridimensionales en formato .pdb y, posteriormente, se utilizó el software PDBFixer (32), para añadir los residuos faltantes, convertir los residuos no estándar en sus equivalentes estándar o agregar los átomos pesados que falten en los archivos .pdb. Para el presente proyecto no se trabajó con la isoforma KGA, ya que la única estructura resuelta presenta una baja resolución atómica (PDB ID: 5UQE, resolución 3.6 Å). Las estructuras con una resolución de 3 Å o superior muestran con menos detalle la densidad electrónica de los átomos de las cadenas laterales de las proteínas, en consecuencia, se determina con poco detalle la posición de los átomos y las interacciones de un ligando con los aminoácidos del sitio de unión de estas estructuras serán poco precisas (33, 34). Tampoco se utilizó mutantes de la enzima GAC, ya que la base de datos cBioPortal (35) no reporta mutaciones *drivers* en la secuencia de *GLS1*.

Las estructuras de las glutaminasas se construyeron como dímeros a partir del ensamblaje biológico proporcionado por cada archivo .pdb utilizando el software Pymol 2.4.0 (36). Solo se agruparon los monómeros que forman el sitio de unión alostérico de CB-839 [Figura 3A] para reducir tiempos de simulación. Luego, a todas las estructuras se les añadió hidrógenos polares y las cargas de Kollman, cargas parciales asignadas a los átomos de una molécula, utilizando el software AutoDockTools v.1.5.6 (30), para finalmente guardar las estructuras en formato .pdbqt.

**Tabla 2.** Estructuras cristalizadas de GAC depositadas en el PDB con su respectivo ligando co-cristalizado

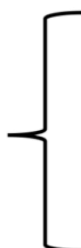
PDB ID	Residuos	Resolución (Å)	Ligando
6UMD	72-550	2.70	UPGL00012
6UL9	72-550	2.50	UPGL00023
5HL1	72-550	2.4	CB-839
3UO9	71-550	2.3	BPTES

### 3.5 Cribado virtual

Se realizó un cribado virtual semiflexible (con la proteína rígida y ligando flexible) para evaluar la interacción de cada ligando con el sitio alostérico. Para ello se usó el software Autodock Vina v.1.1.2 (Vina) (37) junto a un script de Python que automatizó el proceso (Anexo 2). Para determinar las coordenadas y el tamaño de la caja se utilizó la interfaz gráfica de AutoDockTools. Los valores obtenidos se copiaron en el archivo ‘conf.txt’ de Autodock Vina v.1.1.2 que se emplea en el script del cribado virtual. En el ensayo se usó una exhaustividad de 24 para realizar simulaciones de acoplamiento adicionales que permitan obtener resultados más precisos, como se ha reportado en trabajos previos (38). Para cada acoplamiento, se seleccionó los complejos con la energía libre de unión más negativa.

La función de puntuación de Vina se basa en los siguientes términos empíricos: interacciones tipo van der Waals (combinación de un término de repulsión y dos gaussianos atractivos), interacciones puente de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y un penalización de entropía conformacional [Figura 5].

$$G_{binding\ free\ energy} = \frac{\sum_{i=1}^5 w_i * term_i}{1 + w_6 * N_{tor}}$$



- Gauss*<sub>1</sub>(*d*)
- Gauss*<sub>2</sub>(*d*)
- Repulsion*(*d*)
- Hydrophobic*(*d*)
- HBond*(*d*)

**Figura 5. Función de puntuación de Autodock Vina.** La energía de enlace se predice como la suma de las interacciones de pares de átomos dependientes de la distancia.  $term_i$  representa el término empírico,  $w_i$  representa el peso del término empírico correspondiente,  $d$  es la distancia superficial del par de átomos.  $N_{tor}$  es el número de torsiones activas del ligando y  $w_6$  su peso asociado. *Hbond* representa el término del puente de hidrógeno.

### 3.6 Validación del acoplamiento molecular

Como control de los experimentos, se simuló el acoplamiento molecular de cada ligando co-cristalizado de la Tabla 2, previamente extraído del archivo .pdb, con su respectiva proteína, empleando la misma metodología de la sección 3.5, pero en este caso ingresando solo la proteína y un ligando por vez. Después del ensayo, se evaluó la desviación cuadrática media (RMSD) de las posiciones atómicas, entre la conformación natural del inhibidor (estructura resuelta experimentalmente) y la conformación predicha por Autodock Vina v.1.1.2 al superponer ambas estructuras mediante el software Pymol v.2.4.0. Un valor de RMSD menor a 2 Å, considera a la conformación predicha como correcta y valida el protocolo de acoplamiento (39).

Cabe mencionar que el re-acoplamiento molecular proporciona una energía de afinidad de referencia, que se utilizó como punto de corte para seleccionar posibles inhibidores de glutaminasa. Aquellos acoplamientos con la mayor afinidad ( $\Delta G < 0$ ) fueron seleccionados como posibles inhibidores de la glutaminasa. Finalmente, se comparó el número y tipo de interacciones de los complejos proteína-ligando de mayor afinidad y los controles seleccionados mediante el software PLIP v. 2.2.2 (40).

Brevemente, independientemente para cada acoplamiento proteína-ligando, se subió a Pymol la estructura de la proteína en formato .pdbqt para guardarlo como .pdb. Luego, se subió a Pymol el ligando .pdbqt para añadirle todos los hidrógenos faltantes y guardarlo en formato .pdb. A continuación, se subieron ambas estructuras (proteína y ligando) a Pymol para formar el complejo en un solo archivo .pdb. Finalmente, para cada complejo formado se ejecutó PLIP mediante línea de comandos, según las instrucciones y parámetros especificados en “<https://github.com/pharmai/plip>”.

Para seleccionar los mejores acoplamientos proteína-ligando, se eligieron aquellos con energía de afinidad menor a la obtenida por el sistema 3UO9-BPTES. Luego, se seleccionaron aquellos complejos donde se formaban principalmente interacciones de alta energía (puentes de hidrógeno, puente salino, puente halógeno), detectados con el software PLIP. Finalmente, para seleccionar complejos específicos (por tipo de proteína y ligando), se consideró la correlación entre la energía de afinidad y la formación de interacciones de alta energía.

### **3.7 Simulaciones de dinámica molecular**

Los complejos seleccionados se sometieron a simulaciones de dinámica molecular de todos los átomos. Las simulaciones se realizaron utilizando el software NAMD v. 2.14 (41), siguiendo el protocolo descrito por Hadden y Perilla con modificaciones menores (42). Brevemente, los archivos PDB de los sistemas seleccionados, se analizaron a través del módulo PDBreader del servidor web CHARMM-GUI (43), con el objetivo de agregar los átomos faltantes y corregir los nombres de los átomos para que sean compatibles con CHARMM36 FF. A continuación, la proteína se protonó a pH 7,0 utilizando la herramienta PDB2PQR (44). El PDB se usó para generar la topología del sistema a través de un script Tcl *in-house* basado en PSGEN (45), en este paso se agregó un espesor de 15 Å para resolver el sistema en una caja cúbica, con el modelo de agua TIP3P (46), y se añadió una concentración de NaCl 150 mM para introducir la fuerza iónica y neutralizar las cargas. El sistema preparado se utilizó para aplicar el reparto de masa de hidrógeno (47) para acelerar la dinámica. La topología y los parámetros para el ligando se generaron usando CGenFF (48).

Los sistemas construidos se minimizaron en presencia de una restricción armónica de  $5 \text{ kcal} \times \text{mol}^{-1} \times \text{\AA}^{-2}$  en los átomos pesados del ligando y la columna principal de la proteína durante 10000 pasos. A continuación, el sistema se calentó de 60 a 310 K, durante 5 ns, manteniendo las restricciones anteriores, luego se equilibró el sistema en un conjunto NPT con 1 bar de presión para 10 ns, donde las restricciones se redujeron gradualmente de  $5 \text{ kcal} \times \text{mol}^{-1} \times \text{\AA}^{-2}$  a  $0 \text{ kcal} \times \text{mol}^{-1} \times \text{\AA}^{-2}$ . Se verificaron las cantidades termodinámicas de temperatura y presión para asegurar que el equilibrio fuera correcto. Finalmente se realizó una producción en NPT a 310 K y 1 bar de presión durante 600 ns.

En los pasos de equilibrio y producción se utilizaron el termostato Langevin y el barostato Noose-Hoover Langevin para controlar la temperatura y la presión. Los átomos de hidrógeno rígidos de las aguas se mantuvieron con el algoritmo SETTLE (49) mientras que para el soluto se usó el algoritmo RATTLE/SHAKE (50). Las interacciones no enlazantes de corto y largo alcance se trataron con un esquema de corte en 12 Å y PME (51), respectivamente. En todos los casos se utilizó el integrador r-RESPA (52) con 2 fs y 4 fs de tiempo de integración para el equilibrio y la producción respectivamente.

### 3.8 Análisis de trayectorias

Para evaluar la estabilidad de los complejos proteína-ligando, se analizaron las trayectorias de la dinámica molecular para calcular la desviación cuadrática media (RMSD) del ligando y de la proteína, la fluctuación cuadrática media (RMSF) de cada residuo de la proteína a lo largo del tiempo, el radio de giro (Rgyr) de la proteína y el área de superficie total accesible al solvente (SASA) a 10 Å del sitio de unión alostérico. Para ello, se emplearon los scripts disponibles gratuitamente en [“https://github.com/groponp/CompBiology-Biophysics”](https://github.com/groponp/CompBiology-Biophysics).

Para obtener valores de energía más precisos se determinó la energía libre de unión ( $\Delta G_{bind}$ ) de cada complejo proteína-ligando mediante las energías de mecánica molecular combinadas con la ecuación de Poisson-Boltzmann (MM/PBSA) (53). Para ello se empleó el software gmx-MMPBSA v1.5.7 (54) y se definieron los parámetros de



acuerdo a las recomendaciones del programa. El método MM/PBSA calcula las energías libres de unión ( $\Delta G_{bind}$ ) de complejos proteína-ligando no enlazados covalentemente (mediante un ciclo termodinámico, **Figura 6**), usando la siguiente ecuación:

$$\Delta G_{bind} = \langle G_{COM} \rangle - \langle G_{REC} \rangle - \langle G_{LIG} \rangle, \quad (1)$$

donde  $\langle G_{COM} \rangle$ ,  $\langle G_{REC} \rangle$  y  $\langle G_{LIG} \rangle$ , representan los aportes energéticos promedio del complejo, receptor y ligando, que también se pueden descomponer con la siguiente ecuación:

$$\langle G_x \rangle = \langle E_{MM} \rangle + \langle G_{sol} \rangle - \langle TS \rangle, \quad (2)$$

donde  $\langle G_x \rangle$  puede ser  $\langle G_{COM} \rangle$ ,  $\langle G_{REC} \rangle$  o  $\langle G_{LIG} \rangle$ . Además,  $\langle E_{MM} \rangle$ ,  $\langle G_{sol} \rangle$  y  $\langle TS \rangle$  representan los aportes energéticos promedio de la mecánica molecular, la solvatación y la entropía. También,  $\Delta G_{bind}$  se puede representar mediante la siguiente ecuación:

$$\Delta G_{bind} = \Delta H - T\Delta S, \quad (3)$$

donde  $\Delta H$  corresponde a la entalpía de unión y  $T\Delta S$  a la entropía conformacional después de la unión del ligando. Cuando se descarta el término entrópico, el valor calculado es la energía libre efectiva, que suele ser suficiente para comparar las energías libres de unión relativas de los ligandos relacionados (54).

A su vez,  $\Delta H$  se puede descomponer en diferentes términos:

$$\Delta H = \Delta E_{MM} + \Delta G_{sol}, \quad (4)$$

dónde:

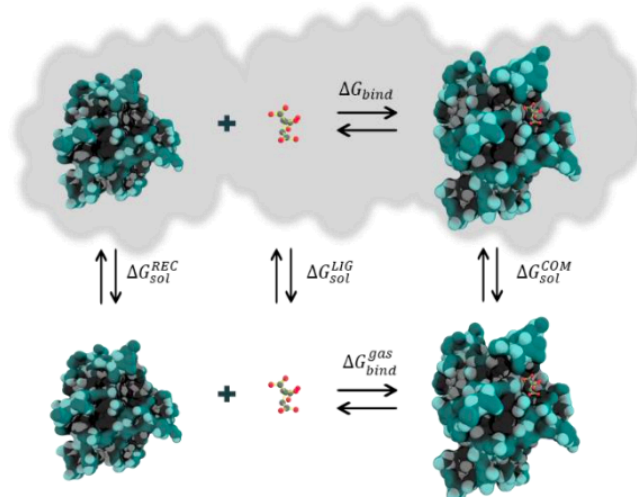
$$\Delta E_{MM} = \Delta E_{bonded} + \Delta E_{nonbonded} = (\Delta E_{bond} + \Delta E_{angle} + \Delta E_{dihedral}) + (\Delta E_{ele} + \Delta E_{vdw}), \quad (5)$$

y:

$$\Delta G_{sol} = \Delta G_{polar} + \Delta G_{non-polar} = \Delta G_{PB/GB} + \Delta G_{non-polar}. \quad (6)$$

En las ecuaciones anteriores,  $\Delta E_{MM}$  corresponde a los cambios de energía de la mecánica molecular en la fase gaseosa.  $\Delta E_{MM}$  incluye  $\Delta E_{bonded}$ , también conocida como energía interna, y  $\Delta E_{nonbonded}$ , corresponde a las contribuciones de van der Waals y electrostática. La energía de solvatación ( $\Delta G_{sol}$ ) se determina de manera diferente, dependiendo del método empleado. En los modelos *PB* o *GB* se estima solo el componente polar de la solvatación y el componente no polar es proporcional al área superficial accesible al solvente (SASA) total de la molécula.

Por lo tanto, los cálculos del estado final de los componentes energéticos ( $\Delta E_{MM}$ ,  $\Delta G_{sol}$ ,  $\Delta S$ ) se estiman a partir de los valores energéticos promedio ( $\langle E_{MM} \rangle, \langle G_{sol} \rangle, \langle TS \rangle$ ) de un conjunto de estructuras representativas del sistema simulado. En el presente trabajo, se empleó el método MM/PBSA luego de reducir las trayectorias completas a 600 frames.



**Figura 6.** Ciclo termodinámico para calcular la energía libre de unión del complejo proteína-ligando. Los sistemas solvatados se muestran sombreados de gris. La energía libre de unión se calcula restando las energías libres del receptor y ligando no unidos de la energía libre del complejo unido, como se muestra a continuación:  $\Delta G_{bind} = \langle G_{COM} \rangle - \langle G_{REC} \rangle - \langle G_{LIG} \rangle$ .

## IV. RESULTADOS

En el presente estudio, se utilizaron métodos de biología computacional para identificar fármacos potenciales que inhiben la glutaminasa GAC, que se sobreexpresa en las células cancerosas. A continuación presentamos los resultados del cribado virtual y la dinámica molecular.

### 4.1 Ensayos del cribado virtual

De los 60 fármacos antiparasitarios de estudio, se logró generar las estructuras 3D de 55 de ellos con el software Gypsum-DL versión 1.1.9), no siendo posible en 5 compuestos debido a su complejidad: Ivermectina, Moxidectina, Espiramicina, Arteminol y Artemisinina. Para resolver ese problema, se utilizó el software Obabel (54), lográndose construir las estructuras 3D de 2 de los 5 ligandos mencionados: Arteminol y Artemisinina. Sin embargo, no se pudo obtener las estructuras de 3 ligandos altamente complejos: Ivermectina, Moxidectina y Espiramicina (lactonas macrocíclicas), por lo que estas no fueron testeadas.

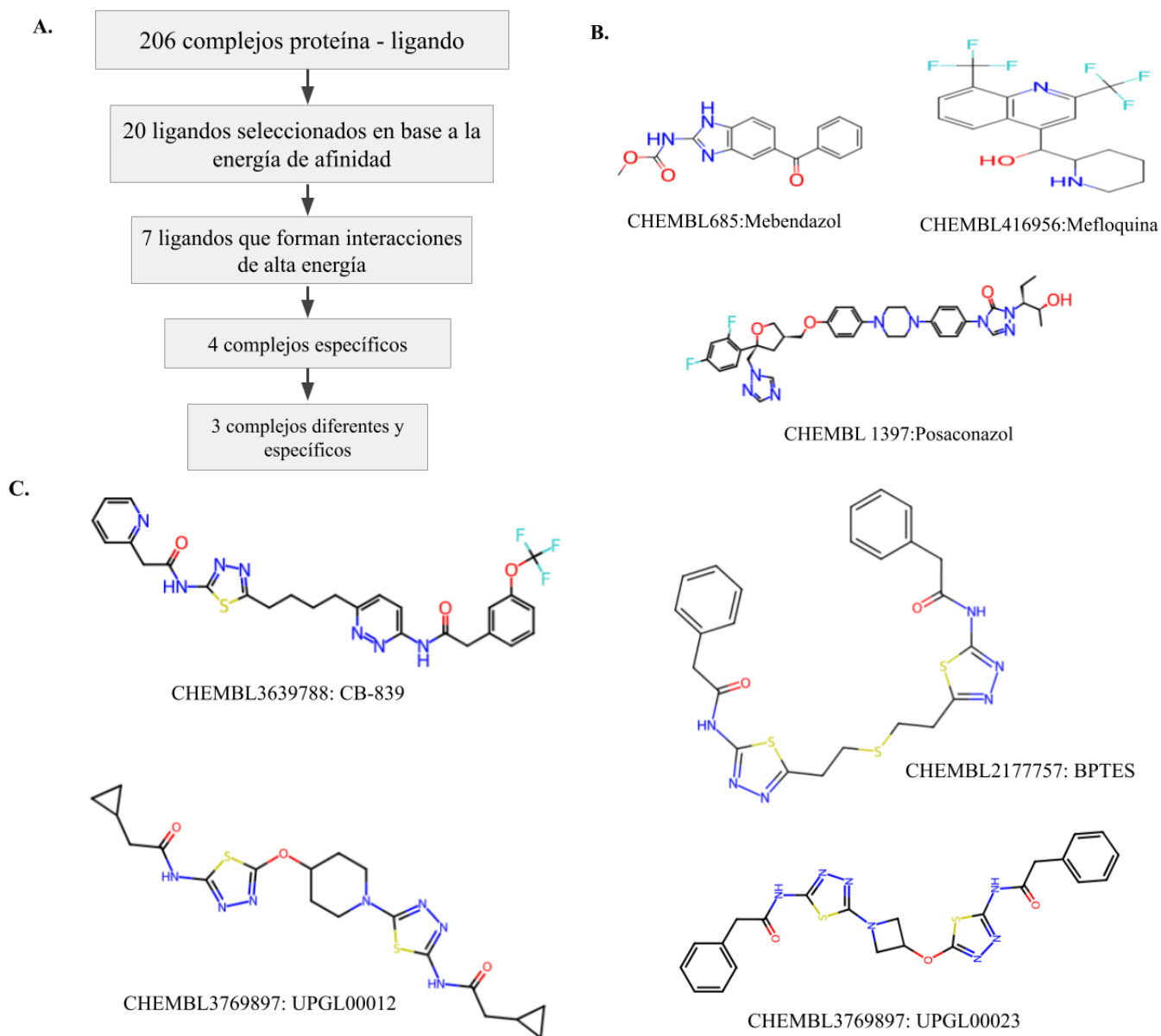
En total, 206 estructuras (producto de las diferentes variantes que genera el software Gypsum-DL para un mismo ligando) se acoplaron virtualmente a las 4 estructuras de GAC. La energía de unión de estos complejos se comparó con la energía de afinidad de los controles positivos (**Tabla 3, Figura 7C**).

**Tabla 3.** Resultados del acoplamiento molecular de las proteínas con sus respectivos ligandos co-cristalizados (controles positivos)

Proteína	Ligando	Energía (kcal/mol)	RMSD
5HL1	CB-839	-11,3	0.999
6UL9	UPGL00023	-10,6	0.905
6UMD	UPGL00012	-10,2	0.763
3UO9	BPTES	-8,7	2.621

Siguiendo el protocolo, de los 206 complejos modelados, se eligieron 20 ligandos (correspondientes a 6 antiparasitarios diferentes) con energía de afinidad más negativa o igual a  $-8.7 \text{ kcal} \times \text{mol}^{-1}$  (correspondiente a la energía del sistema 3UO9-BPTES) en al menos dos de las cuatro enzimas testeadas. Luego, se analizaron las interacciones intermoleculares de estos ligandos en el sitio de unión y se escogieron a 7 ligandos (correspondientes a Mebendazol, Mefloquina y Posaconazol con sus respectivas variantes se unen mediante interacciones de alta energía (puentes de hidrógeno, puente salino, puente halógeno) en al menos dos enzimas. Finalmente, se eligieron 4 complejos donde las interacciones de alta energía que son más estables contribuyeron principalmente en el valor de la energía libre de unión. De estos, se utilizaron 3 complejos diferentes (eliminando la variante CHEMBL685\_\_input3\_\_variant3r) con el fin de evaluar la mayor diversidad de antiparasitarios en los ensayos de dinámica molecular. Los 3 complejos elegidos para los posteriores ensayos de dinámica molecular fueron CHEMBL685-variant1-6UL9 (Mebendazolv1\_6UL9), CHEMBL416956-variant4-6UL9 (Mefloquinav4\_6UL9) y CHEMBL1397-variant4-6UMD (Posaconazolv4\_6UMD) [Figura 7A-B].

El compuesto Posaconazol tuvo la energía de interacción más alta en el sitio de unión alostérico 6UMD ( $\Delta G = -10,3 \text{ kcal} \times \text{mol}^{-1}$ ;  $KD = 0,031 \text{ } \mu\text{M}$ ). El análisis de las interacciones indica la formación de tres enlaces de hidrógeno con los residuos N324, D327 y K398. Además, el ligando forma un puente halógeno con Y394, un puente salino con D327, una interacción pi-Catión con K398 y múltiples interacciones hidrofóbicas ( $n=8$ ). Al compararlo con el control (UPGL00012), este presentó una energía de interacción similar  $\Delta G = -10,2 \text{ kcal} \times \text{mol}^{-1}$  en la misma proteína 6UMD. Este fármaco forma principalmente interacciones de enlaces de hidrógeno con K320, F322 y L323 ( $N=9$ ) y cuatro interacciones de tipo hidrofóbicas [Tabla 4, Figura 8].



**Figura 7. A.** Proceso de selección de ligandos a partir de los 206 complejos modelados con Autodock Vina. **B.** Ligandos seleccionados como potenciales inhibidores de GAC. **C.** Inhibidores conocidos de GAC (controles positivos).

Por su parte, el Mebendazol y Mefloquina tuvieron una menor energía de interacción en el sitio de unión alostérica de 6UL9 ( $\Delta G$   $-9,3 \text{ kcal} \times \text{mol}^{-1}$  y  $-8,9 \text{ kcal} \times \text{mol}^{-1}$ , respectivamente) en comparación con el control UPGL00023 que tuvo un  $\Delta G$  de  $-10,6 \text{ kcal} \times \text{mol}^{-1}$ .

El Mebendazol forma cinco puentes de hidrógeno con los residuos R317, K320, F322, L323, N324. Además, forma seis interacciones hidrofóbicas, un apilamiento Pi-Stacking con el residuo F322 y una interacción pi-Catión con el residuo K320. En cambio, Mefloquina presenta tres puentes de hidrógeno con los residuos K320 y Y394, un puente de halógeno con R317 y 6 interacciones hidrofóbicas. En tanto, el control UPGL00023 presenta ocho puentes de hidrógeno con K320, F322, L323 y N324, apilamiento Pi-Stacking con F318 y tres interacciones de tipo hidrofóbicas [**Tabla 4, Figura 8**].

**Tabla 4.** Descripción de las interacciones proteína-ligando en los tres complejos ligando- GAC elegidos y sus controles

Ligando (L)-GAC	$\Delta G$	$K_D$ ( $\mu M$ )	Puentes de hidrógeno					Interacciones hidrofóbicas			Otras interacciones								
			N	D	A	Hbond	Dis	N	ResID	L	Dis	Type	ResID	Dis					
UPGL00012- 6UMD (control)	-10,2	0,031	9	N6	K320		NH--O	3,01											
				F322	N18		NH--N	2,04											
				F322	N10		NH--N	2,19		L321	C1	3,48							
				N22	L323		NH--O	2,06		L321	C25	3,96							
				L323	N20		NH--N	2,34	4	F322	C11	3,45	-		-		-		
				N20	L323		NH--O	3,24		E325	C25	3,55							
				L323	N12		NH--N	2,16											
				N12	L323		NH--O	2,72											
				N14	L323		NH--O	2,42											
Posaconazolv4 6UMD	-10,3	0,026	3								K320	C19	3,69						
												K320	C40	3,4	HaB	Y394	3,02		
				O3	N324		OH--O	2,75		K320	C42	3,86							
				N20	D327		NH--O	2,88	8	K320	C43	3,4	SB	D327	4,31				
				K398	O9		NH--O	3,47		L321	C26	3,72							
										L321	C44	3,48	pi-C	K398	3,27				
										L321	C21	3,58							
										E325	C1	3,62							
UPGL00023- 6UL9 (control)	-10,6	0,015	8																
				K320	O29		NH--O	2,84											
				N6	K320		NH--O	2,62											
				N14	K320		NH--O	2,48		L321	C34	3,83							
				K320	O26		NH--O	2,71	3	E325	C24	3,69	pi-S	F318	5,37				
				F322	O12		NH--O	2,97		E325	C31	3,62							
				N17	L323		NH--O	2,15											
				L323	N3		NH--N	3,35											
	N3	N324		NH--O	3,07														
Mebendazolv1 6UL9	-9,3	0,144	5								K320	C21	3,59						
				R317	N8		NH--N	2,63		L321	C21	3,54	pi-S	F322	4,72				
				K320	N5		NH--N	2,97	6	L321	C20	3,37							
				F322	O9		NH--O	2,3		F322	C15	3,69	pi-C	K320	3,97				
				L323	O9		NH--O	2,28		F322	C16	3,75							
				N5	N324		NH--O	3,01		Y394	C19	3,65							
Mefloquinav4 6UL9	-8,9	0,283	3								K320	C4	3,6						
				O3	K320		OH--O	2,17		L321	C6	3,07							
				N5	K320		NH--O	2,9	6	F322	C19	3,61	HaB	R317	2,84				
				Y394	O3		OH--O	2,14		F322	C18	3,28							
										L323	C13	3,64							
										Y394	C17	3,76							

**Nota:**  $\Delta G$  está en unidades de  $kcal \times mol^{-1}$  (computado por Autodock Vina) .  $K_D$  es la constante de disociación (<https://github.com/groponp/CompBiology-Biophysics>). N el número de interacciones. D es el donante del enlace de hidrógeno, A es el aceptor de enlaces de hidrógeno. ResID el tipo de residuo. Distancia (Dis) en Å de las interacciones (computado por PLIP). Puente de halógeno (HaB), puente salino (SB), interacción pi-Stacking (pi-S) e interacción pi-Cation (pi-Ca).

## 4.2 Ensayos de dinámica molecular

A partir de simulaciones de dinámica molecular, determinamos la estabilidad y los cambios conformacionales de los complejos ligando-GAC. La estabilidad de los sistemas se determinó analizando los valores de RMSD de las proteínas y los ligandos, el RMSF para los residuos, el radio de giro (Rgyr) de la proteína, el área de superficie total accesible al solvente (SASA) a 10 Å del sitio de unión alostérico y los cálculos de energía libre.

El RMSD de la proteína en el sistema Posaconazolv4\_6UMD se incrementó durante los primeros 10 ns de simulación para luego mantener un valor promedio de aproximadamente 5 Å. De manera similar a este sistema, en los controles UPGL00012\_6UMD y UPGL00023\_6UL9, el RMSD mantuvo la misma tendencia en los primeros 10 ns que luego se estabilizó a valores menores de 5 Å durante el resto de la simulación, salvo UPGL00023 que aproximadamente a los 570 ns presentó un incremento de RMSD (su pico más alto), estabilizándose luego de 10 ns a valores menores a 5 Å. Por el contrario, el sistema Mefloquinav4\_6UL9 alcanza la estabilidad a los 50 ns con valores cercanos a 8 Å y en los últimos 100 ns de simulación, el RMSD disminuye aproximadamente a 5 Å **[Figura 9A]**.

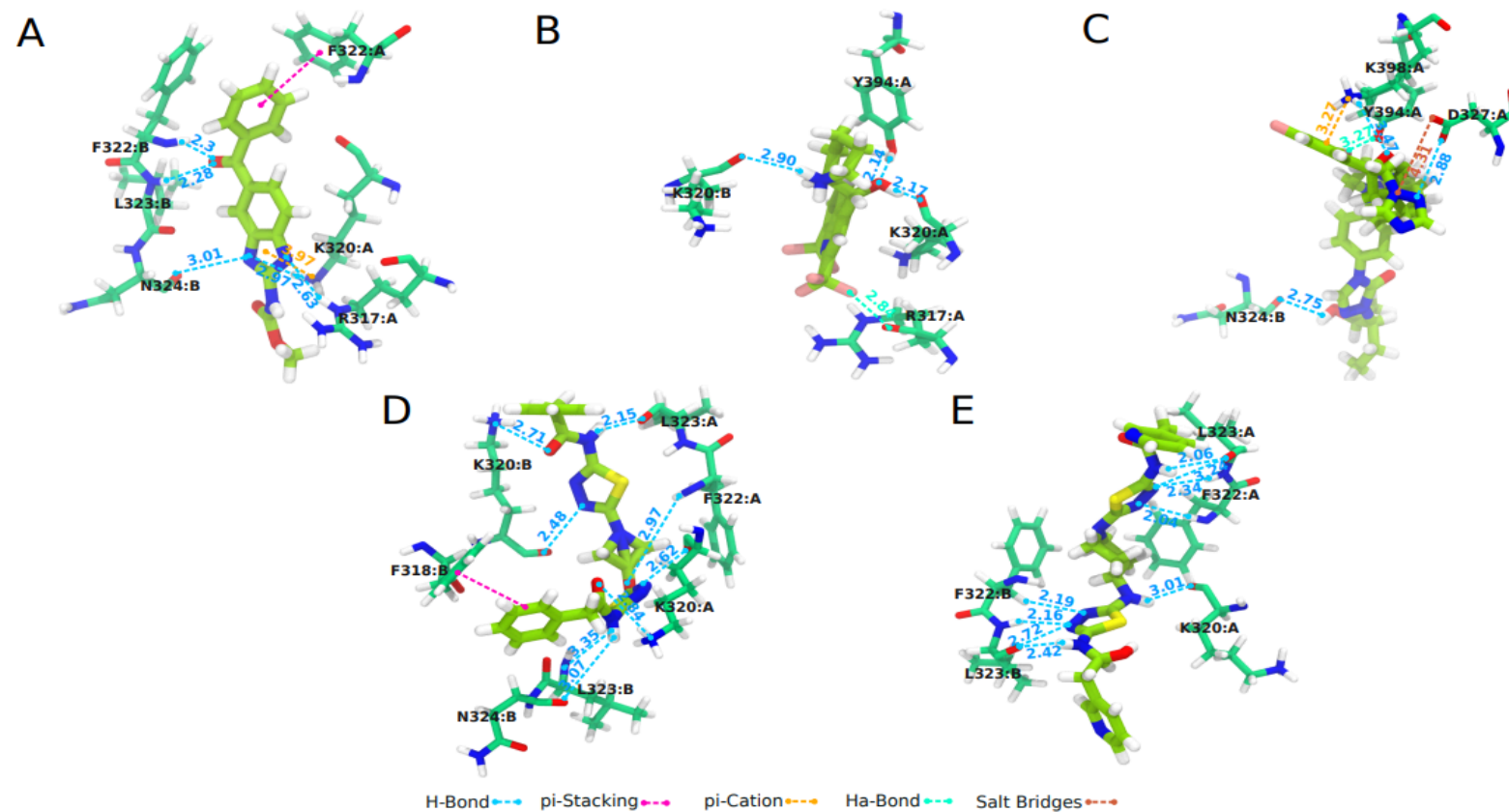
En los cuatro sistemas analizados (Posaconazolv4\_6UMD, Mefloquinav4\_6UL9, UPGL00012\_6UMD y UPGL00023\_6UL9) las gráficas de RMSF indican que las fluctuaciones de los residuos de las proteínas durante la simulación presentan patrones similares. El dominio glutaminasa de GAC (residuos 221–533) presenta menos fluctuaciones en presencia de ligando que los extremos N y C terminal **[Figura 9B]**. Además, el bucle de activación (residuos 316-332) y los aminoácidos Y394 y K398 de la hélice  $\alpha$  que forman parte del sitio de unión alostérico, presentan menor flexibilidad



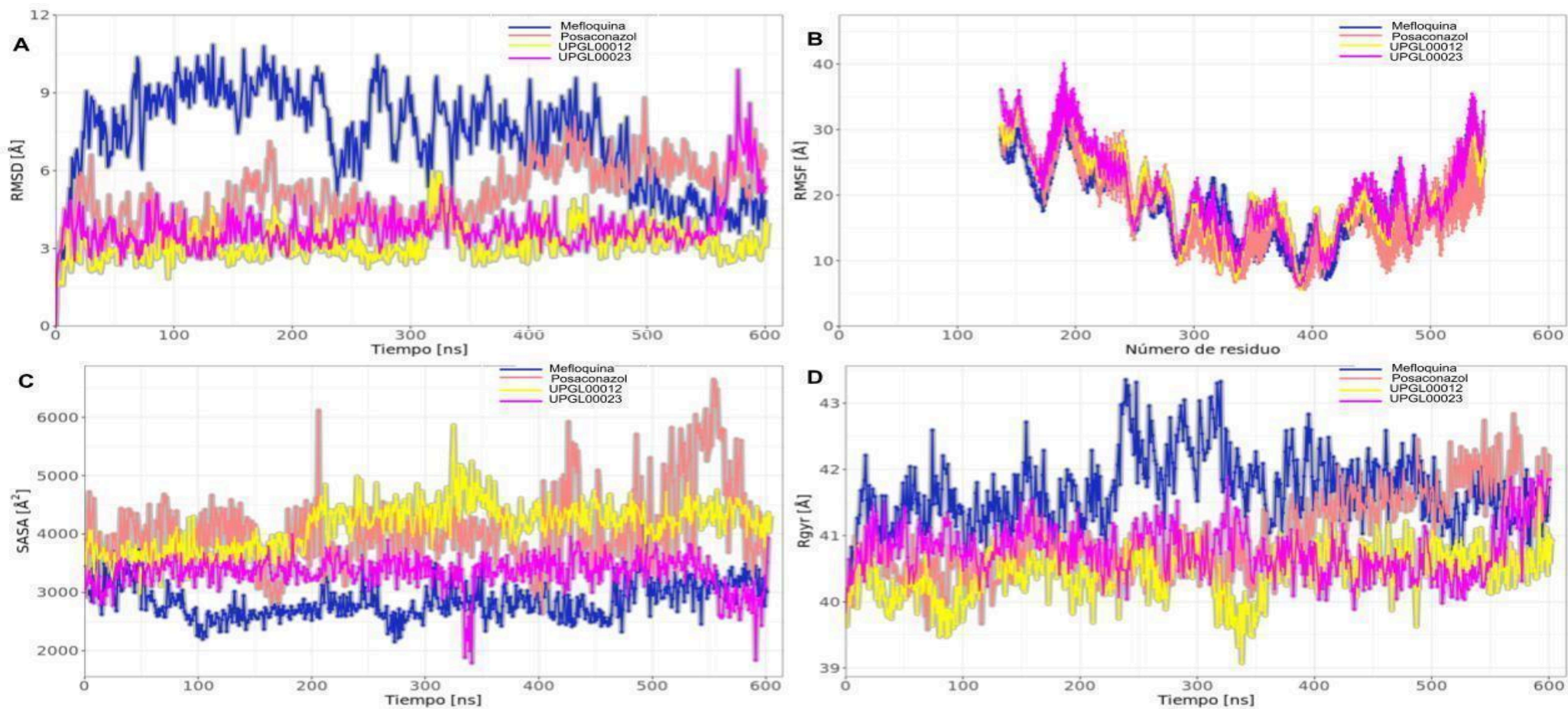
en comparación con los demás residuos de la proteína. Por lo tanto, durante todo el tiempo de simulación los ligandos permanecen unidos en el sitio de unión alostérico.

Los valores SASA de la proteína a 10 Å del sitio unión alostérico, para los sistemas analizados Posaconazolv4\_6UMD, UPGL00012\_6UMD y UPGL00023\_6UL9, presentan un patrón similar durante la simulación con valores superiores a 3000 Å<sup>2</sup>. En cambio, Mefloquinav4\_6UL9 registra valores inferiores a 3000 Å<sup>2</sup> [Figura 9C]. Esto podría indicar que la Mefloquina genera menor ampliación del sitio activo de la proteína a diferencia de Posaconazol y los controles.

Los valores de radio de giro (Rgyr) están relacionados con el empaquetamiento de los residuos de la proteína, a mayor valor de Rgyr menor será el empaquetamiento. Posaconazol mantiene el Rgyr de la proteína similar a los controles UPGL00012 y UPGL00023 (40.5 Å en promedio) durante aproximadamente 400 ns de simulación, disminuyendo el empaquetamiento al final de la simulación. Por otro lado, Mefloquina durante los 600 ns de simulación presenta altos valores de Rgyr (41.5 Å en promedio) [Figura 9D]. Por lo tanto, en base a los análisis realizados, el Posaconazol es el que genera cambios conformacionales en la proteína GAC similares a los controles, formando un complejo estable e inactivo. En cambio, Mefloquina genera cambios conformacionales distintos que pueden incluir desde modificaciones del sitio activo a una mayor flexibilidad en otras regiones de la proteína.

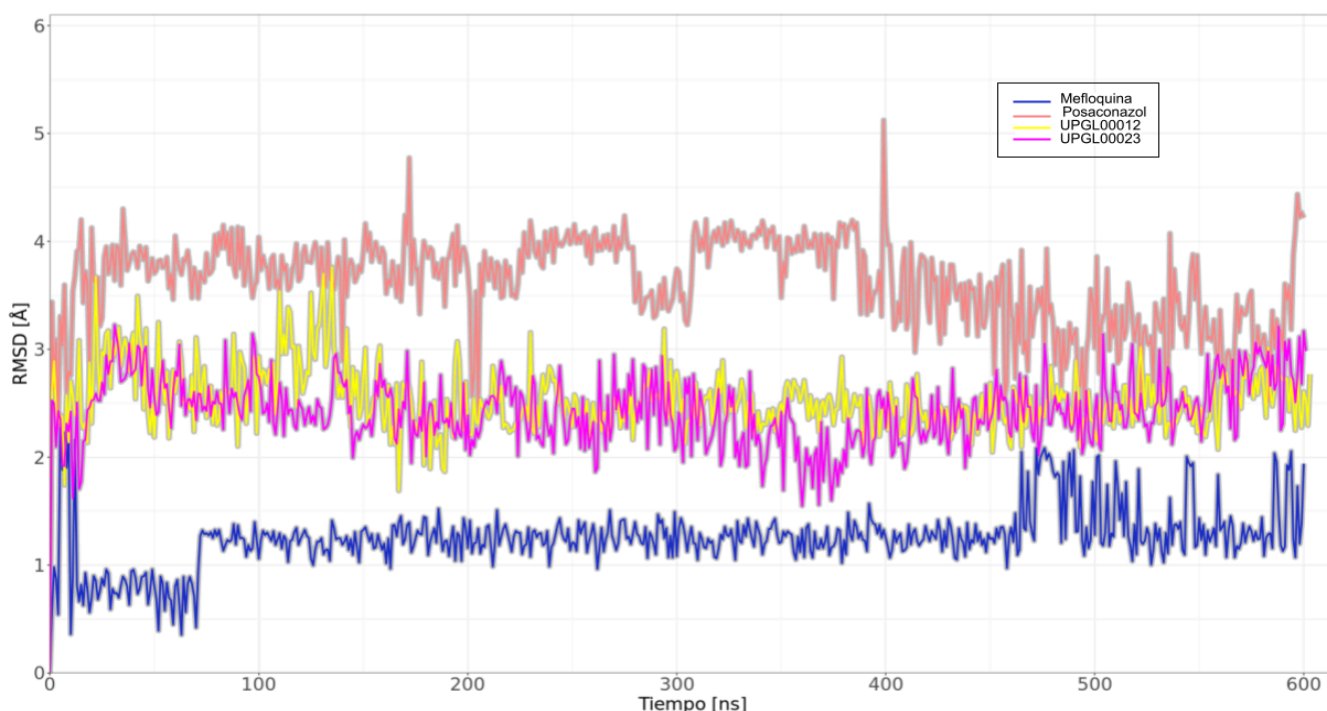


**Figura 8.** Interacciones proteína-ligando computadas por PLIP. Representación de las interacciones de los ligandos (A: Mebendazol, B: Mefloquina, C: Posaconazol) y controles (D: UPGL00023, E: UPGL00012) con el sitio de unión alostérico de GAC. Los residuos de la proteína se representan en verde oscuro y los átomos del ligando en verde claro. Los enlaces de hidrógeno (H-Bond) se representan con líneas punteadas de color azul claro, los puentes de halógeno (Ha-Bond) de verde claro y los puentes salinos de marrón.



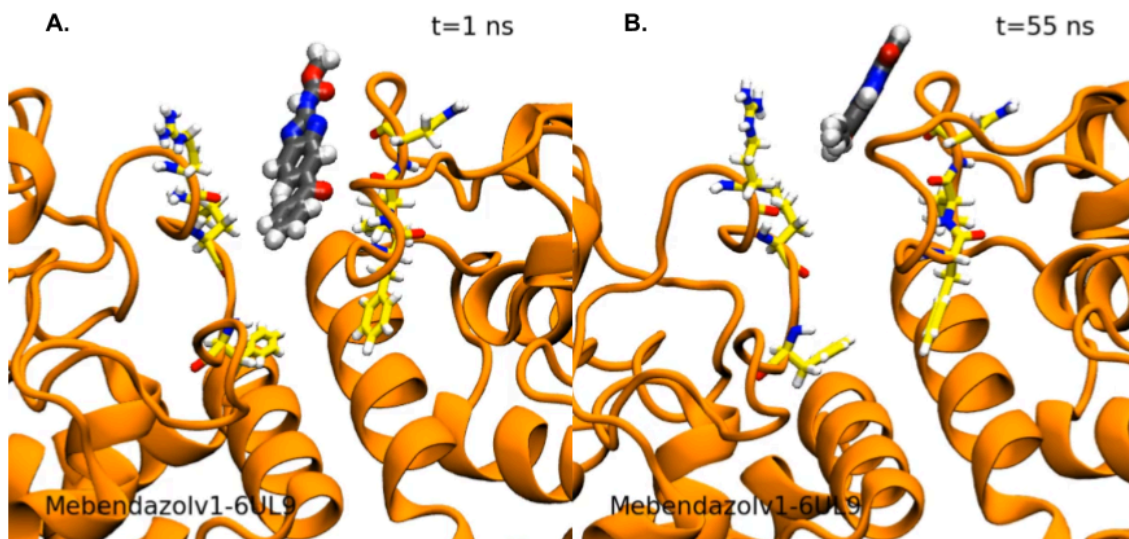
**Figura 9.** Análisis de la dinámica molecular (600 ns) de GAC con Mefloquina, Posaconazol, UPGL00023 y UPGL00012. Las trayectorias obtenidas de NAMD se analizaron mediante los scripts indicados en la sección 3.8.

También se calculó el RMSD de los ligandos para evaluar su estabilidad en el sitio de unión alostérico. Los controles UPGL00012 y UPGL00023 presentan RMSD similares (un valor promedio de 2.5 Å), mientras que el compuesto Posaconazol presenta valores ligeramente superiores, pero menores de 4 Å. Por el contrario, Mefloquina presenta el RMSD más bajo con valores cercanos a 1.5 Å [Figura 10]. Durante los 600 ns de la dinámica molecular los ligandos permanecen estables en el sitio de unión alostérico con pequeñas fluctuaciones en el RMSD.

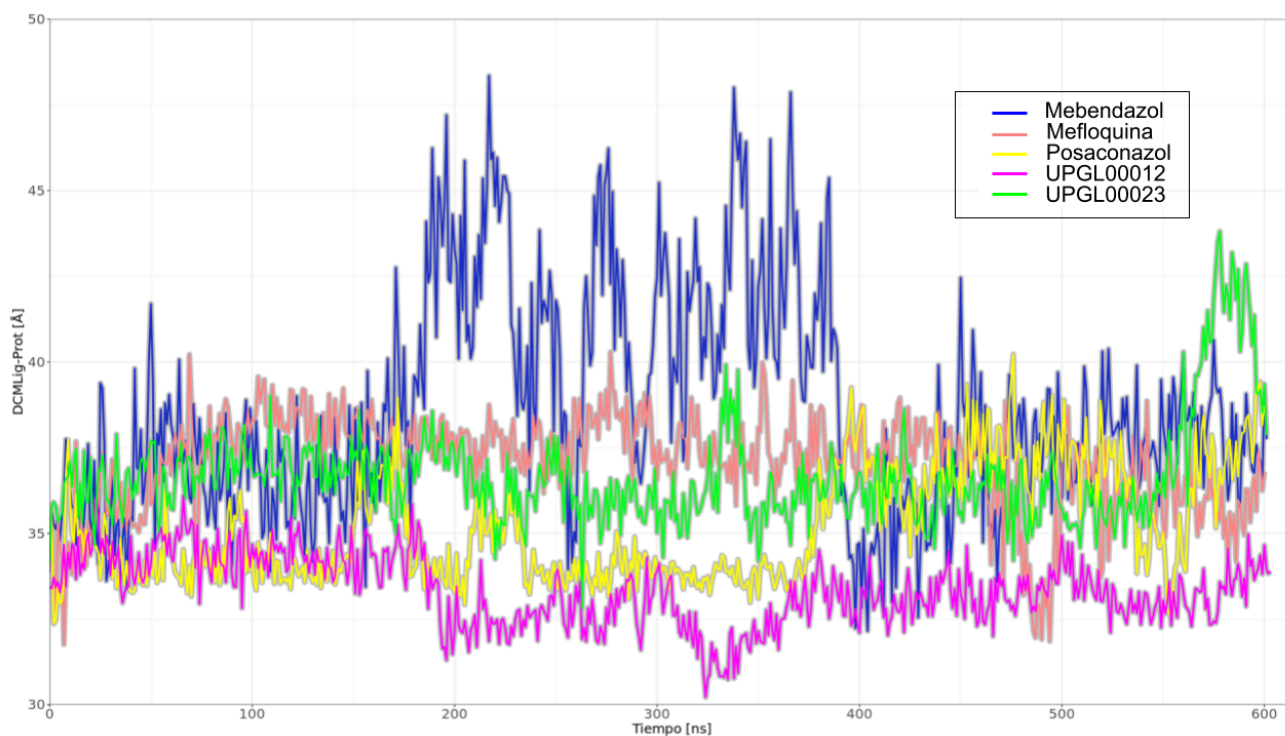


**Figura 10.** Análisis RMSD de ligandos unidos a GAC

Los resultados de la simulación de dinámica molecular (DM) con Mebendazolv1\_6UL9 mostraron que aproximadamente a los 50 ns el fármaco se aleja del sitio de unión alostérico, por lo tanto la formación de este complejo no es estable en el tiempo [Figura 11]. Adicionalmente, para describir con mayor detalle la inestabilidad del ligando en el sitio de unión, se midió la distancia del centro de masa del ligando con respecto a una subunidad de GAC a lo largo de la simulación [Figura 12]



**Figura 11. Simulación de Mebendazol con GAC (6UL9).** El Mebendazol se mantuvo unido al sitio de unión alostérico hasta por menos de 50 ns. La proteína se muestra de color naranja, los residuos con los que interactúa de color amarillo y gris el ligando.



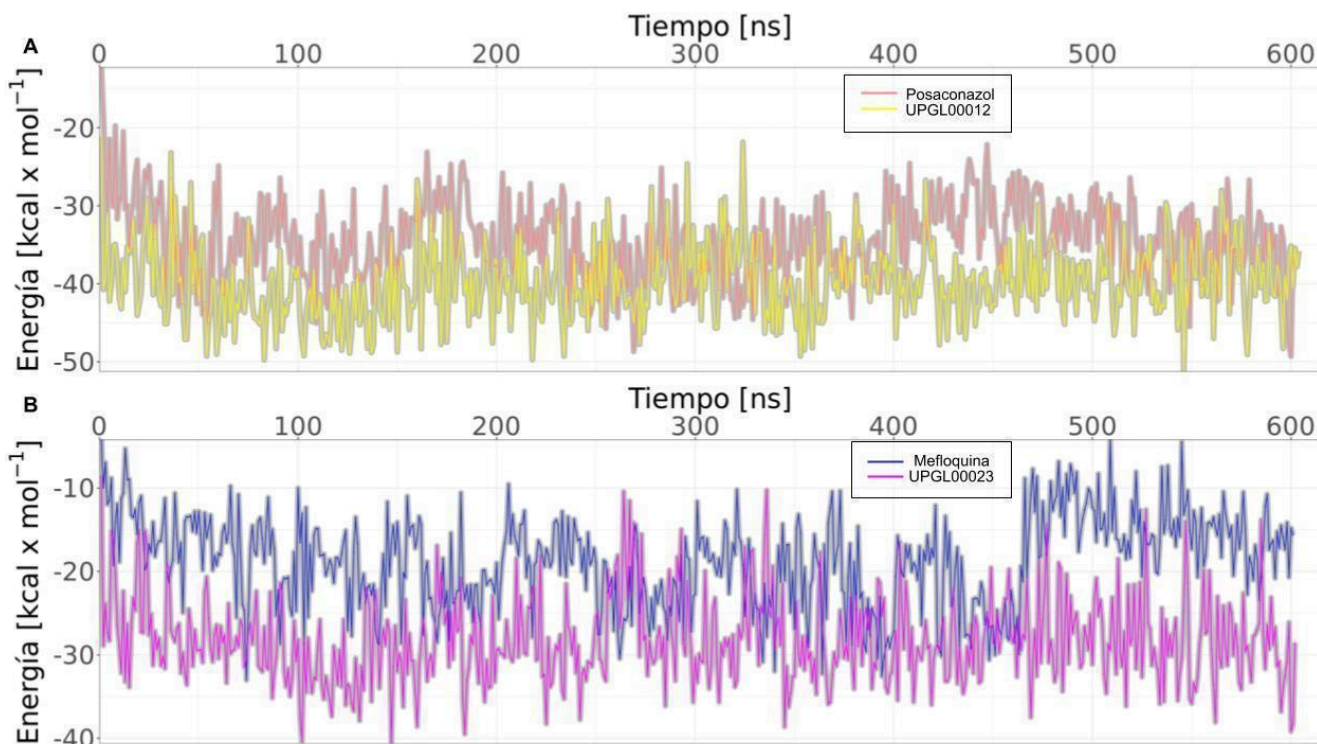
**Figura 12. Distancia del centro de masa del ligando con respecto a una subunidad de GAC a lo largo de la simulación (DCMLig-Prot).** Aproximadamente, a los 50 ns de simulación el centro de masa del Mebendazol supera los 40 Å y a lo largo de la



simulación mantienen similares fluctuaciones. En el resto de ligandos, sus respectivos centros de masa se mantienen con valores menores a 40 Å.

### 4.3 MMPBSA

Para estimar con mayor precisión las energías libres de unión ( $\Delta G$ ) de los sistemas seleccionados, se empleó la herramienta gmx\_MMPBSA. El posaconazol unido a GAC (6UMD) tuvo una energía de unión promedio de  $-34.32 \pm 4.83 \text{ kcal x mol}^{-1}$ , ligeramente más positiva que su control UPGL00012 unido a GAC (6UMD), que presentó  $-39.74 \pm 4.66 \text{ kcal x mol}^{-1}$ . Para ambos ligandos, las fluctuaciones de energía permanecieron constantes durante la simulación [Figura 13]. En tanto, la Mefloquina unida a GAC (6UL9) presenta la energía de interacción promedio mucho menos favorable ( $-18,76 \pm 2.09 \text{ kcal x mol}^{-1}$ ) comparando con su control UPGL00023 unido a GAC (6UL9) ( $-28.21 \pm 2.93 \text{ kcal x mol}^{-1}$ ). A diferencia de los otros 3 ligandos, en la Mefloquina, durante los primeros 460 ns, la fluctuación de energía se mantiene constante, pero en los últimos 140 ns, aumenta la energía libre de unión [Figura 13B].



**Figura 13.** Cálculo de la energía libre de unión por el método MMPBSA en los complejos Posaconazolv4\_6UMD, UPGL00012\_6UMD, Mefloquinav4\_6UL9 y UPGL00023\_6UL9

Al evaluar los términos energéticos resultantes de la DM, observamos que la formación de los complejos Posaconazolv4\_6UMD, UPGL00012\_6UMD, Mefloquinav4\_6UL9 y UPGL00023\_6UL9 es termodinámicamente favorable ya que la suma de sus componentes energéticos que están relacionados a las interacciones intermoleculares no covalentes ( $\Delta E_{ele} + \Delta E_{vdW}$ ) superan la energía de solvatación ( $\Delta G_{sol}$  positiva). Al contrario, la formación del complejo Mebendazol-GAC no es un proceso espontáneo, por lo tanto, se requiere de aporte de energía para que ocurra [Tabla 5].

**Tabla 5.** Valores de energía para todos los complejos GAC-ligando simulados por DM.

Componente energético	Valor de energía (kcal/mol) por ligando				
	UPGL00023	Mefloquina	Mebendazol	UPGL00012	Posaconazol
$\Delta E_{vdW}$	-47.68	-30.73	-0.60	-57.16	-57.20
$\Delta E_{ele}$	-42.43	-44.50	-279.88	-41.23	-9.67
$\Delta E_{MM}$	-90.11	-75.23	-280.48	-98.40	-66.87
$\Delta G_{sol}$	61.89	56.48	291.05	58.65	32.55
$\Delta G_{bind}$	-28.21	-18.76	10.58	-39.74	-34.32

**Nota:**  $\Delta E_{vdW}$  energía de van der Waals,  $\Delta E_{ele}$  energía electrostática,  $\Delta E_{MM}$  energía de la mecánica molecular en la fase gaseosa,  $\Delta G_{sol}$  energía de solvatación y  $\Delta G_{bind}$  energía libre de unión.

## V. DISCUSIÓN

En el presente estudio, buscamos identificar medicamentos antiparasitarios que mostraran afinidad por la glutaminasa GAC, mediante un cribado *in silico* de una biblioteca de antiparasitarios y simulaciones de dinámica molecular. Para ello, se realizó el acoplamiento molecular de una librería de 57 fármacos antiparasitarios en el sitio de unión alostérico de 4 estructuras cristalográficas de la glutaminasa GAC. Además, se simuló la dinámica de unión de los 3 mejores complejos GAC-ligando, con sus respectivos controles, para determinar sus estabilidades e interacciones intermoleculares.

Mediante un protocolo de cribado virtual con Autodock Vina, obtuvimos que el Posaconazol, Mebendazol y Mefloquina se acoplaron con una energía de afinidad más negativa que el sistema control 3UO9-BPTES. Ese resultado indica que, teóricamente,

los tres compuestos son potenciales inhibidores del sitio alostérico de la GAC. Posaconazol se une con una mayor energía libre de unión a GAC que el inhibidor UPGL00012. Esto ocurre por la formación de interacciones de alta energía (puente de halógeno y puente salino) entre el Posaconazol y dos residuos clave del sitio de unión, Y394 y K398. Por su parte, UPGL00012 forma más puentes de hidrógeno con GAC, por la presencia de anillos heteroatómicos cercanos a su centro de masa que forman interacciones con los residuos clave del bucle de activación K320, F322 y L323. Por otro lado, los anillos heteroaromáticos de Posaconazol son más distales a su centro de masa y forman interacciones con los residuos más externos del sitio de unión alostérico.

A diferencia de Posaconazol, Mebendazol y Mefloquina presentan un menor tamaño molecular y sus anillos heteroaromáticos forman interacciones principalmente con los residuos centrales del sitio de unión de la GAC. Sin embargo, sus energías libres de unión son más bajas en comparación con Posaconazol y los controles (UPGL00012 y UPGL00023), ya que no presentan gran número de puentes de hidrógeno o interacciones moleculares que aportan alta energía. Cabe señalar que Mebendazol y Mefloquina forman interacciones con R317 (interacción no reportada por los inhibidores conocidos de GAC), el cual es un residuo clave en la catálisis ya que una mutación en el mismo genera la pérdida total en la actividad enzimática de la GAC (10).



Al formar interacciones con residuos clave del sitio de unión, ambos fármacos pueden ser considerados en posteriores estudios que demuestren su actividad inhibitoria.

Los resultados de las simulaciones de dinámica molecular indican que el Posaconazol se mantiene estable en el sitio de unión alostérico ya que los valores de RMSD y Rgyr de la proteína son similares a los controles. Además, que sus valores de SASA sean semejantes a los controles sugieren que este fármaco al unirse al sitio alostérico incrementa el tamaño del sitio activo de la enzima. Sobre esto, se sabe que ambos sitios de unión (alostérico y activo) se encuentran separados aproximadamente a 8 Å de distancia, y que los inhibidores ya reportados de GAC, incrementan el tamaño del sitio activo (11). Es decir, el Posaconazol provocaría el mismo efecto sobre las dimensiones del sitio activo que los inhibidores validados de GAC.

Por otro lado, la Mefloquina genera diferentes cambios conformacionales en la GAC, demostrado por sus valores de RMSD y Rgyr, que superan el umbral de los controles. Al ser un fármaco de menor tamaño molecular que los controles UPGL00012 y UPGL00023, forma principalmente interacciones con los residuos centrales del sitio alostérico y los residuos más externos mantienen mayores fluctuaciones que afectan a toda la proteína. Los valores de SASA no son similares a los generados por el Posaconazol y los controles, aunque sugieren una ampliación del sitio activo más ligera comparada con la del Posaconazol.

Las variaciones en los valores de RMSD de los ligandos durante la simulación están relacionados con su estructura molecular y las interacciones que presentan con el sitio alostérico. La Mefloquina presenta el RMSD más bajo, posiblemente por las interacciones que forma con los residuos centrales del sitio de unión, las cuales restringen su movimiento. En cambio, el Posaconazol presenta el valor más alto de RMSD, lo cual se debería a que los núcleos heterocíclicos al ser menos rígidos aumentan la flexibilidad de ligando durante la simulación. El RMSD de los controles presenta un valor intermedio, sus anillos heterocíclicos centrales son rígidos y restringen su movimiento, sin embargo, los anillos aromáticos externos son más flexibles al formar menos interacciones con los residuos externos del sitio activo.

Los valores de energía libre de unión obtenidos mediante MMPBSA indican que la formación de los complejos GAC-inhibidor evaluados en la presente investigación son termodinámicamente favorables durante el tiempo de simulación, excepto el Mebendazol. Así, el Posaconazol mantiene valores de energía similares a su control (UPGL00012) mientras que la Mefloquina presenta menor energía libre de unión que UPGL00023. Por lo tanto, posteriores estudios *in vitro* deben demostrar esta actividad inhibitoria.

Estudios han sugerido una actividad anticancerígena de los tres fármacos testados en la presente investigación. Así, se ha reportado que el Posaconazol inhibe la proliferación celular del glioblastoma (tumor intracraneal maligno primario más común y letal en adultos). Actualmente se está desarrollando un ensayo de fase I que investiga la eficacia terapéutica del posaconazol y ketoconazol en pacientes con gliomas de alto grado recurrentes (56). Así mismo, un estudio sugiere que el Posaconazol inhibe la funcionalidad de las células madres cancerosas del glioblastoma, mediante la inducción de autofagia, pero no se sabe el mecanismo molecular de ello (57). Nuevos estudios experimentales podrían considerar la inhibición de las glutaminasas y la inducción de autofagia en estas células cancerosas. Por su parte, el fármaco antipalúdico Mefloquina se ha reportado como agente eficaz para diferentes tipos de cáncer (gástrico, colón, próstata y mama) pero se desconoce su mecanismo de acción (58). Según nuestros resultados, bien podría actuar a nivel de las glutaminasas GAC dada su afinidad incluso comparable con la del inhibidor UPGL00023. En tanto, la actividad anticancerígena del Mebendazol se ha demostrado en diferentes tipos de cáncer mediante estudios *in vitro* e *in vivo* y actualmente se vienen desarrollando 5 ensayos clínicos a la espera de resultados satisfactorios que permitan su utilidad como fármaco anticancerígeno. Su mecanismo de acción parece estar relacionado con la inhibición de la formación de microtúbulos (59). Por lo tanto, es menos probable que esté relacionada con la inhibición de la glutaminasa GAC, como lo indican los resultados de la dinámica molecular obtenidos en esta tesis. En resumen, los antiparasitarios testados han sido reposicionados en el ámbito terapéutico del cáncer, aunque su mecanismo de acción aún no es claro. En futuros estudios, mediante métodos *in silico*, se podría predecir la afinidad de estos ligandos por otras enzimas.

Con los hallazgos del presente trabajo, se podrán realizar estudios para demostrar *in vitro* la afinidad de Posaconazol y Mefloquina por GAC y si ello resulta positivo, validar el mecanismo de acción Posaconazol y Mefloquina sobre las células cancerosas a través de la inhibición de las glutaminasas.

## VI. CONCLUSIONES

- Los ensayos de acoplamiento molecular predijeron a Posaconazol, Mebendazol y Mefloquina como potenciales inhibidores de GAC.
- Posaconazol presenta similar estabilidad y energía de afinidad que los controles UPGL00012 y UPGL00023 en su unión al sitio alostérico de la glutaminasa GAC.
- Mefloquina se mantiene estable en el sitio alostérico pero genera diferentes cambios conformacionales sobre la GAC, distintos a los que ocasionan los inhibidores ya conocidos.
- El Mebendazol no se mantiene estable en el sitio de unión alostérico y su unión por GAC no sería viable.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sung H, Ferlay J, Siegel R, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021; 71(3): 209-249. Available from: <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
2. MINSA. Cáncer en el Perú según resultados de la vigilancia epidemiológica, año 2021. [Internet] 2022 [citado 24 julio 2023]; Disponible en: [https://www.dge.gob.pe/epipublic/uploads/boletin/boletin\\_20225\\_24\\_202501\\_4.pdf](https://www.dge.gob.pe/epipublic/uploads/boletin/boletin_20225_24_202501_4.pdf).
3. Mayo Clinic. Cáncer. [Internet] 2019 [citado 06 abril 2021]; Disponible en: <https://www.mayoclinic.org/es-es/diseases-conditions/cancer/symptoms-causes/syc-20370588>
4. Instituto Nacional del Cáncer. ¿Qué es el cáncer?. [Internet] 2021 [citado 27 septiembre 2021]; Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es>
5. Hillmann P, Schmitz D, Mestan J, D'Alonzo S, Fabbro D. *Comprehensive Medicinal Chemistry III*. 3rd ed. Elsevier Ltd; 2017. Chapter 5.01, Cancer Biology and the Principles of Targeted Cancer Drug Discovery; p. 1-38. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.12390-X>
6. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* 2022; 12(1):31-46.
7. Pavlova NN, Thompson CB. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metab.* 2016; 23(1):27–47. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2015.12.006>
8. Yang L, Venneti S, Nagrath D. Glutaminolysis: A Hallmark of Cancer Metabolism. *Annu Rev Biomed Eng.* 2017;19:163–94. Available from: 10.1146/annurev-bioeng-071516-044546
9. Katt WP, Lukey MJ, Cerione RA. A tale of two glutaminases: homologous enzymes with distinct roles in tumorigenesis. *Future Med Chem.* 2017;9(2):223-243. Available from: doi:10.4155/fmc-2016-0190
10. Huang Q, Stalneck C, Zhang C, McDermott LA, Iyer P, O'Neill J, et al. Characterization of the interactions of potent allosteric inhibitors with

- glutaminase C, a key enzyme in cancer cell glutamine metabolism. *J Biol Chem.* 2018; 293(10):3535–45. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M117.810101>
11. Thangavelu K, Pan CQ, Karlberg T, Balaji G, Uttamchandani M, Suresh V, et al. Structural basis for the allosteric inhibitory mechanism of human kidney-type glutaminase (KGA) and its regulation by Raf-Mek-Erk signaling in cancer cell metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(20):7705-7710. Available from: [10.1073/pnas.1116573109](https://doi.org/10.1073/pnas.1116573109)
  12. Shen YA, Chen CL, Huang YH, Evans EE, Cheng CC, Chuang YJ, et al. Inhibition of glutaminolysis in combination with other therapies to improve cancer treatment. *Curr Opin Chem Biol.* 2021; 62:64–81. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2021.01.006>
  13. Li T, Le A. Glutamine metabolism in cancer. *Adv Exp Med Biol.* 2018;1063:13–32. Available from: [10.1007/978-3-319-77736-8\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-77736-8_2)
  14. Katt WP, Ramachandran S, Erickson JW, Cerione RA. Dibenzophenanthridines as inhibitors of glutaminase C and cancer cell proliferation. *Mol Cancer Ther.* 2012;11(6):1269–78. Available from: [10.1158/1535-7163.MCT-11-0942](https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-11-0942)
  15. Stalneck CA, Ulrich SM, Li Y, Ramachandran S, McBrayer MK, De Berardinis RJ, et al. Mechanism by which a recently discovered allosteric inhibitor blocks glutamine metabolism in transformed cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(2):394–9. Available from: [10.1073/pnas.1414056112](https://doi.org/10.1073/pnas.1414056112)
  16. DeLabarre B, Gross S, Fang C, Gao Y, Jha A, Jiang F, et al. Full-length human glutaminase in complex with an allosteric inhibitor. *Biochemistry.* 2011;50(50):10764–70. Available from: [10.1021/bi201613d](https://doi.org/10.1021/bi201613d)
  17. Shukla K, Ferraris DV, Thomas AG, Stathis M, Duvall B, Delahanty G, et al. Design, synthesis, and pharmacological evaluation of bis-2-(5-phenylacetamido-1,2,4-thiadiazol-2-yl)ethyl sulfide 3 (BPTES) analogs as glutaminase inhibitors. *J Med Chem.* 2012;55(23):10551–63. Available from: [10.1021/jm301191p](https://doi.org/10.1021/jm301191p)
  18. Gross MI, Demo SD, Dennison JB, Chen L, Chernov-Rogan T, Goyal B, et al. Antitumor activity of the glutaminase inhibitor CB-839 in triple-negative breast cancer. *Mol Cancer Ther.* 2014;13(4):890–901. Available from: [10.1158/1535-7163.MCT-13-0870](https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-13-0870)

19. Xu X, Meng Y, Li L, Xu P, Wang J, Li Z, et al. Overview of the Development of Glutaminase Inhibitors: Achievements and Future Directions. *J Med Chem.* 2019;62(3):1096–115. Available from: [10.1021/acs.jmedchem.8b00961](https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00961)
20. Li R, Wei P, Wang Y, Liu Y, Liu X, Meng D. Brachyantheraoside A8, a new natural nor-oleanane triterpenoid as a kidney-type glutaminase inhibitor from: *Stauntonia brachyanthera*. *RSC Adv.* 2017;7(83):52533–42. Available from: <https://doi.org/10.1039/C7RA11270J>
21. Cheng L, Wu CR, Zhu LH, Li H, Chen LX. Physapubescin, a natural withanolide as a kidney-type glutaminase (KGA) inhibitor. *Bioorganic Med Chem Lett.* 2017;27(5):1243–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.01.057>
22. Zhang Z, Zhou L, Xie N, Nice EC, Zhang T, Cui Y, et al. Overcoming cancer therapeutic bottleneck by drug repurposing. *Signal Transduct Target Ther.* 2020;5(1):113. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41392-020-00213-8>
23. Li W, Zheng M, Wu S, Gao S, Yang M, Li Z, et al. Benserazide, a dopadecarboxylase inhibitor, suppresses tumor growth by targeting hexokinase 2. *J Exp Clin Cancer Res.* 2017;36(1):58. Available from: [10.1186/s13046-017-0530-4](https://doi.org/10.1186/s13046-017-0530-4)
24. Jiang W, Li X, Li T, Wang H, Shi W, Qi P, et al. Repositioning of amprenavir as a novel extracellular signal-regulated kinase-2 inhibitor and apoptosis inducer in MCF-7 human breast cancer. *Int J Oncol.* 2017;50(3):823–34. Available from: [10.3892/ijo.2017.3860](https://doi.org/10.3892/ijo.2017.3860)
25. Zheng M, Chen L, Hua L. In Silico Drug Design Repurposing Techniques and Methodologies. 1st ed. Elsevier Inc.; 2019. Chapter 17, In *Silico Modeling of FDA-Approved Drugs for Discovery of Anticancer Agents: A Drug-Repurposing Approach*; p. 527–548. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-816125-8.00017-1>
26. Alavi SE, Ebrahimi Shahmabadi H. Anthelmintics for drug repurposing: opportunities and challenges. *Saudi Pharm J.* 2021;29(5):434-445. Available from: [10.1016/j.jsps.2021.04.004](https://doi.org/10.1016/j.jsps.2021.04.004)
27. Wishart DS, Feunang YD, Guo AC, Lo EJ, Marcu A, Grant JR, et al. DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(D1):D1074-D1082. Available from: [10.1093/nar/gkx1037](https://doi.org/10.1093/nar/gkx1037)

28. Mendez D, Gaulton A, Bento AP, Chambers J, De Veij M, Félix E, et al. ChEMBL: towards direct deposition of bioassay data. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(D1):D930-D940. Available from: [10.1093/nar/gky1075](https://doi.org/10.1093/nar/gky1075)
29. Ropp PJ, Spiegel JO, Walker JL, Green H, Morales GA, Milliken KA, et al. Gypsum-DL: An open-source program for preparing small-molecule libraries for structure-based virtual screening. *J Cheminform. J Cheminform.* 2019;11(1):34. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13321-019-0358-3>
30. Morris GM, Goodsell DS, Halliday RS, Huey R, Hart WE, Belew RK, et al. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J Comput Chem.* 1998;19(14):1639 - 1662.
31. Burley SK, Bhikadiya C, Bi C, Bittrich S, Chao H, Chen L, et al. RCSB Protein Data Bank (RCSB.org): delivery of experimentally-determined PDB structures alongside one million computed structure models of proteins from artificial intelligence/machine learning. *Nucleic Acids Res.* 2023;51(D1):D488-D508. Available from: [doi:10.1093/nar/gkac1077](https://doi.org/10.1093/nar/gkac1077)
32. Eastman P, Swails J, Chodera JD, McGibbon RT, Zhao Y, Beauchamp KA, et al. OpenMM 7: Rapid development of high performance algorithms for molecular dynamics. *PLoS Comput Biol.* 2017;13(7):e1005659. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pcbi.1005659>
33. Weizmann Institute of Science. Resolution. [Internet] 2019 [cited 2021 Jul 3]; Available from: [https://proteopedia.org/wiki/index.php/Resolution#Resolution\\_and\\_structure\\_quality](https://proteopedia.org/wiki/index.php/Resolution#Resolution_and_structure_quality)
34. RCSB PDB. Resolution. [Internet] [cited 2021 Jul 3]; Available from: <https://pdb101.rcsb.org/learn/guide-to-understanding-pdb-data/resolution>
35. Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, et al. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov.* 2012;2(5):401-404. Available from: [10.1158/2159-8290.CD-12-0095](https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0095)
36. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC
37. Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem.* 2010 Jan 30;31(2):455-61. Available from: [10.1002/jcc.21334](https://doi.org/10.1002/jcc.21334)



38. Forli S, Huey R, Pique ME, Sanner MF, Goodsell DS, Olson AJ. Computational protein–ligand docking and virtual drug screening with the AutoDock suite. *Nat Protoc.* 2016; 11(5):905–919. Available from: <http://www.nature.com/articles/nprot.2016.051>
39. Hevener KE, Zhao W, Ball DM, Babaoglu K, Qi J, White SW, et al. Validation of molecular docking programs for virtual screening against dihydropteroate synthase. *J Chem Inf Model.* 2009;49(2):444-460 Available from: 10.1021/ci800293n
40. Salentin S, Schreiber S, Haupt VJ, Adasme MF, Schroeder M. PLIP: fully automated protein-ligand interaction profiler. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(W1):W443-W447. Available from: 10.1093/nar/gkv315
41. Phillips JC, Hardy DJ, Maia JDC, Stone JE, Ribeiro JV, Bernardi RC, et al. Scalable molecular dynamics on CPU and GPU architectures with NAMD. *J Chem Phys.* 2020;153(4):044130. Available from: <https://doi.org/10.1063/5.0014475>
42. Hadden JA, Perilla JR. Molecular Dynamics Simulations of Protein-Drug Complexes: A Computational Protocol for Investigating the Interactions of Small-Molecule Therapeutics with Biological Targets and Biosensors. *Methods Mol Biol.* 2018;1762:245-270. Available from: 10.1007/978-1-4939-7756-7\_13
43. Jo S, Kim T, Iyer VG, Im W. CHARMM-GUI: a web-based graphical user interface for CHARMM. *J Comput Chem.* 2008;29(11):1859-1865. Available from: 10.1002/jcc.20945
44. Dolinsky TJ, Czodrowski P, Li H, Nielsen JE, Jensen JH, Klebe G, et al. PDB2PQR: expanding and upgrading automated preparation of biomolecular structures for molecular simulations. *Nucleic Acids Res.* 2007; 35(Web Server issue):W522-5. Available from: 10.1093/nar/gkm276
45. University of Illinois at Urbana-Champaign. NAMD TUTORIAL. [Internet] 2017 [cited 2021 Jul 3]; Available from: <https://www.ks.uiuc.edu/Training/Tutorials/namd/namd-tutorial-html/>.
46. Price DJ, Brooks CL. A modified TIP3P water potential for simulation with Ewald summation. *J Chem Phys.* 2004;121(20):10096–103. Available from: 10.1063/1.1808117

47. Hopkins DW, Le Grand S, Walker RC, E. Roitberg AE. Long-Time-Step Molecular Dynamics through Hydrogen Mass Repartitioning. *J. Chem. Theory Comput.* 2015; 11(4):1864-74. Available from: 10.1021/ct5010406
48. Vanommeslaeghe K, Hatcher E, Acharya C, Kundu S, Zhong S, Shim J, et al. CHARMM general force field: A force field for drug-like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force fields. *J. Comput. Chem.* 2010;31(4):671-690. Available from: 10.1002/jcc.21367
49. Miyamoto S, Kollman PA. Settle: An analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithm for rigid water models. *J. Comput. Chem.* 1992;13(8):952-962.
50. Andersen HC. Rattle: A “velocity” version of the shake algorithm for molecular dynamics calculations. *J. Comput. Phys.* 1983;52(1):24-34.
51. Petersen HG. Accuracy and efficiency of the particle mesh Ewald method. *J. Chem. Phys.* 1995;103(9):3668-3679. Available from: <https://doi.org/10.1063/1.470043>
52. Tuckerman M, Berne BJ, Martyna GJ. Reversible multiple time scale molecular dynamics. *J. Chem. Phys.* 1992; 97(3):1990-2001. Available from: 10.1063/1.463137
53. Genheden S, Ryde U. The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities. *Expert Opin Drug Discov.* 2015;10(5):449-61. Available from: 10.1517/17460441.2015.1032936
54. Valdés-Tresanco MS, Valdés-Tresanco ME, Valiente PA, Moreno E. gmx\_MMPBSA: A New Tool to Perform End-State Free Energy Calculations with GROMACS. *J Chem Theory Comput.* 2021;17(10):6281-6291. Available from: 10.1021/acs.jctc.1c00645
55. O'Boyle NM, Banck M, James CA, Morley C, Vandermeersch T, Hutchison GR. Open Babel: An open chemical toolbox. *J Cheminform.* 2011;3:33. doi:10.1186/1758-2946-3-33
56. University Health Network. Azoles Targeting Recurrent High Grade Gliomas. [Internet] 2018 [cited 2023 Jul 3]; Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03763396>.
57. Wang H, Tan Y, Jia H, Liu D, Liu R. Posaconazole inhibits the stemness of cancer stem-like cells by inducing autophagy and suppressing the

Wnt/ $\beta$ -catenin/survivin signaling pathway in glioblastoma. *Front Pharmacol.* 2022;13:905082. Available from: 10.3389/fphar.2022.905082

58. Xu X, Wang J, Han K, Li S, Xu F, Yang Y. Antimalarial drug mefloquine inhibits nuclear factor kappa B signaling and induces apoptosis in colorectal cancer cells. *Cancer Sci.* 2018;109(4):1220-1229. Available from: 10.1111/cas.13540
59. Chai JY, Jung BK, Hong SJ. Albendazole and Mebendazole as Anti-Parasitic and Anti-Cancer Agents: an Update. *Korean J Parasitol.* 2021;59(3):189-225. Available from: 10.3347/kjp.2021.59.3.189

## VIII. ANEXOS

### Anexo 1. Herramientas bioinformáticas y bases de datos empleadas en el estudio

Nombre	Descripción	URL	Referencia
DrugBank	Base de datos que contiene información de medicamentos y objetivos farmacológicos	<a href="https://go.drugbank.com/">https://go.drugbank.com/</a>	26
ChEMBL	Base de datos de moléculas bioactivas con propiedades similares a fármacos	<a href="https://www.ebi.ac.uk/chembl/">https://www.ebi.ac.uk/chembl/</a>	27
Gypsum-DL 1.2.0	Programa gratuito de código abierto que convierte representaciones de moléculas pequeñas 1D y 2D en modelos 3D	<a href="https://durrantlab.pitt.edu/gypsum-dl/">https://durrantlab.pitt.edu/gypsum-dl/</a>	28
AutoDockTools v.1.5.6	Programa que permite visualizar y analizar estructuras moleculares	<a href="https://ccsb.scripps.edu/mgltools/">https://ccsb.scripps.edu/mgltools/</a>	29
Protein Data Bank	Base de datos que contiene información de las estructuras tridimensionales de macromoléculas biológicas	<a href="https://www.rcsb.org/">https://www.rcsb.org/</a>	30
PDBFixer	Programa que soluciona problemas de los archivos del Protein Data Bank (.pdb) antes de la simulación	<a href="https://github.com/openmm/pdbfixer">https://github.com/openmm/pdbfixer</a>	31
cBioPortal	Base de datos relacionados a la genómica del cáncer.	<a href="https://www.cbioportal.org/">https://www.cbioportal.org/</a>	34
Pymol 2.4.0	Visualizador molecular	<a href="https://pymol.org/2/">https://pymol.org/2/</a>	35
Autodock Vina v.1.1.2	Programa de código abierto para realizar acoplamiento molecular	<a href="https://vina.scripps.edu/">https://vina.scripps.edu/</a>	36
NAMD v. 2.14	Programa diseñado para la simulación de grandes sistemas biomoleculares.	<a href="https://www.ks.uiuc.edu/Research/namd/">https://www.ks.uiuc.edu/Research/namd/</a>	38
CHARMM-GUI	Plataforma web utilizada para la construcción de sistemas complejos para simulaciones moleculares	<a href="https://www.charmm-gui.org/">https://www.charmm-gui.org/</a>	40
gmx-MMPBSA v1.5.7	Programa basado en MMPBSA.py de AMBER que tiene como objetivo realizar cálculos de energía libre con archivos GROMACS.	<a href="https://valdes-tresanco-ms.github.io/gmx_MMPBSA/dev/">https://valdes-tresanco-ms.github.io/gmx_MMPBSA/dev/</a>	51
PLIP v. 2.2.2	Herramienta basada en línea de comandos que analiza las interacciones de complejos proteína-ligando	<a href="https://github.com/pharmai/plip">https://github.com/pharmai/plip</a>	53

**Anexo 2.** Script de Python que utiliza el programa Vina para acoplar cada antiparasitario de la base de datos con la proteína respectiva

```
import glob
import os
import subprocess

subprocess.call('mkdir results_5FI6_antiparasitic', shell = True)
subprocess.call('mkdir logs_5FI6_antiparasitic', shell = True)

ligands = glob.glob('pdbqts_antiparasitic/*.pdbqt')
ligands_filenames = [os.path.basename(x) for x in ligands]
ligands_basenames = []

for ligand_filename in ligands_filenames:
    ligand_basename = ligand_filename.replace('.pdbqt','')
    ligands_basenames.append(ligand_basename)

for ligand in ligands_basenames:
    subprocess.call ('vina --config config_5FI6.dat --ligand pdbqts_antiparasitic/' + ligand
+'.pdbqt --out results_5FI6_antiparasitic/' + ligand + '.r.pdbqt --log logs_5FI6_antiparasitic/' +
ligand + '.r.log --exhaustiveness 24', shell = True)
```