

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Análisis del impacto de las diferencias estructurales entre la forma nativa del receptor de membrana Janus Quinasa 2 (JAK2) y la forma mutada predominante V617F en la interacción con el fármaco Ruxolitinib® dirigido a neoplasias mieloproliferativas

Trabajo de graduación presentado por

Andrea Licette Yat Cahueque

para optar al grado académico de Licenciada en Bioquímica y Microbiología

Guatemala

2014



Análisis del impacto de las diferencias estructurales entre la forma nativa del receptor de membrana Janus Quinasa 2 (JAK2) y la forma mutada predominante V617F en la interacción con el fármaco Ruxolitinib® dirigido a neoplasias mieloproliferativas

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Análisis del impacto de las diferencias estructurales entre la forma nativa del receptor de membrana Janus Quinasa 2 (JAK2) y la forma mutada predominante V617F en la interacción con el fármaco Ruxolitinib® dirigido a neoplasias mieloproliferativas

Trabajo de graduación presentado por

Andrea Licette Yat Cahueque

para optar al grado académico de Licenciada en Bioquímica y Microbiología

Guatemala

2014

Vo. Bo. :

(f)

Lic. Rodrigo José Vargas

Tribunal Examinador:

(f)

Lic. Rodrigo José Vargas

(f)

*Ríos-González Kristina*

PhD. Kristina Ríos

(f)

*Lucía Nitsch*

Msc. Lucía Nitsch

Fecha de aprobación: Guatemala, 15 de julio de 2014

## PREFACIO

Este proyecto fue elaborado en colaboración con el Licenciado Rodrigo Vargas de la unidad de Química Computacional de la Universidad de San Carlos de Guatemala, quien proporcionó la licencia para la utilización del programa SYBYL de Tripos y me brindó su orientación a lo largo del proyecto, muchas gracias.

Mi sincero agradecimiento a las personas que en diferente forma colaboraron a lo largo de la realización de éste proyecto. A mis amigos por su amistad, apoyo y ánimos incondicionales. Especialmente al Lic. Andrés Ávalos, mentor y amigo, quien me brindó su orientación durante la realización del proyecto y me ayudó a no desfallecer ante los obstáculos del mismo.

Agradezco de todo corazón a mi familia quienes siempre me han apoyado, desde el inicio de la carrera hasta el final de este trabajo de investigación. Especialmente a mi madre quien me dio la oportunidad de optar a un grado de licenciatura en esta casa de estudios, su guía y apoyo incondicional, y todo su amor.

Por último, agradezco a la terna examinadora que fueron el Lic. Rodrigo Vargas, PhD. Kristina Ríos y Msc. Lucía Nitsch.

# ÍNDICE

PREFACIO .....	v
LISTA DE CUADROS .....	vii
LISTA DE FIGURAS .....	viii
LISTA DE GRÁFICAS.....	ix
ABREVIATURAS .....	x
RESUMEN.....	xi
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. OBJETIVOS.....	3
A.OBJETIVO GENERAL .....	3
B.OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	3
III. JUSTIFICACIÓN.....	4
IV. MARCO TEÓRICO .....	5
A.NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS .....	5
B.PROTEÍNA JAK2 .....	10
C.MUTACIONES EN JAK2 .....	15
D.FÁRMACOS .....	18
E.MÉTODOS COMPUTACIONALES.....	23
V. ANTECEDENTES .....	29
VI. METODOLOGÍA.....	32
A.MATERIALES .....	32
B.MÉTODOS.....	32
VII. RESULTADOS .....	35
VIII. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	48
IX. CONCLUSIONES.....	54
X. RECOMENDACIONES .....	55
XI. REFERENCIAS .....	56
XII. ANEXOS .....	63
XIII. GLOSARIO .....	76

## LISTA DE CUADROS

1. Resultados del alineamiento de JAK2 nativa y JAK2 V617F. ....	36
2. Valores de Lipinski del fármaco Ruxolitinib®. ....	37
3. Evaluación del <i>docking</i> Ruxolitinib® – JH2 de JAK2. ....	39
4. Aspectos evaluados en el <i>docking</i> ligando-receptor. ....	39
5. Evaluación química del <i>docking</i> Ruxolitinib® – JH2 de JAK2.....	39
6. Aspectos químicos evaluados en el <i>docking</i> ligando-receptor.....	39
7. Evaluación del <i>docking</i> de confórmers de Ruxolitinib® – JH2 de JAK2.....	41
8. Evaluación química del <i>docking</i> Ruxolitinib® – JH2 de JAK2. ....	41
9. Evaluación del <i>docking</i> Ruxolitinib® – JH2 de JAK2 V617F. ....	43
10. Evaluación química del <i>docking</i> Ruxolitinib® – JH2 de JAK2 V617F. ....	43
11. Evaluación del <i>docking</i> de confórmers de Ruxolitinib® – JH2 de JAK2 V617F.....	45
12. Evaluación química del <i>docking</i> Ruxolitinib® – JH2 de JAK2 V617F. ....	45
13. Comparación de la evaluación de <i>docking</i> y las estructuras químicas de los confórmers de Ruxolitinib® – JH2 seleccionados de JAK2 nativa y JAK2 V617F.....	47



## LISTA DE FIGURAS

1. Diferenciación de los linajes celulares.....	5
2. Clasificación operacional de las neoplasias mieloproliferativas.....	6
3. Algoritmo para el diagnóstico de trombocitemia esencial.....	8
4. Localización genética del gen JAK2.....	10
5. Representación esquemática de la estructura primaria de las proteínas JAK. ....	11
6. Receptores de citosinas .....	12
7. Vía de Señalización JAK/STAT .....	13
8. Dominios homólogos de la familia de proteínas JAK y los sitios de mutación.....	14
9. Diagrama de cintas de la estructura del dominio JH2 de JAK2.....	15
10. Estructuras cristalográficas del dominio JH2 pseudoquinasa de JAK 2 nativa (izquierda) y la forma mutada V617F (derecha). ....	16
11. Secuencia cromatográfica fluorescente de pacientes con JAK2 V617F.....	17
12. Mutaciones hiperactivas en el dominio JH2 de JAK2. ....	18
13. Estructura química de ruxolitinib fosfato.....	19
14. Descripción general del proceso de la búsqueda y elucidación de un farmacóforo.....	22
15. Ejemplo de la evaluación de un fármaco con la regla de Lipinski.....	23
16. Diagrama de Flujo del Procedimiento .....	33
17. Alineamiento de secuencias de los dominios pseudoquinasa JH2 de JAK2 nativa y JAK2 V617F. ....	36

## LISTA DE GRÁFICAS

1. Alineamiento en 3D de los dominios pseudoquinasa JH2 de JAK2 nativa y JAK2 V617F.....	35
2. Generación del protomol en dominio JH2 de JAK2.....	37
3. Comparación de modelos de ATP –sustrato natural– y del fármaco Ruxolitinib®.....	38
4. <i>Docking</i> del dominio JH2 de JAK2.....	38
5. Evaluación del sitio activo – docking del dominio JH2 de JAK2.....	40
6. Evaluación del sitio activo del <i>docking</i> del dominio JH2 de JAK2.....	40
7. Comparación del sitio activo del <i>docking</i> del dominio JH2 de JAK2 con Ruxolitinib® y ATP.....	41
8. Estructuras químicas de los conformeros seleccionados.....	42
9. <i>Docking</i> del dominio JH2 de JAK2 V617F.....	42
10. Evaluación del sitio activo – <i>docking</i> del dominio JH2 de JAK2 V617F.....	43
11. Evaluación del sitio activo – <i>docking</i> del dominio JH2 de JAK2 V617F.....	43
12. Evaluación en 3D de las interacciones del sitio activo de docking del dominio JH2 de JAK2 V617F con el fármaco Ruxolitinib.....	44
13. Comparación del sitio activo del <i>docking</i> del dominio JH2 de JAK2 V617F con Ruxolitinib® y ATP.....	44
14. Estructuras químicas de los conformeros seleccionados.....	45
15. Comparación del <i>docking</i> del dominio JH2 de JAK2 nativa vs JAK2 V617F.....	46
16. Comparación del sitio activo del docking del dominio JH2 de JAK2 nativa vs JAK2 V617F.....	46

## ABREVIATURAS

JAK2 – <i>Janus Kinasa 2</i>	PRMT5 – <i>Protein Arginine Methyltransferase 5</i>
V617F – Mutación de cambio de valina por fenilalanina en posición 617	N542-E543del
FDA – <i>Food and Drug Administration</i>	F537-K539delinsL
NMP – Neoplasias Mieloproliferativas	H538Q-K539L
PV – Policitemia Vera	CYP3A4 - Citocromo P450 3A4
TE – Trombocitemia Esencial	IUPAC - <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
MF – Mielofibrosis idiopática	ADME – Absorción, distribución, metabolismo y excreción
JH – Dominio homólogo a JAK	WDI – <i>World Drug Index</i>
Src – Proto-oncogen de la proteína kinasa Src	Da – Dalton
FERM – Banda 4.1 de ezrina, radixina y moesina	DFT – <i>Density Functional Theory</i>
SH <sub>2</sub> – Homología de Src 2	GTO – Gaussian tipo orbitales
JAK – <i>Janus Kinasa</i>	QSAR – <i>Quantitative Structure-Activity Relation</i>
STAT - <i>Signal Transducers and Activators of Transcription protein</i>	DIGI – Dirección General de Investigación
Ser523 – Serina en posición 523	PDB – <i>Protein DataBank</i>
Tyr570 – Tirosina en posición 570	RMSD – Desviación Media Cuadrática (por sus siglas en inglés)
K539L – Cambio de lisina por leucina en la posición 539	4FVQ – Secuencia de la proteína en forma nativa
BCR-ABL – Fusión de los genes bcr - abl	4FVR – Secuencia de la proteína en forma mutada
MAPK – <i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>	TYK2 – Tirosina kinasa 2
PI3K/Akt – Ruta de señalización <i>phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B</i>	

## RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue analizar el impacto de las diferencias estructurales entre la forma nativa del receptor de membrana JAK2 y la forma mutada predominante V617F en la interacción con el fármaco Ruxolitinib® dirigido a neoplasias mieloproliferativas. Para cumplirlo se emplearon métodos de química computacional, mediante los programas Sybyl y UCSF Chimera, con los cuales se elucidaron y analizaron los sitios activos de las formas nativa y mutada del dominio JH2 de la proteína Janus Quinasa 2 (JAK2), en el cual se encuentra la mutación de interés V617F. En base a este análisis se llevó a cabo la señalización molecular (*docking*). Entre los residuos que alteran la conformación del sitio activo, se encontraron dos glicinas, dos asparaginas, una arginina y una glutamina, siendo los residuos adyacentes al fármaco; asimismo, se elucidó que los ciclos aromáticos contenidos en el fármaco le confieren la capacidad de estabilizar los hidrógenos de dichos residuos, logrando que la proteína adquiriera una conformación radicalmente distinta a la forma nativa. El papel que juegan las diferencias estructurales entre la forma nativa y la forma mutante V617F en la interacción con Ruxolitinib®, es determinante para conferirle selectividad al inhibir de manera irreversible la proteína mutada. Es necesario realizar estudios con estructuras similares, para definir si alguno es candidato para dar origen a nuevos derivados que sean farmacológicamente activos y estén dirigidos a la actividad inhibitoria de esta u otras mutaciones en la misma enzima.

# I. INTRODUCCIÓN

En 2005 se descubrió que las patologías designadas como “Neoplasias Mieloproliferativas” se correlacionan con mutaciones en la proteína Janus Quinasa 2 (JAK2), la más conocida y estudiada hasta el momento es la mutación JAK2V617 (Gallardo, 2012). Pero no es hasta 2011 que se aprueba por la FDA y en 2012 por la comisión Europea, el primer fármaco dirigido especialmente al receptor de membrana JAK2, bajo el nombre comercial de Jakavi® (Harrison & Vannuchi, 2012). El fármaco Ruxolitinib® de Novartis ofrece una alternativa para un tratamiento dirigido particularmente a los receptores de membrana JAK1 y JAK2 involucrados en estas neoplasias, al ser sus blancos terapéuticos (Harrison & Vannuchi, 2012). Sin embargo, existen pocos estudios acerca de la interacción del fármaco con la proteína en sus distintas formas estructurales, como la mutación antes mencionada; las cuales pueden dar resultados diversos con respecto a la eficacia y eficiencia de unión al sitio activo, que también pueden variar de acuerdo a la forma rotacional del fármaco que posea una mejor unión al sitio activo de la enzima.

Por lo tanto este estudio pretende ser pionero en la investigación y análisis de las interacciones intermoleculares del sitio de enlace ligando-receptor del fármaco Ruxolitinib® con el dominio JH2 de la enzima JAK2, tanto nativa como su forma mutada predominante V617F, para elucidar el mecanismo selectivo de inhibición del fármaco sobre la forma mutada. Asimismo se evaluarán los 110 conformeros del fármaco Ruxolitinib®, para determinar si existe un conformero más afín a la forma nativa y mutada de la enzima, con el fin de dar una pauta sobre la posible optimización del fármaco evaluado o establecer las líneas de diseño que se han de seguir para generar nuevos fármacos dirigidos a esta u otras mutaciones de la misma enzima.

Para llevar a cabo el estudio se emplearán métodos computacionales, ejecutados por los programas SYBYL de tripos versión 10.10.0 utilizando el algoritmo Protomol y UCSF Chimera versión 1.9. A través de estos programas se ejecutará el alineamiento de secuencias del dominio de interés en ambas formas de la proteína y posteriormente se realizará la señalización molecular (*docking*) con el fármaco y sus conformeros. Del total de conformeros analizados se seleccionarán los cuatro con mejores valores para los aspectos fisicoquímicos evaluados y se compararon con el enantiómero R, el cual representa la forma en que se encuentra el compuesto en el medicamento.

Muchas investigaciones se han centrado en estudiar los efectos o la respuesta de los pacientes al fármaco, pero no en estudiar de qué manera las distintas conformaciones estructurales de las formas mutadas de JAK2, con respecto a la forma nativa, interfieren en las interacciones de Ruxolitinib® con el sitio activo de la enzima. Por lo tanto, el alcance que este trabajo tendrá será la elucidación de dicho impacto conformacional en las interacciones fármaco-receptor, que podrá sentar un precedente para el diseño de nuevos fármacos dirigidos a la misma enzima y optimización de los mismos. Así como planteará

la incursión de Guatemala en el área de química computacional para seguir desarrollando este campo en el país.

Los resultados del *docking* molecular apuntan a que la actividad inhibitoria de Ruxolitinib® se propicia debido a la explotación de las diferencias estructurales de la forma mutada V617F, que condicionan la manera en que la proteína adaptará su conformación al unirse al fármaco, esto se debe a los impedimentos estéricos y a la estabilización de puentes de hidrógeno de los residuos adyacentes al sitio de unión que el fármaco propicia, mediante los tres heterociclos resonantes que posee su estructura.

De los 110 conformeros de Ruxolitinib® evaluados para ambas formas, se determinó que los conformeros más afines son 34 y 38, para la forma nativa y mutada del dominio JH2, respectivamente. No obstante, es importante analizar si el conformero 38 que muestra mejor acoplamiento a la estructura proteica *in silico* puede tener un efecto contraproducente para la actividad inhibitoria deseada, al poseer menos interacciones inapropiadas con la enzima y menor impedimento estérico, pudiendo actuar únicamente como inhibidor competitivo de la forma mutada V617F, constituyendo una de las líneas futuras de investigación en el ámbito.

## II. OBJETIVOS

### A. OBJETIVO GENERAL

Analizar el impacto de las diferencias estructurales entre la forma nativa del receptor de membrana JAK2 y la forma mutada predominante V617F en la interacción con el fármaco Ruxolitinib®.

### B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar las diferencias estructurales entre la forma nativa del receptor de membrana JAK2 y la forma mutada predominante V617F.
2. Evaluar la interacción del fármaco Ruxolitinib con el receptor de membrana JAK2 y con su forma mutada V617F.
3. Comparar la interacción del fármaco Ruxolitinib con la forma mutada del receptor de membrana JAK2 y su forma mutada V617F.
4. Correlacionar la divergencia de interacción del fármaco con las formas nativa y mutada del receptor de membrana JAK2 con sus diferencias estructurales.
5. Realizar un análisis de las implicaciones de las diferencias estructurales en las propiedades y funcionamiento del receptor de membrana JAK2 en su forma nativa y mutada.

### III. JUSTIFICACIÓN

El descubrimiento de la mutación en el gen JAK2 ha sido fundamental en la ampliación del conocimiento de una de las causas comunes de los síndromes mieloproliferativos crónicos; las enfermedades que estas mutaciones causan son policitemia vera, trombocitemia esencial y mielofibrosis idiopática. Mundialmente, estas mutaciones se encuentran en un 95% de los pacientes con policitemia vera, un alto número de casos, considerando que existen mutaciones en diferentes exones. Mientras que, en el caso de la mielofibrosis idiopática y trombocitemia esencial se detecta en un 60% de los casos aproximadamente. Guatemala ha mostrado una incidencia alta en cuanto a casos reportados de neoplasias mieloproliferativas, sobre todo en el caso de policitemia vera (estadísticas no disponibles).

Dichas mutaciones alteran la conformación tridimensional de la proteína Janus Quinasa 2 (JAK2) por lo que afecta directamente su funcionamiento. Las opciones de tratamiento para pacientes con mielofibrosis son limitadas, el trasplante de médula ósea es potencialmente beneficioso, pero somete a los pacientes a un alto riesgo durante el procedimiento, siendo a la vez inalcanzable para algunos. Por lo que la mayoría de pacientes solamente reciben tratamientos para los síntomas y no para la causa de la enfermedad en sí. Los tratamientos para dichas enfermedades actualmente consisten en medicamentos que reducen la tasa de producción o de plaquetas en la sangre, como interferón alfa recombinante, hidroxiurea, clorambucil, imatinib, entre otros. Desde 2011 se aprobó el primer fármaco que tiene como blanco terapéutico los receptores de membrana JAK1 y JAK2, con lo cual ofrece una nueva alternativa a los pacientes, que no sólo les puede mejorar la calidad de vida, sino también ofrecer un tratamiento más eficaz en la lucha con dichas patologías. Sin embargo, han sido pocos los estudios realizados en cuanto a la eficacia y eficiencia que presenta dicho fármaco en la unión con las formas mutadas de la proteína JAK2; lo que permitiría analizar el comportamiento del mismo y dar nuevas ideas tanto para la optimización de los fármacos ya existentes, como para el diseño de nuevos fármacos con el mismo blanco molecular.

En Guatemala, se empezaron a desarrollar nuevos fármacos mediante el empleo de técnicas bioinformáticas hasta 2009 (Carrascoza, 2009); ya que el diseño y estudio bioinformático de fármacos complejos se había mantenido al margen como consecuencia de la escasez y los altos costos de la tecnología adecuada para dichos procedimientos. El impacto que posee esta investigación en la rama de la salud es el aporte que representa a Guatemala el poder incursionar en campos novedosos de investigación a través de la química computacional, esperando así promover grandes avances tanto en el desarrollo como evolución de las investigaciones científicas del país. Asimismo, al comparar la forma tridimensional de la proteína, tanto en su forma mutada como la forma nativa predominante en pacientes que es la JAK2 V617F, con la interacción con el fármaco líder del mercado actual se puede analizar el comportamiento de ambas y de qué manera influye el cambio de conformación en dicha interacción, orientando a la vez a nuevas propuestas de investigación para el desarrollo de futuros medicamentos.

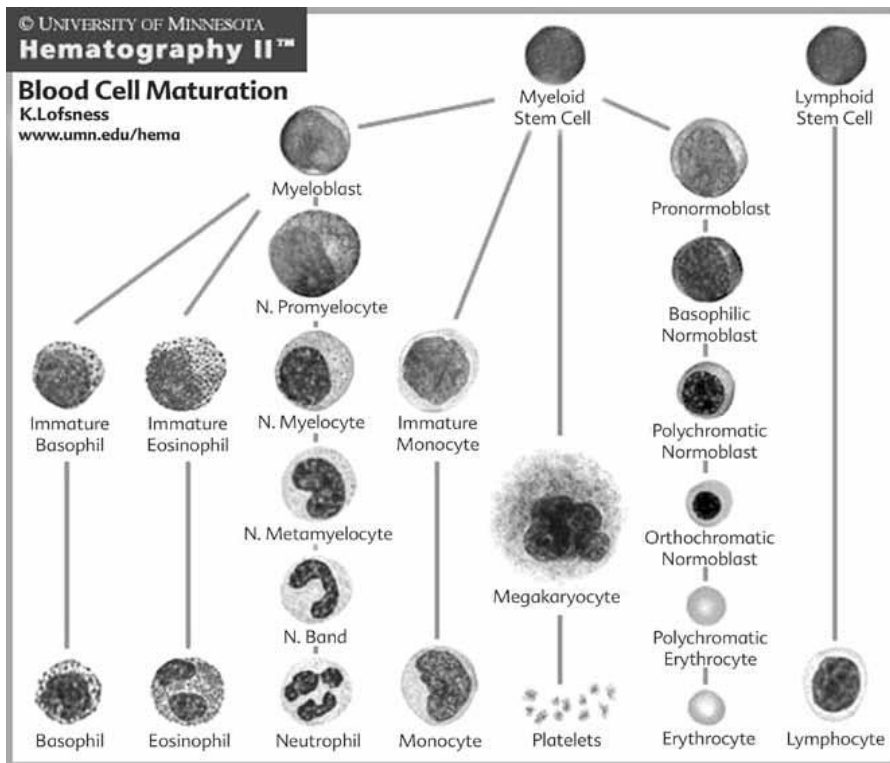


## IV. MARCO TEÓRICO

### A. NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS

El concepto de los desórdenes o neoplasias, como actualmente se les conoce, mieloproliferativas, fue propuesto por primera vez en 1951 por Dameshek, quien consideraba la leucemia mieloide crónica, policitemia vera, trombocitemia esencial y mielofibrosis primaria como enfermedades relacionadas por el agente causal (Dameshek, 1951). Las neoplasias mieloproliferativas (NMP) constituyen un grupo de enfermedades tumorales del sistema hematopoyético mieloide, estas se caracterizan por la proliferación excesiva de los linajes mieloides de células (líneas eritrocítica, granulocítica, trombocítica o fibroblástica), según se muestra en la Figura 1, ya sea de manera aislada o combinada. El proceso proliferativo no se encuentra limitado de modo estricto a una sola línea hematopoyética, sino que integra, en mayor o menor porcentaje, varios linajes celulares. Según la línea celular con mayor afección, las neoplasias se pueden clasificar en cuatro variedades principales: leucemia granulocítica crónica (LCG), policitemia vera (PV), trombocitemia esencial (TE) y mielofibrosis primaria (MF). Estas enfermedades o trastornos mieloides son de naturaleza clonal tumoral, causando expansión, producción y acumulación de eritrocitos, granulocitos y plaquetas en exceso, tanto en médula ósea, como en sangre periférica y otros tejidos corporales (Bernadette, 2005; Ruíz, 2009; Instituto Nacional de Cáncer).

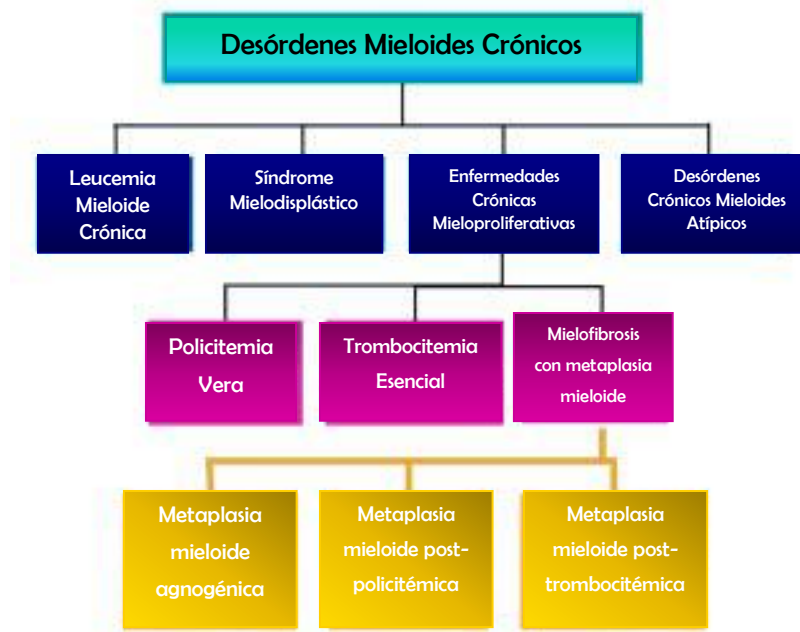
Figura 1. Diferenciación de los linajes celulares.



(Leukaemia & Lymphoma Research, 2012)

Entre los agentes causantes de las neoplasias mieloproliferativas se encuentran los factores de crecimiento (FCI-I y PDGF), los receptores de la célula para los factores de crecimiento (EPO, cMPL o TPO), los transductores que ramifican señales celulares y los efectos nucleares. No obstante, la principal causa puede ser la mutación adquirida en la célula madre, aunque no debe descartarse la posibilidad de una implicación de linaje celular, lo que le permite a la célula escapar del control que regula de su proliferación o diferenciación (Levine & Gilliland, 2008; Ruíz, 2009).

Figura 2. Clasificación operacional de las neoplasias mieloproliferativas.



(Tefferi, 2003)

## 1. Policitemia vera

a. **Epidemiología.** Policitemia vera (PV) o policitemia rubra vera (PRV), es un desorden clonal, caracterizado por la proliferación excesiva de eritrocitos. Como resultado del incremento de eritrocitos, la sangre se torna más espesa y los conteos de células rojas aumentan significativamente. En algunos casos también pueden verse incrementados los neutrófilos y las plaquetas. Los signos, síntomas y complicaciones de esta patología son resultado de ese mismo incremento de glóbulos rojos y, con frecuencia, también del alto número de plaquetas en la sangre (Leukaemia & Lymphoma Research, 2012; Landolfi, 2010).

La incidencia de la enfermedad aumenta según avanza la edad del individuo, el promedio de diagnóstico es a los 60 años de edad, incrementándose al llegar a los 80 años, siendo poco frecuente en personas menores a los 30 años; sin embargo, en algunos casos se ha visto en niños menores debido a una baja

probabilidad de herencia. Posee mayor predominancia en hombres que en mujeres (18.3 casos por cada 100,000 es en hombres, 1-2:1). La incidencia mundial de la enfermedad, según la sociedad de leucemia y linfoma, es de 2.8 por cada 100,000 hombres y 1.3 por cada 100,000 mujeres, aproximadamente, según datos recopilados del 2012 (Leukemia & Lymphoma Society, 2012).

La causa precisa de la trastorno sigue siendo desconocido. Las radiaciones ionizantes y la exposición a ciertas toxinas se sugieren como causa de la enfermedad, en ciertos casos. Casi todos los pacientes presentan una mutación somática del gen JAK2, constituyendo la principal causa de la misma hasta la fecha; sin embargo, se desconocen las causas de la mutación. En algunas familias se ha encontrado predisposición genética a una mutación en el gen JAK2, pero esta mutación no es hereditaria (Landolfi, 2010; Leukemia & Lymphoma Society, 2012; NIH, 2011).

b. Tratamiento. La policitemia vera es una enfermedad crónica que aún no tiene cura, pero responde positivamente a algunos tratamientos. El tratamiento recomendado varía de acuerdo a la duración y severidad de la condición, la edad del paciente y el tipo de célula que se encuentra más afectada. La forma más simple y rápida de reducir el número de eritrocitos es mediante flebotomía. Esta consiste en la extracción de sangre a través de una vena, se extrae alrededor de medio litro de sangre, con el objetivo de disminuir los conteos de glóbulos rojos y la concentración de hematocrito. No obstante, se debe tener cuidado con el uso crónico de flebotomía, ya que ésta se encuentra asociada a un incremento en el riesgo de padecer mielofibrosis (Leukemia & Lymphoma Research, 2012; NIH, 2011; Landolfi, 2010).

Otro tratamiento que ha sido utilizado es la farmacoterapia, esta incluye los métodos con aspirina, anagrelida conocida comercialmente como Agrylin®, medicamentos mielosupresores, estos fármacos con capacidad de reducir las concentraciones de glóbulos rojos o plaquetas; hidroxiurea con el nombre comercial de Hydrea® e interferón alfa para reducir el hematocrito (Leukemia & Lymphoma Research, 2012).

Otra opción es la radioterapia, con la cual se puede suprimir la producción excesiva al irradiar la médula ósea; sin embargo, este tratamiento no ayuda a disminuir la viscosidad o el recuento de plaquetas en sangre, e incluso puede aumentar el riesgo de transformarse en leucemia o desarrollar otra enfermedad hematológica más severa (NIH, 2011).

Entre los tratamientos que se están estudiando se encuentran los inhibidores selectivos de serotonina, como el Imatinib® mesilato, este medicamento se encuentra aprobado en el tratamiento contra la leucemia; no obstante en ensayos clínicos ha demostrado ayudar a reducir la necesidad de flebotomías en los pacientes al disminuir el recuento de plaquetas y hematocrito (Leukemia & Lymphoma Research, 2012). De igual manera, se encuentran estudiando y desarrollando pequeñas moléculas selectivas que tengan como

blanco la JAK2 quinasa, entre las que se encuentran los inhibidores Go6976, erlotinib, MK0457 y CEP-701; estas drogas son capaces de suprimir la proliferación celular e inducir la apoptosis en las células mieloides humanas que cargan con mutaciones en el gen JAK2, actualmente la mayoría de estas se encuentran en fase I/II del estudio clínico, esperando para avanzar a la fase de prueba en humanos (NIH, 2011; Landolfi, 2010).

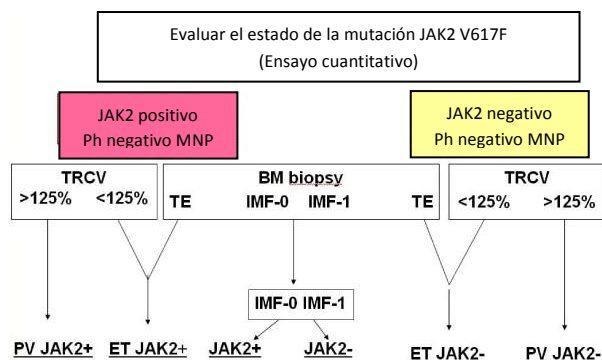
## 2. Trombocitemia esencial

a. **Epidemiología.** Trombocitemia o trombocitosis esencial (TE) se refiere a una enfermedad caracterizada por el aumento patológico del número de plaquetas, consecuencia de una proliferación clonal desmesurada de las células progenitoras de las plaquetas, los megacariocitos. Las plaquetas son células pequeñas, encargadas de la formación de coágulos al momento de producirse una lesión de un vaso sanguíneo. En el caso de una sobreproducción de éstas, pueden provocar bloqueos de los vasos, conocidos como “trombos” y, con menor frecuencia, otros problemas hemorrágicos. Por lo que de ahí se origina el nombre “trombocitemia”. El sufijo “esencial” se refiere a que esta condición de plaquetas elevadas en sangre, no es resultado de otra afección subyacente (Levine & Gilliland, 2008; Brière, 2007).

Sigue sin conocerse la causa de esta enfermedad todavía, aunque, aproximadamente, el 50% de los pacientes con TE presentan una mutación del gen JAK2 en las células sanguíneas. Lo más común es una mutación en el gen de la trombopoyetina, esta puede constituir un factor de herencia familiar, ya que es una mutación autosómica dominante (Brière, 2007; The Oncology Institute of Hope & Innovation, 2012).

Esta enfermedad es poco frecuente, se diagnostican aproximadamente 0.6 – 2.5 casos nuevos por cada 100,000 habitantes, al año. Es más frecuente en torno a los 60 años, aunque entre el 20% y 40% de los casos se presentan en individuos menores a los 40 años, siendo más frecuente en mujeres, 1.6 mujeres por cada hombre (Brière, 2007; Vida, 2003).

Figura 3. Algoritmo para el diagnóstico de trombocitemia esencial



\*TRCV = Total Red Cell Volume

Ph = Philadelphia

(Brière, 2007)

b. Tratamiento. Los objetivos del tratamiento son normalizar la cifra de plaquetas, consiguiendo reducir así la frecuencia de complicaciones trombóticas y hemorrágicas, disminuir el riesgo de transformación en leucemia mieloide aguda y de evolución mielofibrótica, mejorar la calidad de vida y lograr la máxima supervivencia. Sin embargo, todos los tratamientos utilizados en el tratamiento poseen efectos adversos, algunos potencialmente desfavorables. Por lo que, una vez iniciado el tratamiento debe mantenerse durante años hasta lograr alcanzar el objetivo de reducir la cifra de plaquetas dentro del rango de la normalidad ( $<400,000/\mu\text{L}$ ) y conservarlo así (NIH, 2011; The Oncology Institute of Hope & Innovation, 2012; Manascero, 2003).

Cuando los pacientes no presentan mayores signos o síntomas, puede que no necesiten un tratamiento, por lo que, en muchos casos, este trastorno puede llegar a considerarse relativamente benigno, al no interferir con la actividad del paciente. En muchos casos el tratamiento es una simple dosis baja de aspirina; no obstante, se debe usar este medicamento con suma precaución y bajo estricta supervisión médica. Un fármaco utilizado, análogo a la aspirina es el Paracetamol®. Otros tratamientos incluyen el uso de hidroxiurea, anagrelida, interferón- $\alpha$  (Brière, 2007; Campbell, *et al*, 2005; Levine & Gilliland, 2008).

En algunos casos de emergencia, cuando el conteo de plaquetas sobrepasa los dos millones, se utiliza la plaquetoféresis, proceso que consiste en obtener el contenido plaquetario del paciente y devolver el plasma, por vía de canalización. Esto ofrece solamente un alivio temporal. En otros casos, también se ha llegado a utilizar la quimioterapia. Hasta la fecha los investigadores continúan buscando tratamientos más efectivos contra esta enfermedad, mediante ensayos clínicos de nuevas terapias o terapias combinadas (NIH, 2011; Instituto Nacional de Cáncer).

### 3. Mielofibrosis idiopática

a. Epidemiología. La mielofibrosis idiopática (MI), también conocida como metaplasia mieloide agnógena es el tercer neoplasma mieloproliferativo, en el cual la médula ósea se vuelve superactiva y llega a desarrollar tejido fibroso (cicatricial) excesivo en la misma. El término idiopática se refiere a que no se cuenta con una causa conocida que provoque el padecimiento, esto la diferencia de otras mielofibrosis que son causadas por complicaciones de un padecimiento (Leukemia & Lymphoma Society, 2012; Instituto Nacional de Cáncer; Ruíz, 2009).

Una característica importante y constante de las mielofibrosis es la producción excesiva de megacariocitos, de los cuales se forman las plaquetas. En esta condición, se producen megacariocitos adicionales, lo cual provoca la liberación de plaquetas en la sangre en altas cantidades, así como de citosinas en la médula; estas estimulan la producción de tejido fibroso (Leukemia & Lymphoma Society, 2012; Reilly, 2006).

La mielofibrosis idiopática ocurre en 1.5 de cada 100,000 habitantes, aproximadamente, al año. Afecta tanto a hombres y mujeres, el rango de edad de mayor incidencia es entre los 50 y 70 años, aunque puede aparecer a cualquier edad. Aproximadamente, una 50% de las personas con esta condición poseen una mutación en el gen JAK2, “JAK2 V617F”. Mientras que, entre el 5-10% de los pacientes tienen una mutación de leucemia mieloproliferativa (MPL), entre otras mutaciones encontradas. Se desconoce el motivo por el que ocurren dichas mutaciones; sin embargo, se sabe que este padecimiento o es hereditario, pero tampoco existe un método para prevenirla (Reilly, 2006; Leukemia & Lymphoma Society, 2012; Levine & Gilliland, 2008).

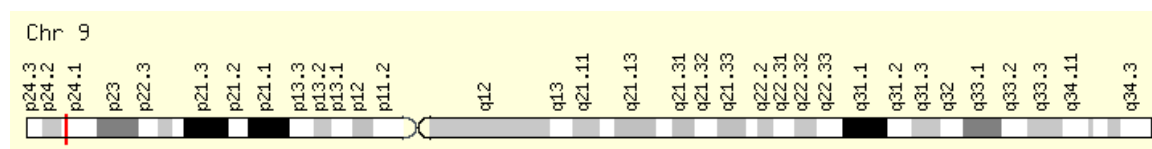
b. Tratamiento. No existe un tratamiento mediante farmacoterapia que pueda curar la mielofibrosis idiopática; sin embargo, un alotrasplante de células madre se ha convertido en una potencial cura. Sin embargo, este es un procedimiento con altos riesgos, sobre todo en pacientes de tercera edad, por lo que generalmente este procedimiento solo se aplica en un 15% de los casos en pacientes jóvenes. Los pacientes asintomáticos o que no presentan signos de complicaciones, no reciben tratamiento normalmente. Muchos pueden permanecer estables y asintomáticos por varios años, solamente con un control estricto y exámenes regulares (Reilly, 2006; Leukemia & Lymphoma Society, 2012).

Mientras que, los medicamentos empleados en farmacoterapias son inhibidores de la quinasa asociada con Janus, inhiben las enzimas tanto JAK1 como JAK2 que participan en la producción de células sanguíneas. Asimismo, existe el tratamiento mediante quimioterapias convencionales, entre ellas el uso de cladribina (Leustatin®) o hidroxiaurea (Hydrea®). Se han utilizado también fármacos inmunomoduladores (IMiDs) como la talidomida (Thalomid®), la lenalidomida (Revlimid®), interferón- $\alpha$  (Intron® A, Roferon-A®). Por otro lado está la terapia con andrógenos como la oximetolona, la cual es la versión sintética análoga a las hormonas masculinas que pueden promover la producción de glóbulos rojos (Leukemia & Lymphoma Society, 2012; Manascero, 2003; Reilly, 2006).

## B. PROTEÍNA JAK2

1. Características del Gen. Janus quinasa 2, conocida como JAK2 es una proteína tirosina quinasa, producto del gen JAK2, que se encuentra en el cromosoma 9 brazo corto p, banda 24, sub-banda 1; empezando en 4985245 y finaliza en 5128183bp, como se observa en la figura 4 (Strehl, 2005; GeneCards, 2013).

Figura 4. Localización genética del gen JAK2.



(GeneCards, 2013)

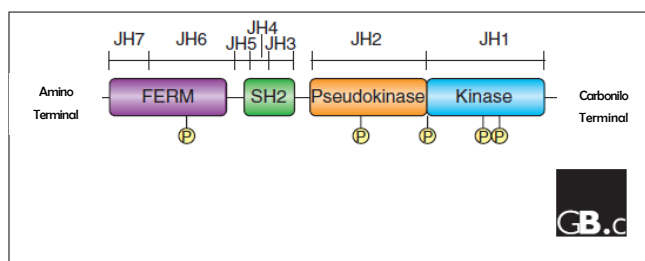
El gen posee 25 exones que abarcan alrededor de 140kb de ADN genómico, 5402pb de pre-ARNm, 6 diferentes transcritos y codifica cuatro isoformas de la proteína: JAK1, JAK2, JAK3 y TYK2. Esta proteína se localiza intracelularmente y probablemente asociada a la membrana. Estudios han demostrado que JAK2 es la enzima predominante involucrada en la proliferación y diferenciación celular (Levine & Gilliland, 2005 & 2008; Strehl, 2005).

2. **Función.** Este gen codifica para la proteína Janus quinasa 2, exclusivamente, la cual es una tirosina quinasa capaz de acoplarse con múltiples receptores de citosinas: receptores de granulocitos y factor estimulante de colonias, estimulante de colonias de receptor del factor de granulocitos y macrófagos y el receptor de interleucina-3, es una enzima no específica, clasificada bajo el número de EC.2.7.10.2 y se activa tras la unión del ligando (Yamaoka, *et al*, 2004; Quintás-Cardama, 2011; Yeh, *et al*, 1999).

La familia de proteínas JAK de receptores de citosinas, posee un único dominio transmembrana y motivos extracelulares estructurales comunes, los cuales son importantes para la unión al ligando. Esta proteína posee siete dominios de homología que han sido identificados, numerados del carboxilo al amino terminal. El primer dominio (JH1), en el extremo carboxilo terminal, posee todas las características de un típico dominio de una tirosina quinasa. Adyacente a este, se encuentra el dominio catalíticamente inactivo parecido a una quinasa o dominio pseudoquinasa (JH2), el cual se encuentra relacionado distantemente de los otros dominios tirosina quinasas. Es esta disposición en tándem de los dominio quinasa, que le brinda la distintiva a la familia de las quinasas JAK y lo que les brinda su nombre: “*Just another kinase*” o traducido “solo otra quinasa” (Yamaoka, *et al*, 2004; Rawling, *et al*, 2004).

A pesar que el dominio JH2, carece de la actividad catalítica, cumple una función regulatoria esencial sobre el dominio JH1; ya que una mutación en éste deroga la actividad enzimática de la enzima y plantea un objetivo de tratamiento. Mientras que, el dominio del amino terminal contienen un dominio homólogo a Src llamado SH<sub>2</sub> (JH3–JH4) del cual todavía se desconoce su rol exacto, y un dominio compuesto por la banda de 4.1, ezrina, radixina, moesina (FERM) (JH6–JH7). Este dominio FERM cuenta con 300 aminoácidos y está implicado en la mediación de interacciones con los receptores de citosinas (Bandaranayake *et al*, 2012, Yamaoka, *et al*, 2004; Yeh, *et al*, 1999).

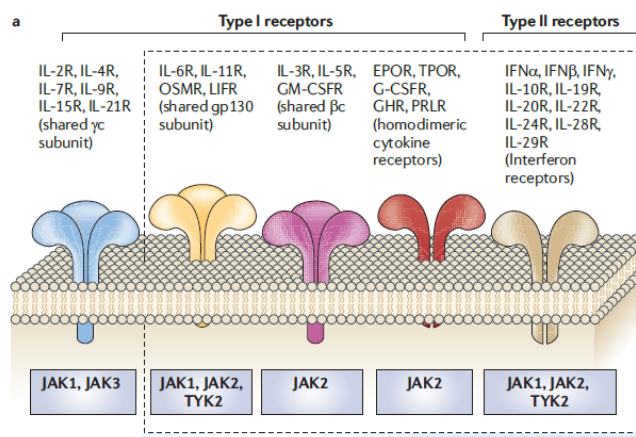
Figura 5. Representación esquemática de la estructura primaria de las proteínas JAK.



(Yamaoka, *et al*, 2004)

Las proteínas JAK se expresan de forma ubicua; a nivel celular pueden encontrarse en el citosol cuando están expresadas experimentalmente, en ausencia de receptores de citosina; sin embargo, debido a la asociación íntima que poseen con dichos receptores, normalmente se localizan en endosomas y en la membrana plasmática, junto con sus receptores afines (Quintás-Cardama, *et al*, 2011; Yamaoka, *et al*, 2004).

Figura 6. Receptores de citosinas



(Quintás-Cardama, *et al*, 2011)

Los receptores citosinas están clasificados de acuerdo a la estructura tridimensional de sus ligandos, éstos carecen de la actividad tirosina quinasa intrínseca y, por consiguiente dependen de los receptores asociados a quinasas JAK para transmitir sus señales y que éstas lleguen al citoplasma. Hay dos tipos de receptores de citosinas: tipo I y tipo II; las de tipo I poseen una estructura de cuatro hélices en paquete; mientras que las de tipo II poseen una estructura más diversa. La mayoría de los receptores de citosinas que modulan la actividad del sistema hematopoyético pertenecen al tipo I. La activación de las JAK ocurre en pocos minutos después de la unión con el ligando (Quintás-Cardama, *et al*, 2011; Yamaoka, *et al*, 2004; Rawling, *et al*, 2004).

3. **Activación.** La vía de señalización JAK/STAT es una de las vías más simples que se ha mantenido evolutivamente conservada, siendo la vía de transducción de señales y activación de transcripción de genes involucrados en la proliferación, diferenciación, migración, apoptosis, supervivencia celular dependiendo de la señal, el tejido y contexto celular. Esta vía de señalización cumple un papel principal en los procesos de desarrollo y homeostasis, como lo son la hematopoyesis, el desarrollo de células inmunes, mantenimiento de células madre, el crecimiento del organismo y el desarrollo de las glándulas mamarias (Quintás-Cardama, 2011; Harrison, 2012).

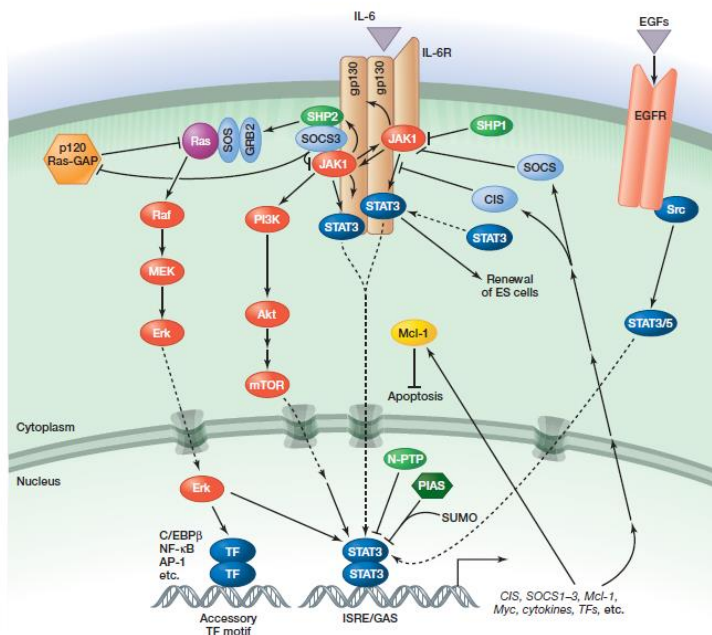
La activación de la vía inicia cuando el ligando extracelular (citosina) se une a su receptor y promueve un cambio conformacional en los receptores, lo que permite que las JAK intracelulares se acerquen entre sí y se asocien para generar una fosforilación cruzada. La trans-fosforilación de las proteínas JAK conlleva a



la fosforilación de los sustratos, tanto el receptor como los factores de transcripción STAT's, los cuales al ser reclutados se unen a las proteínas JAK mediante el dominio SH<sub>2</sub>. Una vez los factores STAT se encuentran activados se disocian de los receptores y forman dímeros u oligómeros más complejos, los cuales se translocarán al núcleo y estos actúan como secuencias potenciadoras de genes diana, regulando así la transcripción de los mismos (Harrison, 2012; Quintás-Cardama, *et al*, 2011).

Se han identificado dos sitios de fosforilación en JAK2, los cuales son los aminoácidos Ser523 y Tyr570 que son autofosforilados vía los mecanismos cis y trans, respectivamente. Esto debido a que la fosforilación del residuo serina en posición 523 se da independientemente de la concentración de JH2; mientras que, la fosforilación del residuo tirosina en posición 570, es dependiente de la concentración de JH2, consistente con una autofosforilación en trans; esto alude a que la fosforilación de estos sitios fortifica la interacción inhibitoria mediada por JH2 mediante las interacciones electrostáticas entre las formas fosforiladas de los residuos Ser523 y Tyr570 con los residuos básicos de JAK2, presuntamente encontrados en JH1 o JH2. Estos sitios de autofosforilación no se encuentran conservados en las otras proteínas JAKs, lo que sugiere que únicamente JAK2 cuenta con este mecanismo de regulación negativa; además de esto, también cuenta con un residuo asparagina en la posición 673 en el dominio JH2 que presuntamente juega un rol positivo en la activación de JAK2, lo cual podría ser debido al modo de unión a Mg-ATP que utilizan las proteínas JAKs, el cual es diferente al de las utilizadas por otras proteínas quinasas (Bandaranayake, *et al*, 2012; Ungureanu, *et al*, 2011).

Figura 7. Vía de Señalización JAK/STAT



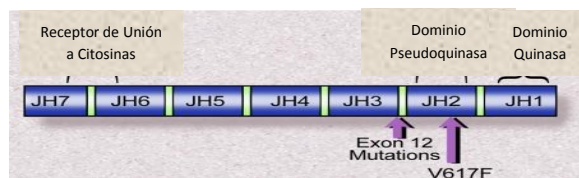
(Harrison, 2012)

En los mamíferos, existen cuatro miembros de la familia JAK (previamente mencionados) y siete factores de transcripción STAT's. Diferentes JAK y STAT son reclutados de acuerdo a su especificidad tisular y los receptores que participan en la vía de señalización. A pesar de que la vía de señalización es bastante específica, las actividades de ésta pueden influir en el estado transcripcional global, mediante la modificación de la estructura de la cromatina, debido a este hecho y al tipo de procesos que se ven regulados por los factores involucrados en dicha vía de señalización es que las mutaciones en las proteínas JAK se encuentran asociadas a diversas enfermedades, incluyendo severas inmunodeficiencias, síndrome de Job, algunas leucemias, policitemia vera, entre otros desórdenes mieloproliferativos (Harrison, 2012; Quintás-Cardama, *et al*, 2011; Rawling, *et al*, 2004).

4. **Implicaciones en la enfermedad.** En 2005 se dio el descubrimiento de la mutación puntual en el exón 14 del gen JAK2, la cual es causada por una sustitución de valina por fenilalanina en el codón 617, este se da en el dominio JH2, por lo que se le nombró mutación V617F. Este fue el primer indicio de una mutación en el gen JAK2 que causaba ciertos tipos de neoplasias mieloproliferativas, entre ellas la más común policitemia vera. Se ha descrito que dicho dominio posee la función de autoinhibición de la proteína, especialmente esa valina del codón 617 tiene un rol importante mediando dicha autoinhibición. Al sustituirse la valina por una fenilalanina, el resultado es una abrogación de la autoinhibición por lo que la proteína se mantiene permanente activa, por lo que se dice que es una mutación de ganancia de función (Tefferi & Gilliland, 2005 & 2008; Gari, 2009; Quintás-Cardama, *et al*, 2011).

La mayoría de pacientes con neoplasias mieloproliferativas son JAK2 V617F positivos; sin embargo, existía un pequeño número de pacientes que eran negativos para este alelo, por lo que estudios en alelos alternativos que también podrían resultar en la activación de la vía de señalización JAK/STAT dio por resultado cuatro nuevas mutaciones somáticas en el exón 12 del gen JAK2: un alelo que resulta de la mutación puntual de sustitución de lisina por leucina en el codón 539 (K539L) y tres alelos adicionales resultado de deleciones o inserciones, en los cuales se encuentran implicados los codones 538-543. Todas estas mutaciones conllevan a la autofosforilación de la proteína JAK2, permaneciendo en actividad constante, por lo que promueve la proliferación celular en la vía hematopoyética, generando las neoplasias mieloproliferativas mencionadas anteriormente (Tefferi & Gilliland, 2005 & 2008; Gari, 2009; Quintás-Cardama, *et al*, 2011). En la figura 8 se pueden observar los dominio proteicos que se ven afectados por las mutaciones en los exones 12 y 14, respectivamente.

Figura 8. Dominios homólogos de la familia de proteínas JAK y los sitios de mutación

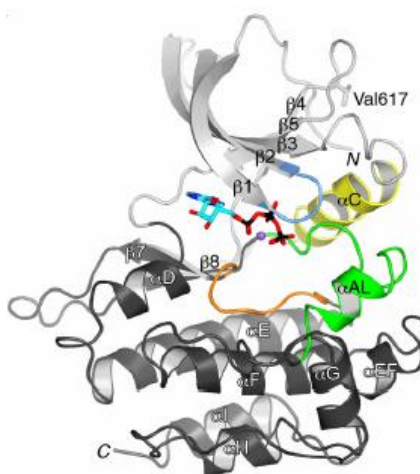


(Levine & Gilliland, 2008)

## C. MUTACIONES EN JAK2

1. **V617F.** En 2005 descubrieron una mutación de ganancia de función que conlleva la sustitución de una valina por una fenilalanina en el codón 617 de JAK2 en el exón 14, identificada en pacientes de NPM con BCR-ABL1 negativo, con una frecuencia de 65 a 97% en policitemia vera, 23 a 57% en trombocitemia esencial y 34 a 57% in mielofibrosis idiopática. Esta mutación ocurre en el dominio pseudoquinasa (JH2) de la enzima y genera una activación constitutiva de la misma, resultando en la pérdida del efecto autoinhibitorio del dominio pseudoquinasa (JH2) sobre el dominio quinasa (JH1); esto se debe a que la fenilalanina en posición 617 interactúa con la fenilalanina de la posición 595 y bloquea otras interacciones importantes, que da como consecuencia la pérdida de las interacciones del complejo JH1/JH2 y fuerzan a JH1 a mantenerse abierta, permaneciendo en la conformación activa de la enzima, esto tiene como consecuencia la activación constitutiva de la vía JAK/STAT, entre otras como las vías MAPK y PI3K/Akt (Bassam, *et al*, 2013; Lee, *et al*, 2009; Gäbler, *et al*, 2013).

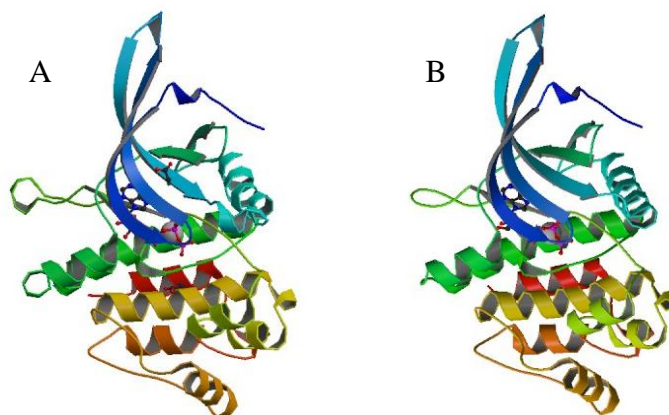
Figura 9. Diagrama de cintas de la estructura del dominio JH2 de JAK2.



(Bandaranayake, *et al*, 2012)

La valina 617 que es sustituida por fenilalanina en la misma posición, en la forma mutada de la proteína, se encuentra ubicada en el bucle  $\beta 4$ - $\beta 5$  en el lóbulo N del dominio JH2, como se observa en la figura 9, en color gris claro, en celeste se puede observar el bucle de unión del nucleótido y en amarillo la hélice  $\alpha C$ . El lóbulo C se encuentra en gris oscuro, el bucle catalítico en naranja y el bucle de activación en verde. El ATP se muestra representadas en estructuras de esqueleto en color cian se muestran los carbonos, los oxígenos en rojo, el nitrógeno en azul y el fósforo en negro; asimismo, el ión de  $Mg^{2+}$  se encuentra coloreado en púrpura y la valina617 se muestra como una banda. El modo de unión del nucleótido al dominio JH2 en la forma mutada V617F es casi indistinguible del modo de unión en la forma nativa de JAK2.

Figura 10. Estructuras cristalográficas del dominio JH2 pseudoquinasa de JAK 2 nativa (izquierda) y la forma mutada V617F (derecha).

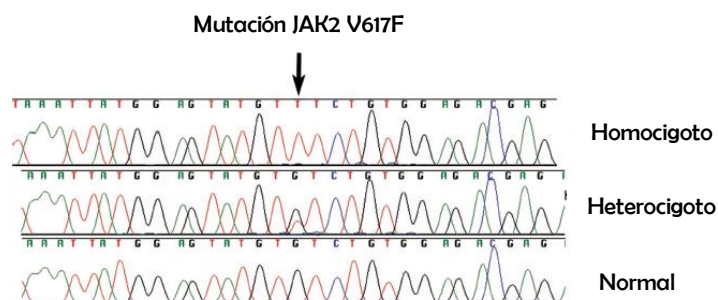


(NCBI)

En la figura 10 se puede observar la comparación entre las estructuras de cristal del dominio pseudoquinasa de ambas proteínas, tanto la nativa de lado izquierdo (A), como la forma mutada V617F del lado derecho (B) al estar unidas a ATP y magnesio, aunque esencialmente parecen idénticas, se pueden observar ligeros cambios en la conformación, sobre todo en la hélice  $\alpha C$  del lóbulo N, así como en los bucles  $\beta 3-\alpha C$  y  $\beta 4-\beta 5$ ; al observar detalladamente los giros y las posiciones de las hélices  $\alpha$  de cada estructura se notan sutilmente diferentes, en el caso de la estructura nativa algunas de las hélices  $\alpha$  como la verde y la naranja se observan más compactas, mientras que en la estructura de la forma mutada los giros son levemente más amplios, resaltando más en la hélice  $\alpha$  coloreada en verde, por lo que pareciera que es más larga que en la forma nativa. Según el estudio de Bandaranayake *et al* (2012) estas pequeñas diferencias estructurales se corroboran con datos bioquímicos que indican  $\beta$ que la mutación V617F hace más rígida la hélice  $\alpha C$  (coloreada en turquesa, figura 10) la cual se encuentra en el lóbulo N del dominio JH2, lo cual facilita la transfosforilación del dominio JH1, que regula la actividad catalítica de la proteína.

Esta mutación es un evento somático adquirido del linaje hematopoyético, identificado en células madre hematopoyéticas y células progenitoras multipotentes, así como en granulocitos diferenciados. Las células que presentan la mutante JAK2 V617F adquieren una habilidad de crecer independiente de las citoquinas o con una hipersensibilidad a las mismas. La mayoría de pacientes con NPM son heterocigotos para la mutación; sin embargo, existen algunos casos de homocigotos que son más frecuentes en pacientes con policitemia vera y mielofibrosis idiopática. Diversos estudios han encontrado una correlación en mayor carga alélica de JAK2 V617F y síntomas más acentuados con mayor propensión a transformarse en leucemia. Adicionalmente, JAK2 V617F se ha correlacionado con la fosforilación de la histona-arginina metiltransferasa PRMT5, inhibiendo su actividad causando modificaciones alteradas de la cromatina y expresión génica (Bassam, *et al*, 2013; Gäbler, *et al*, 2013).

Figura 11. Secuencia cromatográfica fluorescente de pacientes con JAK2 V617F.



(Steensma, 2006)

En la figura 11 se muestran las secuencias de pacientes con la mutación puntual de JAK2 V617F, en el panel superior se observa la secuencia de un paciente homocigoto, en la parte intermedia se muestra la secuencia de un paciente heterocigoto, en el cual se pueden ver los dos picos de los nucleótidos sobrepuestos Guanina y Timina, resultado del cambio de aminoácidos en la secuencia proteica. Finalmente en la parte inferior se muestra la secuencia de una persona sana, que no tiene mutación en la proteína.

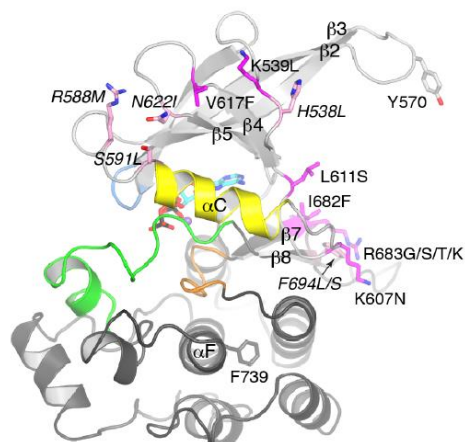
2. **Mutaciones en el Exón 12.** En 2007 las mutaciones en el exón 12 de JAK2 fueron descritas en pacientes con policitemia vera, negativos para la mutación V617F. Estas son un grupo de mutaciones que se encuentran específicamente en una pequeña proporción (2–3%) de los pacientes con policitemia vera. Cuando se comparan los pacientes que presentan la mutación V617F con los pacientes que poseen alguna mutación en el exón 12, estos últimos presentan un nivel mayor de hemoglobina y menor conteo de plaquetas y leucocitos, siendo bastante similares en todo lo demás (Bassam, *et al*, 2013; Tefferi, *et al*, 2009).

Las mutaciones encontradas en este exón son somáticas de ganancia de función y son mutaciones puntuales, como deleciones e inserciones. En el reporte original, las cuatro mutaciones mencionadas fueron: N542-E543del, F537-K539delinsL, K539L y H538Q-K539L. Sin embargo, al realizarse más estudios sobre este exón se fueron descubriendo más mutaciones. Se llegó a determinar que la mutación más frecuente es la N542-E543del, con un 23% de ocurrencia, y la E543-D544del con un 11%. Las mutaciones en exón 12 parecen ser específicas para pacientes con policitemia vera y ocurren virtualmente en todos los pacientes negativos para JAK2 V617F; asimismo, en general, los pacientes con estas mutaciones son más jóvenes que los que presentan la mutación V617F (Gäbler, *et al*, 2013; Bassam, *et al*, 2013; Tefferi, *et al*, 2009).

Estas mutaciones evidencian claramente una interacción de estimulación en el estado basal de la proteína, ya sea por desestabilización de la interacción inhibitoria, pero sin comprometer la habilidad del dominio JH2 para formar la interacción estimulatoria sobre el dominio JH1; o por hiperestabilización de la

interacción estimulatoria. Según estudios de Ungureanu, *et al* (2011), varias de estas mutaciones al igual que la V617F dañan la actividad catalítica, lo que potencia la actividad del dominio JH1, debido a la pérdida de la fosforilación de los residuos Ser523 y Tyr570 encargados de la regulación negativa.

Figura 12. Mutaciones hiperactivas en el dominio JH2 de JAK2.



(Bandaranayake, *et al*, 2012)

En la figura 12 se pueden observar algunos de los residuos mutados hallados en varios pacientes con neoplasias mieloproliferativas y confirmados bioquímicamente, los residuos mutados se hallan representados en estructuras de esqueleto y coloreados de rosado, las mutaciones que causan la hiperactivación de la proteína se hallan de color fucsia. El resto de los componentes siguen la misma clave de color que la figura 9 (Bandaranayake, *et al*, 2012; Chrencik, *et al*, 2010).

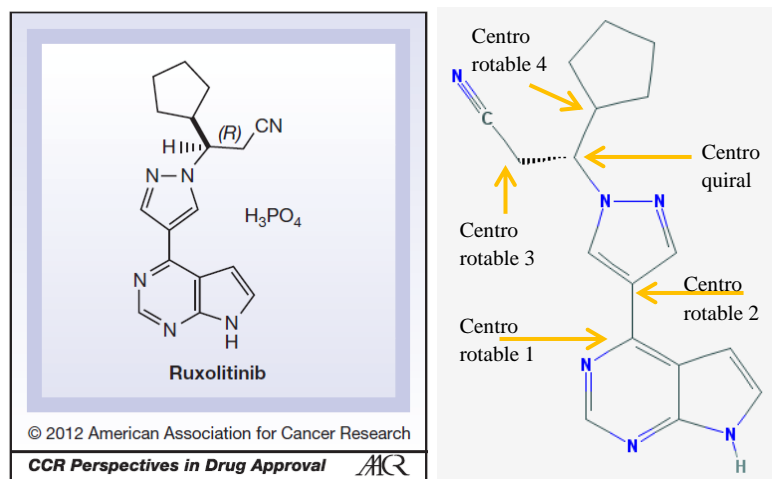
## D. FÁRMACOS

1. **Ruxolitinib.** Ruxolitinib es el nombre del ingrediente activo del medicamento, mientras que el nombre comercial es Jakavi® o Jakafi®, producto de la casa farmacéutica Novartis Pharmaceuticals. Jakavi fue el primer medicamento aprobado por la FDA para el tratamiento de síndromes mieloproliferativos. Es un inhibidor potente y selectivo que actúa sobre JAK1 y JAK2, de administración oral (Australian Government, 2013; FDA, 2011). Otros nombres con los que se le conoce son INCB018424, (R)-3-(4-(7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il)-3-ciclopentilpropanonitrilo (ChEMBL).

Ruxolitinib pertenece a una nueva clase de agentes antineoplásicos que son inhibidores de proteínas quinasa, desarrollados para el tratamiento de múltiples desórdenes. Específicamente, ruxolitinib inhibe la fosforilación del receptor de JAK1 y JAK2, inhibiendo la vía de señalización consecutiva JAK-STAT (Australian Government, 2013; EMA 2012).

Ruxolitinib es un (R)-3-(4-(7h-pirrol[2,3-d]pirimidina-4-il)1H-pirazol-1-il)3-ciclopentilpropanenitrilo, siendo una pirrolpirimidina o deazapurina sintética derivada, que posee un centro quiral y la sustancia activa es el enantiómero R. El compuesto tiene un peso de 404.36g/mol (Australian Government, 2013; EMA 2012; FDA, 2011).

Figura 13. Estructura química de ruxolitinib fosfato



(Deisseroth, *et al*, 2012)

Este es un compuesto básico, con un pKa de 4.3 y 11.8, el compuesto es una sal fosfatada (1:1) cristalina de coloración blanca a rosada suave, con un solubilidad variable según el pH de 1 a 8 en buffers acuosos. Se pueden encontrar pequeñas trazas del enantiómero S en la droga que se considera toxicológicamente aceptable. Asimismo el fármaco cuenta con un IC<sub>50</sub> de 2.8nM y una Ki de 0.1nM (Australian Government, 2013; FDA, 2011).

#### a. Farmacología clínica

1) **Mecanismo de acción.** Ruxolitinib es un inhibidor de quinasas que tiene como blanco terapéutico las proteínas JAK1 y JAK2 que median la señalización de un gran número de citosinas y factores de crecimiento importantes en la hematopoyesis y funciones inmunes. Señales aberrantes en la vía JAK/STAT han sido identificadas en pacientes con neoplasias mieloproliferativas, causadas por mutaciones activas en JAK2; por lo que ruxolitinib, actúa anticipándose a aliviar los síntomas causados por dichas neoplasias, como la esplenomegalia y síntomas constitutivos, como pérdida de peso y fatiga, que resultan presumiblemente de altos niveles de citosinas circulantes (Australian Government, 2013; EMA 2012; FDA, 2011).

2) **Farmacodinámica.** Ruxolitinib inhibe la formación del STAT3 fosforilado en células sanguíneas expuestas a varias citosinas. Ruxolitinib no tiene actividad inhibitoria significativa en 29 quinasas humanas no relacionadas. La administración del medicamento mostró una máxima inhibición de

la fosforilación de STAT3 2 horas después de tomada la dosis, regresando casi a los niveles basales 10 horas después (Australian Government, 2013; EMA 2012; FDA, 2011).

3) Farmacocinética. Ruxolitinib es absorbido rápidamente después de la administración oral con la concentración en plasma máxima entre 1 a 2 horas post-dosis. Estudios han mostrado que la absorción estimada de ruxolitinib es de al menos un 95%. La farmacocinética de ruxolitinib es lineal en dosis de 5 a 200mg. Estudios *in vitro* mostraron que ruxolitinib es una droga con alta permeabilidad lo que explica los altos porcentajes de absorción de la misma. El volumen aparente de distribución de ruxolitinib en el estado estacionario es de 53 a 65L en pacientes con mielofibrosis (Australian Government, 2013; FDA, 2011).

Estudios *in vitro* han mostrado que la enzima responsable del metabolismo de ruxolitinib es CYP3A4. El metabolismo de ruxolitinib incluye 2 o 3 hidroxilaciones de grupo ciclopentil, la formación de un derivado 3-cetociclopentil, 0-glucuronidación del grupo ciclopentil propanonitrilo, hidroxilación de los grupos ciclopentil propanonitrilo y pirrolidina e hidroxilación o dihidroxilación del grupo ciclopentil propanonitrilo. Estas modificaciones resultan en varios diasterómeros. Sin embargo, el compuesto ruxolitinib, sin cambio alguno, es la entidad más predominante representando aproximadamente el 60% del medicamento en circulación. Asimismo, existen 2 metabolitos activos 2-hidroxi ciclopentil derivado y 3-hidroxi ciclopentil derivado que fueron identificados en plasma, representando el 25% y 11%, respectivamente. Estos dos metabolitos cuentan con 1/5 y 1/2 de la actividad farmacológica de ruxolitinib, respectivamente (Australian Government, 2013; EMA 2012; FDA, 2011).

La eliminación de ruxolitinib es en principalmente por la vía urinaria; la eliminación promedio de la vida media de ruxolitinib es de aproximadamente 3 horas y la vida media de ruxolitinib más metabolitos es de aproximadamente 5,8 horas (Australian Government, 2013; FDA, 2011).

2. **Farmacóforo.** La primera definición de farmacóforo fue realizada en 1900 por Paul Ehrlich citada textualmente: «*un marco molecular que posee las características esenciales responsables de la actividad biológica de un fármaco*» (Varnek & Tropsha, 2008). El concepto de farmacóforo es ahora ampliamente aceptado y usado en la comunidad de química medicinal, como en el campo del modelado molecular computacional. Existen dos definiciones cercanamente relacionadas del farmacóforo que se han utilizado en estos dos campos de investigación. La definición hecha por Ehrlich es la que se sigue utilizando en el ámbito de la química medicinal, ya que se puede referir como derivados de un farmacóforo a moléculas que poseen actividad medicinal o de fármaco y que se derivan de un farmacóforo original; es decir de un fármaco establecido, o de una molécula hallada naturalmente (Ekins, 2006).

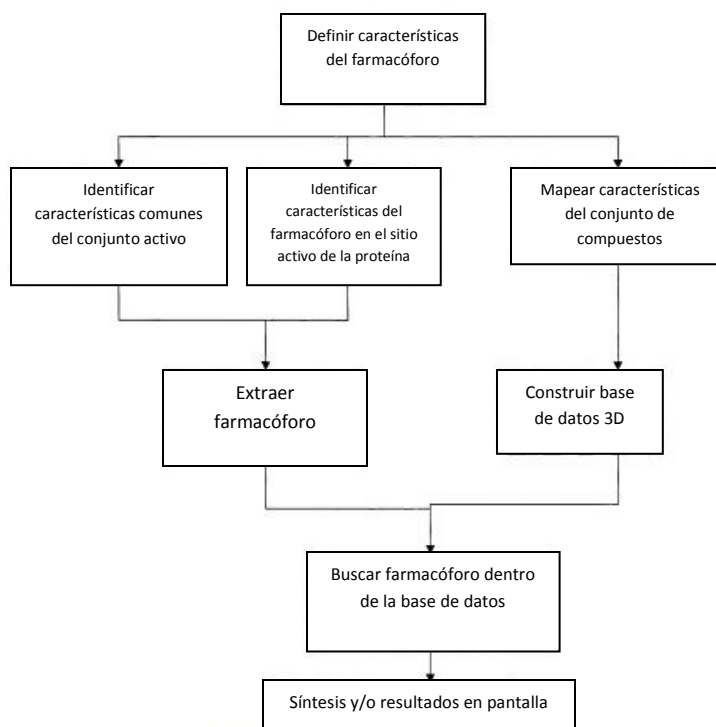


Peter Gund definió en 1977 al farmacóforo como: «*un conjunto de características estructurales en una molécula que son reconocidas por el sitio receptor y son responsables por la actividad biológica de la molécula*» (Varnek & Tropsha, 2008). Esta definición es ligeramente diferente de la definición de Ehrlich, en la que se implica la naturaleza tridimensional del concepto de farmacóforo, y es más consistente con los conocimientos de hoy en día de las interacciones receptor-ligando que han sido elucidadas por estructuras de rayos x. Con esta definición, el farmacóforo puede ser un conjunto de características tridimensionales desconectadas en el espacio, pero que son requeridas y reconocidas por el receptor y que podrían mantenerse unidas por diferentes marcos moleculares. Por lo que este concepto confiere una plataforma para una importante actividad en la química medicinal práctica, que se conoce como “*Scaffold hopping*” o salto de andamios entre diferentes series químicas. Es por eso que este concepto es más utilizado en el modelado molecular computacional, ya que algunos programas buscan u farmacóforo al utilizar algoritmos que permiten la automatización de la identificación de características químicas compartidas entre distintas moléculas (Ekins, 2006).

La sección de química medicinal de la IUPAC ha publicado un glosario de términos usados en esta rama, entre los que se encuentran los conceptos de “farmacóforo” y “patrón farmacofórico”. La definición que da la IUPAC es: «*un farmacóforo es el conjunto de características estéricas y electrónicas que es necesario para asegurar las interacciones supramoleculares óptimas con una estructura diana biológica específica y para activar o bloquear su respuesta biológica*» (Böhm & Schneider, 2006). Y como aclaración de esa declaración de la definición continúa diciendo: «*un farmacóforo no representa una molécula real o una asociación real de grupos funcionales, sino es puramente un concepto abstracto que explica las capacidades de interacción molecular comunes de un grupo de compuestos hacia una estructura diana...*» (Böhm & Schneider, 2006).

A continuación en la figura 14, se puede observar un algoritmo para la búsqueda y elucidación de un farmacóforo; como se puede observar en el diagrama, es importante tener claras las características farmacofóricas que se desean para realizar la búsqueda del farmacóforo, de lo contrario se invertiría demasiado tiempo en pruebas de diversas características que pueden no ser las apropiadas de acuerdo a la molécula diana. Asimismo, una vez finalizada la búsqueda y seleccionado el mejor candidato se procede a la síntesis en laboratorio del mismo. Este procedimiento ha ahorrado millones a empresas farmacéuticas de ahí la importancia de los estudios de modelado molecular en el diseño de nuevos fármacos y moléculas de interés, así como el análisis de sus interacciones (Böhm & Schneider, 2006; Ekins, 2006).

Figura 14. Descripción general del proceso de la búsqueda y elucidación de un farmacóforo.



(Böhm & Schneider, 2006)

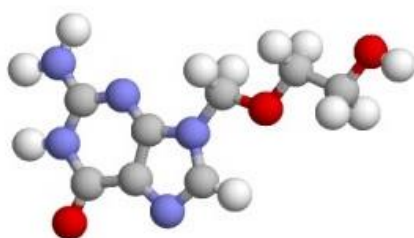
a. Regla de Lipinski. También conocida como la regla de los cinco de Pfizer o, simplemente, la regla de los cinco (RO5 por sus siglas en inglés). Es una regla general para evaluar la similitud de los fármacos o para determinar si un compuesto químico con cierta actividad farmacológica o biológica tiene propiedades que lo conviertan en un fármaco activo que pueda ser administrado por vía oral en humanos (Lipinski, 2004; Leeson; 2012).

La regla describe las propiedades farmacofóricas importantes para la farmacocinética de un fármaco en el cuerpo humano, incluyendo su absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME por sus siglas en inglés). No obstante, la regla no predice si un compuesto es farmacológicamente activo. La regla fue formulada por Christopher A. Lipinski en 1997, basado en la observación de que la mayoría de fármacos administrados por vía oral son relativamente pequeños y son moléculas moderadamente lipofílicas. Lipinski y su equipo analizaron las propiedades fisicoquímicas de 2245 fármacos y candidatos de fármacos obtenidos de WDI (World Drug Index) en un ensayo clínico, del cual concluyeron que un compuesto es más probable que sea permeable a la membrana y más fácil de absorber por el cuerpo si cumple con los criterios listados a continuación (Lipinski, *et al*, 1997; Lipinski, 2004):

- Número de enlaces de hidrógeno donadores igual o menor a 5 (es decir, el número total de enlaces N-H y O-H en el compuesto).

- Número de enlaces de hidrógeno aceptores igual o menor a 10 (esto incluye a todos los átomos de N y O del compuesto).
- Masa molecular menor de 500Da.
- La lipoficidad del compuesto expresada como el coeficiente de partición (log P) octanol-agua no debe ser mayor de 5 (Lipinski, *et al*, 1997).

Figura 15. Ejemplo de la evaluación de un fármaco con la regla de Lipinski.



<b>Ejemplo:</b>	<b>Aciclovir</b>
<b>H-donadores:</b>	<b>4</b>
<b>MM:</b>	<b>225.21</b>
<b>MLOGP:</b>	<b>-0.09 (exp. LogP: -1.56)</b>
<b>H-aceptores:</b>	<b>8</b>

**Aciclovir si pasa la prueba de los 5.**

(Pharmainformatic.com)

Se puede notar que todos los números son múltiplos de 5, de ahí deriva el nombre de la regla. La regla de Lipinski establece que un fármaco oralmente activo no puede violar más de dos de los criterios enlistados anteriormente. Los candidatos que se ajustan a la regla de los cinco tienden a tener menores tasas de rotación durante los ensayos clínicos y por lo tanto tienen una mayor probabilidad de llegar al mercado. Esta regla aplica únicamente a los compuestos absorbidos por difusión pasiva a través de las membranas celulares, los que son transportados activamente son excepciones a la regla (Lipinski, *et al*, 1997; Lipinski, 2000; Leeson, 2007).

## E. MÉTODOS COMPUTACIONALES

1. **Química computacional.** El término “química computacional” es usado generalmente cuando un método matemático se encuentra suficientemente bien desarrollado que puede ser automatizado mediante la implementación en la computadora. Esta rama de la química se caracteriza no por el objeto de estudio, sino por las herramientas utilizadas. Esta ciencia estudia los problemas químicos a nivel atómico-molecular, los métodos que utiliza son mecánica molecular, basada en el modelo de moléculas de bolas y resortes; métodos *ab initio*, basados en soluciones aproximadas de la ecuación de Schrödinger sin apelar a ajustar para experimentar; métodos semiempíricos, basados en soluciones aproximadas de la ecuación de Schrödinger apelando a un ajuste para experimentar (por ejemplo, utilizando parametrización); métodos de teoría de densidad funcional (DFT), basados en soluciones aproximadas de la ecuación de Schrödinger, sin pasar por la función de onda que es una característica central de los métodos *ab initio* y semiempíricos; y finalmente métodos de dinámica molecular que estudian las moléculas en movimiento (Young, 2001; Cramer, 2004; Lewars, 2011).

Los postulados y teoremas de la mecánica cuántica forman la fundación rigurosa para la predicción de las propiedades químicas observables desde los principios básicos. En otras palabras, la mecánica cuántica es la correcta descripción matemática del comportamiento de los electrones, ya que los postulados fundamentales aseveran que los sistemas microscópicos son descritos por funciones de onda que caracterizan completamente todas las propiedades físicas del sistema, basándose en la ecuación de Schrödinger. Los métodos *ab initio* y el rápido DFT permiten el estudio de nuevas moléculas de interés teórico, siempre que éstas o sean demasiado grandes. Por otro lado los métodos semiempíricos, que son mucho más rápidos que los dos anteriores, pueden aplicarse a moléculas mucho más grandes, mientras que la mecánica molecular se ocupará del cálculo de geometría y energía de moléculas más grandes, como proteínas y ácidos nucleicos; no obstante, con la mecánica molecular no se obtiene información sobre las propiedades electrónicas (Young, 2001; Lewars, 2011).

Uno de los usos más comunes de la química computacional es modelar un sistema molecular antes de sintetizar la molécula de interés en laboratorio. Aunque los modelos computacionales no son perfectos, son lo suficientemente buenos llegando a un 90% de similitud; lo cual es un porcentaje bastante alto y aceptable, ya que la síntesis en laboratorio no solo puede requerir meses de trabajo, sino el gasto de diversos reactivos en altas cantidades a veces y uso de material y equipo especial, generando algunas veces desechos altamente tóxicos, elevando los costos experimentales de los mismos. Otro de los usos importantes de la química computacional es para obtener mayor detalles de ciertos procesos moleculares y ayudar a comprenderlos mejor; por ejemplo existen propiedades de una molécula que pueden ser obtenidas más fácilmente computacionalmente que experimentalmente; de igual manera, existen interacciones moleculares de las cuales se pueden obtener resultados que ni siquiera con técnicas avanzadas pueden obtenerse experimentalmente en laboratorio. Por lo que muchas veces se prefiere recurrir a la química computacional para modelar dichas interacciones o moléculas y ganar una comprensión adicional de las mismas (Young, 2001; Cramer, 2004; Lewars, 2011).

La señalización molecular, más conocida como “*docking* molecular”, en el sitio activo de una enzima para visualizar cómo se acopla es una de las aplicaciones más importantes de la química computacional. Mediante estos programas se puede manipular el sustrato y tratar de acoplarlo en el sitio activo, con un dispositivo de retroalimentación que permite simular las fuerzas que interactúan sobre la molécula que está siendo acoplada, aunque ahora el acoplamiento o *docking* automatizado es el procedimiento estándar que se utiliza en los programas. Este procedimiento se realiza mediante mecánica molecular debido al tamaño de las moléculas involucradas; aunque también se puede utilizar mecánica cuántica para estudiar segmentos de la biomolécula paso a paso (Lewars, 2011).

2. **Química cuántica.** La química cuántica estudia el movimiento de las partículas, tanto moleculares como atómicas, mediante la aplicación de mecánica cuántica, aportando una descripción precisa del comportamiento de los electrones. La química cuántica trata a las moléculas como colección de núcleos y electrones, sin hacer referencia alguna a los enlaces químicos. La solución a la ecuación de Schrödinger es en términos de los movimientos de los electrones, lo que conduce directamente a la estructura molecular y la energía de la molécula. Sin embargo, como la ecuación de Schrödinger únicamente puede ser resuelta para el átomo de hidrógeno, se utilizan aproximaciones para generar los resultados de todos los demás (Levine, 2005; Friesner, 2005; Hehre, 2003).

La influencia de la química cuántica se presenta en todas las ramas de la química, en química física se utiliza para el cálculo de las propiedades termodinámicas de los gases, la interpretación de espectros moleculares; también puede realizarse el cálculo de propiedades de los estados de transición, con lo que se estiman las constantes de velocidad de los gases involucrados. En química orgánica se pueden calcular las estabildades relativas de las moléculas, calcular propiedades de los intermediarios de reacción y el análisis de espectros de resonancia magnética nuclear, entre otros. El ejemplo más claro en química analítica es análisis de los resultados obtenidos por métodos espectroscópicos. Para la predicción y explicación de las propiedades de los iones complejos de metales en transición, la química inorgánica se basa en el método mecánico cuántico de aproximación, conocido como teoría campo ligando. Y finalmente en bioquímica, se pueden realizar estudios de las conformaciones moleculares de diversas biomoléculas, entre las más estudiadas son las interacciones enzima-ligando (Levine, 2005; Jensen, 2007; Adams, *et al*, 2011).

En los últimos años han surgido dos enfoques bastante beneficiosos para la solución de la ecuación de Schrödinger. Los enfoque basados en la función de onda que expanden la función de onda electrónica como suma de los factores de Slater determinantes, los orbitales y coeficientes de los que están optimizados por varios procedimientos numéricos. Y la teoría de Hartree-Fock que es el método más simple de este tipo, implica la optimización de un único determinante; aunque su utilidad es limitada, debido a la completa negligencia de la correlación de electrones (Friesner, 2005).

3. **Aproximación de Hartree–Fock.** El término *ab initio* significa “desde el comienzo”, y es el nombre que se le da a los cálculos computacionales de mecánica cuántica que se derivan directamente de un principio teórico, sin inclusión de datos experimentales. El más común de estos cálculos es la aproximación de Hartree-Fock, en la cual la aproximación primaria es la aproximación de campo central; esto quiere decir, que la repulsión electrón-electrón de Coulomb es tomada en cuenta al integrar la expresión de repulsión; con lo que se obtiene un promedio del efecto de repulsión, pero no la interacción explícita de la misma. Este es un cálculo variable, ya que las energías calculadas son todas iguales o mayores que la energía exacta. Las energías se calculan en unidades llamadas Hartrees (1 Hartree = 27.2116 eV). Debido a la aproximación de campo central, las energías de los cálculos de esta aproximación

siempre son mayores que la energía exacta y tienden a un valor límite que se conoce como el límite de Hartree-Fock que mejora el conjunto base (Young, 2001; Cramer, 2004; Jensen, 2007; Lewars, 2011).

Una de las ventajas de este método es que simplifica la ecuación de Schrödinger de muchos electrones, en muchas ecuaciones simples de un electrón. Cada ecuación de electrón se soluciona para entregar una función de onda simple de un electrón, llamada un orbital y su energía llamada energía de orbital. Este orbital describe el comportamiento de un electrón en el campo completo de todos los demás electrones (Young, 2001; Jensen, 2007).

La segunda aproximación en los cálculos de Hartree-Fock es debido al hecho de que la función de onda debe ser descrita por alguna función matemática, lo cual se conoce exactamente sólo para algunos sistemas de un electrón. Las funciones más usadas son comúnmente las combinaciones lineales de Gaussian tipo orbitales, abreviándose GTO. La función de onda es formada por combinaciones lineales de orbitales atómicos y es debido a esta aproximación, que la mayoría de los cálculos de Hartree-Fock dan una energía computada mayor que el límite de Hartree-Fock (Young, 2001; Cramer, 2004; Lewars, 2011).

Estos orbitales se combinan luego en un determinante, esto se realiza para satisfacer los dos requerimientos de la mecánica cuántica: el primero es que los electrones deben ser indistinguibles, teniendo una combinación lineal de los orbitales en los que cada electrón aparece en cada orbital, solamente se puede decir que el electrón ha sido puesto en determinado orbital, pero no se puede saber que electrón en particular es. El segundo requerimiento es que la función de onda por fermiones (un electrón es un fermión) debe ser antisimétrica con respecto a dos partículas intercambiables; de esta manera, si el electrón 1 y el electrón 2 son cambiados, el signo total de la función de onda debe cambiar y sólo el signo puede cambiar. Todo esto se satisface con un determinante ya que cambiando dos electrones es equivalente a intercambiar dos columnas en un determinante, lo que da por resultado un cambio de signo (Young, 2001; Jensen, 2007; Lewars, 2011).

Los pasos a seguir en el cálculo de Hartree-Fock comienzan con una estimación inicial de los coeficientes de los orbitales, usualmente usando métodos semiempíricos. Esta función es utilizada para calcular la energía y un nuevo conjunto de coeficientes de orbitales, que pueden después ser usados para generar un nuevo conjunto y así, sucesivamente. Este procedimiento continúa reiterativo hasta que la energía y el coeficiente de un orbital permanecen constantes de una repetición a la siguiente. Este proceso es llamado tener la convergencia de cálculo, llamado también como procedimiento de campo autoconsistente (SCF por sus siglas en inglés). Asimismo, existen varias técnicas asociadas a la aproximación de Hartree-Fock (Young, 2001; Cramer, 2004; Jensen, 2007).

4. **Modelado molecular.** Al principio se le denominó modelado molecular a la aplicación de la mecánica molecular para la determinación estructural; sin embargo, ahora se incluyen métodos de química cuántica también y se define por el uso de técnicas gráficas para representar una estructura compleja y el comportamiento de moléculas en un sistema. Debido a la complejidad de los sistemas biológicos, el modelado molecular muchas veces puede ser complicado; este puede dividirse en dos categorías generales: interacciones específicas y generales. Por ejemplo, para el diseño de un nuevo fármaco o un pesticida se necesitan elucidar las reacciones biológicas específicas mediante la interacción del compuesto con la biomolécula de interés, la cual en algunos casos puede ser desconocida. Y por el lado contrario se encuentra la necesidad de predecir interacciones generales, debido a una variedad de procesos, algunas de estas interacciones generales pueden ser la biodegradación y toxicidad (Young, 2001; Nicolás, *et al*, 2006).

Dada la gran cantidad de moléculas biológicas relevantes, la mecánica molecular es el método preferido para realizar el modelado bioquímico. Un sinnúmero de compuestos han sido descubiertos, tanto por métodos computacionales, como por técnicas de laboratorio; el modelado molecular ayuda a refinar las estructuras moleculares para mostrar una mayor actividad como fármaco y menores efectos secundarios. Los procesos de refinamiento de las moléculas se conocen como las técnicas QSAR por sus siglas en inglés (relación cuantitativa estructura–actividad) (Young, 2001; Nicolás, *et al*, 2006; Jensen, 2007).

Al trabajar con sistemas complejos uno de los problemas es la optimización del mismo, es decir obtener los resultados más certeros en lugar de varias posibles combinaciones que pueden enmascarar el resultado exacto; un ejemplo es obtener la mejor alineación de dos moléculas una con respecto a la otra, comúnmente tratando de ajustar una pequeña molécula dentro de una proteína de estructura más larga, proceso conocido como *docking* molecular o señalización molecular. Debido a que muchas de las drogas o fármacos actúan inhibiendo enzimas específicas, la señalización molecular se ha vuelto un elemento importante en el diseño de drogas y guiar la optimización (Cramer, 2004; Jensen, 2007).

El principal problema de la señalización de ligandos en un sitio activo generado por la eliminación de un ligando existente de una estructura cristalográfica de rayos x es que el espacio dejado tiene, naturalmente, un gran parecido al compuesto extraído, lo que en algunos casos puede dar resultados erróneos durante el acoplamiento de las moléculas, ya que podrá mostrar una tendencia a encontrar compuestos que solo difieran ligeramente del inhibidor ya conocido. Debido a estos problemas se siguen investigando métodos para lograr evitar esta dificultad y llegar a una mejor optimización (Nicolás, *et al*, 2006; Jensen, 2007).

5. **Protomol.** El protomol es la representación idealizada <sup>1</sup> del sitio activo, usada tradicionalmente por el Surflex-Dock de SYBYL. El protomol elucida las interacciones potenciales con el sitio activo, permitiendo una señalización (*docking*) rápida de los ligandos en una representación simple del sitio activo. La generación del protomol permite analizar posibles poses de las moléculas o fragmentos moleculares. Estas posturas se califican utilizando la función de puntuación de Hammerhead, que también sirve como una función objetivo para la optimización local de las poses. El *docking* se realiza entonces por un procedimiento de sobreposición que combina las poses de las moléculas intactas con el protomol generado (Metwally & Begemann, 2007; Tripos, 2006).

Para la construcción del protomol, Surflex-Dock de SYBYL posee tres métodos: basado en el ligando, basado en los residuos y la detección automática de la cavidad en el sitio activo. Tres sondas mapean el sitio activo y se seleccionan los voxels para posicionar los fragmentos, luego el programa realiza la optimización de las interacciones con la proteína. Los fragmentos con mejor puntuación, es decir, que no son redundantes, se agrupan y dan por resultado el protomol tridimensional (Metwally & Begemann, 2007; Tripos, 2006)

---

<sup>1</sup> La representación idealizada del sitio activo se refiere al espacio donde puede interaccionar el ligando; así como representa un mapa de complementariedad de la cavidad del sitio activo, tomando en cuenta las interacciones hidrofóbicas y lipofóbicas del sitio.



## V. ANTECEDENTES

Desde 2005 que se dio a conocer la mutación V617F de la proteína JAK2 como agente causal de neoplasias mieloproliferativas surgió la oportunidad de desarrollar terapias que tuvieran blancos moleculares, con el fin de lograr la inhibición de la enzima causante de mantener la vía JAK-STAT sobre activada; lo cual proporcionaría un tratamiento altamente efectivo para los pacientes con dichas enfermedades. Esto dio por resultado el desarrollo de diversos inhibidores específicos de la actividad quinasa de JAK2 por distintos grupos de investigación. Los primeros cuatro compuestos estudiados con actividad inhibitoria de la proteína JAK2 fueron ruxolitinib, TG101348, lestaurtinib y XL019; sin embargo, debido a niveles de toxicidad inaceptable este último fue descartado. Mientras que lestaurtinib (CEP-701) y TG101348 también conocido bajo el nombre de SAR302503 continúan en estudios clínicos con altas expectativas sobre su eficacia (Quintás-Cardama, *et al*, 2011).

Uno de los estudios más recientes realizados con respecto a estudios computacionales de los fármacos que tienen como blanco terapéutico la inhibición de la proteína JAK2, fue el elaborado por Chekkara y su equipo a principios de este año en el *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. El estudio tiene por objetivo describir el modo de acción y las interacciones de los puentes de hidrógeno de varios derivados de fenilaminopirimidina y pirazolilaminopirimidina. Se seleccionaron estos compuestos ya que representan a TG101348 y AZD-1480, dos de los compuestos que continúan bajo estudios clínicos para su aprobación como medicamentos contra las neoplasias mieloproliferativas. Para realizar el acoplamiento o '*docking*' colectaron 55 derivados de los compuestos antes mencionados, de diversas literaturas que presentaban actividad inhibitoria de la proteína, las moléculas se bosquejaron usando el programa ISIS Draw y se realizaron las preparaciones pertinentes para el análisis en LigPrep obteniendo así estructuras en 3D. Finalmente para el '*docking*' se utilizó el programa Glide 5.5.

Los resultados obtenidos muestran un buen acoplamiento y afinidad entre las moléculas y la proteína JAK2, indicando que la presencia de los mismos lograría la inhibición de la actividad de la misma. Asimismo, demuestra que los aminoácidos Leu932, Asp939, Asp994, Glu930 y Leu855 del sitio catalítico juegan un rol importante en las interacciones de puentes de hidrógeno y las interacciones hidrofóbicas para que se de la unión exitosa de las moléculas con la proteína. Este estudio genera nueva información útil para el desarrollo de inhibidores con mayor eficacia y especificidad; asimismo, dan una pauta de que los fármacos que todavía se encuentran en fase de estudios clínicos generaran una buena respuesta en los pacientes (Chekkara *et al*, 2014).

Otro artículo publicado este año como carta al editor por Zhou y su equipo en *Journal Leukemia*, se centra en el mecanismo de acción y la especificidad de los inhibidores ruxolitinib y SAR302503 (T101348) de la tirosina quinasa JAK2. En el cual buscaban elucidar el mecanismo de unión de ambos compuestos a la enzima y si estos eran capaces de inhibir otras quinasas de acuerdo a su especificidad por su blanco terapéutico, esto se llevó a cabo mediante simulaciones dinámicas moleculares empleando el programa

GROMACS. Para el estudio se utilizaron 368 quinasas humanas recombinantes, abarcando aproximadamente un 60% del quinoma humano. En ambos casos se observó que el inhibidor se unía al sitio de unión de ATP en su conformación activa, mostrando que el sistema de anillo doble presente en ruxolitinib es importante en la unión e inhibición de la enzima, por sus interacciones de hidrógeno en las regiones que conectan el lóbulo N al lóbulo C del dominio quinasa. Mientras que SAR302503 posee diferentes interacciones de acuerdo a la configuración que adopte la molécula con sus múltiples anillos.

En 2013, el estudio realizado por el equipo de Wan *et al* sobre modelado computacional y la evaluación experimental del complejo quinasa-pseudoquinasa de JAK2, se centró en analizar las interacciones proteína-proteína con el fin de estudiar de qué manera afectan las mutaciones en el dominio JH2 de la proteína JAK2 en el desarrollo de las neoplasias mieloproliferativas. El complejo generado mediante una guía informática y un método de acoplamiento proteína-proteína con simulación dinámica molecular logró construir y refinar el complejo JAK2 JH1-JH2. Para llevar a cabo dicha investigación se trabajó sobre la hipótesis de que la interface del complejo JH1-JH2 conecta los sitios alostéricos de JH1 y JH2 regulándolos.

Se modelaron cuatro estructuras del complejo de acuerdo a los modelos de las estructuras de otras proteínas similares. Para identificar los sitios alostéricos se utilizó el programa MutInf con lo cual se generaron las cuatro estructuras modeladas del complejo. Asimismo, se realizó el mismo procedimiento para analizar el complejo formado con la forma mutada V617F de la proteína. El estudio demostró que la formación del complejo JH1-JH2 es algo determinante en la actividad de la proteína JAK2 y que al analizarlo se debe considerar siempre la forma activa del dominio JH2 y no su forma inactiva como se había hecho en estudios anteriores, demostrando también que dos de los aminoácidos más importantes en la estabilización de dicho complejo son V706 y L707 de JH2, por lo que la mutación en V617 afecta directamente esta estabilización. Fue importante el uso de herramientas computacionales para dicho estudio, debido a que a pesar de los múltiples esfuerzos que se han realizado en el campo de la enzimología y de las técnicas avanzadas disponibles actualmente, no se ha logrado obtener una estructura cristalográfica del complejo JAK2 JH1-JH2 hasta la fecha (Wan *et al*, 2013).

Respecto a estudios de comparación de proteínas ha de destacar el realizado por Weisner y su equipo en 2007, respecto a las similitudes y diferencias estructurales de las acetilcolinesterasas. Debido a que muchas veces se utilizan estas enzimas como blancos moleculares contra plagas, el estudio se basó en elucidar las diferencias y similitudes estructurales entre las acetilcolinesterasas de cuatro distintas especies, entre ellas el humano, mediante alineamiento de secuencias y la construcción de un árbol filogenético. Para llevar a cabo la investigación utilizaron los programas Clustal W y Clustal X. Los resultados obtenidos mostraron que la estructura tridimensional de las acetilcolinesterasas se encuentra evolutivamente conservada, con muy pocas variaciones en la secuencia de aminoácidos. El plegamiento de las proteínas es bastante similar entre especies, así como las propiedades del sitio activo, lo que dificulta el desarrollo de nuevos plaguicidas

utilizando estas proteínas como dianas, ya que puede provocar la intoxicación de otras especies que se expongan a los mismos

Es importante hacer énfasis en el poco estudio que se ha llevado a cabo en el área de la química computacional en este tema, lo cual puede deberse a que es un descubrimiento relativamente nuevo todavía y se ha dado mayor importancia al estudio y desarrollo de nuevos fármacos de terapia molecular, que en el estudio *in silico* de las interacciones de los mismos con las proteínas. Asimismo, de los estudios mencionados debe destacarse que únicamente el realizado por Wan y su equipo toma en cuenta el papel de la forma mutada V617F, mientras que los otros dos solo se centra en la forma nativa de la proteína y solamente mencionan la existencia de otras mutaciones de la misma, por lo cual un estudio con esta mutación es necesario realizar con más profundidad.

Finalmente, en Guatemala se han realizado muy pocos estudios de química computacional, de los cuales únicamente se pueden mencionar los realizados por parte de la Dirección General de Investigación (DIGI) de la Universidad de San Carlos de Guatemala; entre los que se encuentran estudios para la síntesis de fármacos dirigidos contra el alzheimer y el diseño *in silico* de una secuencia peptídica como potencial inmunógeno contra el VIH tipo 1 (Vargas, 2012; Carrascoza & Cobar, 2010; Carrascoza & Vargas, 2010; Carrascoza, 2009). Este es un campo que empieza a conocerse y expandirse en el país, por lo que todo estudio que se realice planteará un nuevo avance en el campo, generando nuevos conocimientos y experiencias para aportar a futuros estudiantes y profesionales en el ámbito de la química computacional.

## VI. METODOLOGÍA

### A. Materiales

#### 1. Recursos Humanos.

- a. Autora: Andrea Licette Yat  
Estudiante de Bioquímica y Microbiología.
- b. Asesor: Lic. Rodrigo Vargas  
Químico Farmacéutico.
- c. Director: MSc. Lucía Nitsch  
Directora del Departamento de Bioquímica y Microbiología de la Universidad del Valle de Guatemala. Licenciada en Bioquímica de la Universidad del Valle de Guatemala.

#### 2. Contexto de la investigación

Computacional.

#### 3. Tipo y tamaño de muestra

Aleatorio simple. Se asignaran 110 individuos a la población. De estos se seleccionarán los mejores individuos (candidatos), es decir, los mejores ligando-receptor para la señalización, tanto para la forma nativa como para la forma mutada V617F.

#### 4. Criterios de inclusión y exclusión

Se incluirán únicamente las proteínas pertenecientes a la familia Janus Quinasa (JAK), concretamente la proteína Janus Quinasa 2 (JAK2) (PDB: 4FVQ) y su forma mutada predominante V617F (PDB: 4FVR).

### B. Métodos

#### 1. Instrumento de medición.

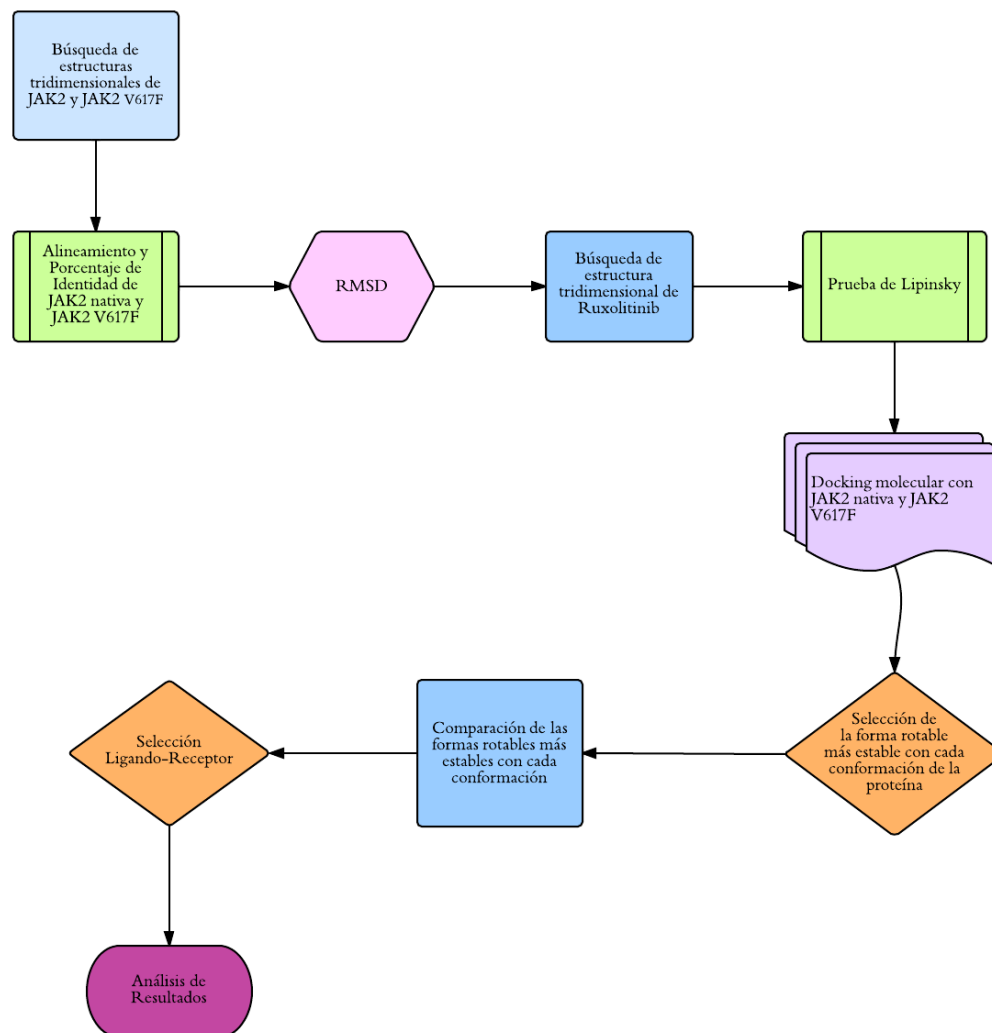
Cálculos computacionales utilizando los siguientes programas:

SYBYL de tripos versión 10.10.0 – Algoritmo Protomol se empleó la licencia perpetua otorgada por la Universidad de San Carlos de Guatemala, de la Unidad de Química Computacional, autorizada para realizar el presente trabajo.

UCSF Chimera 1.9 de libre acceso.

2. **Procedimiento.** A continuación se muestra un diagrama de flujo del procedimiento de la investigación y el acceso a la información, detallando cada paso en las secciones correspondientes.

Figura 16. Diagrama de flujo del procedimiento



a. **Alineamiento y porcentaje de identidad de JAK2 nativa y JAK2 V617F.** Las estructuras moleculares utilizadas serán obtenidas de Protein DataBank (PDB) a partir de la publicación de Bandaranayake y colaboradores. Las estructuras cristalográficas fueron obtenidas a partir de rayos X. Con el programa UCSF Chimera 1.9 se realizará la alineación de las proteínas correspondientes, previamente con la remoción de cualquier átomo que no sea propio de la proteína. Una vez realizado el alineamiento se obtendrá el porcentaje de identidad.

b. **RMSD.** Desviación media cuadrática – RMSD por sus siglas en inglés. Se utilizará la opción “Volume Data” del programa UCSF Chimera 1.9 para obtener los datos estadísticos de la

alineación. Este valor es importante ya que denota la distancia promedio entre los átomos de las proteínas que se están comparando. El parámetro estándar es menor a 1, ya que entre más cercano a 0 sea el valor reflejará menor distanciamiento entre los átomos, por lo tanto, mayor similitud de la estructura tridimensional.

c. Análisis de ligando. Se obtendrán los resultados de la prueba de Lipinsky de la página Drug Data Base, PubChem y ChEMBL y se analizarán, según los parámetros de la prueba con el objetivo de determinar si el medicamento cumple con los aspectos analizados por la regla. Los aspectos a analizar son:

- Número de enlaces de puentes de hidrógeno donadores
- Número de enlaces de puentes de hidrógeno aceptores
- Masa molecular del compuesto
- Lipoficidad, definida por el coeficiente de partición etanol/agua.

d. Docking. Se utilizará el programa computacional UCSF Chimera para eliminar los residuos de agua y las moléculas de  $Mg^{2+}$  y ATP contenidas en las proteínas obtenidas de Protein Data Bank en estructuras de cristalografía de rayos X.

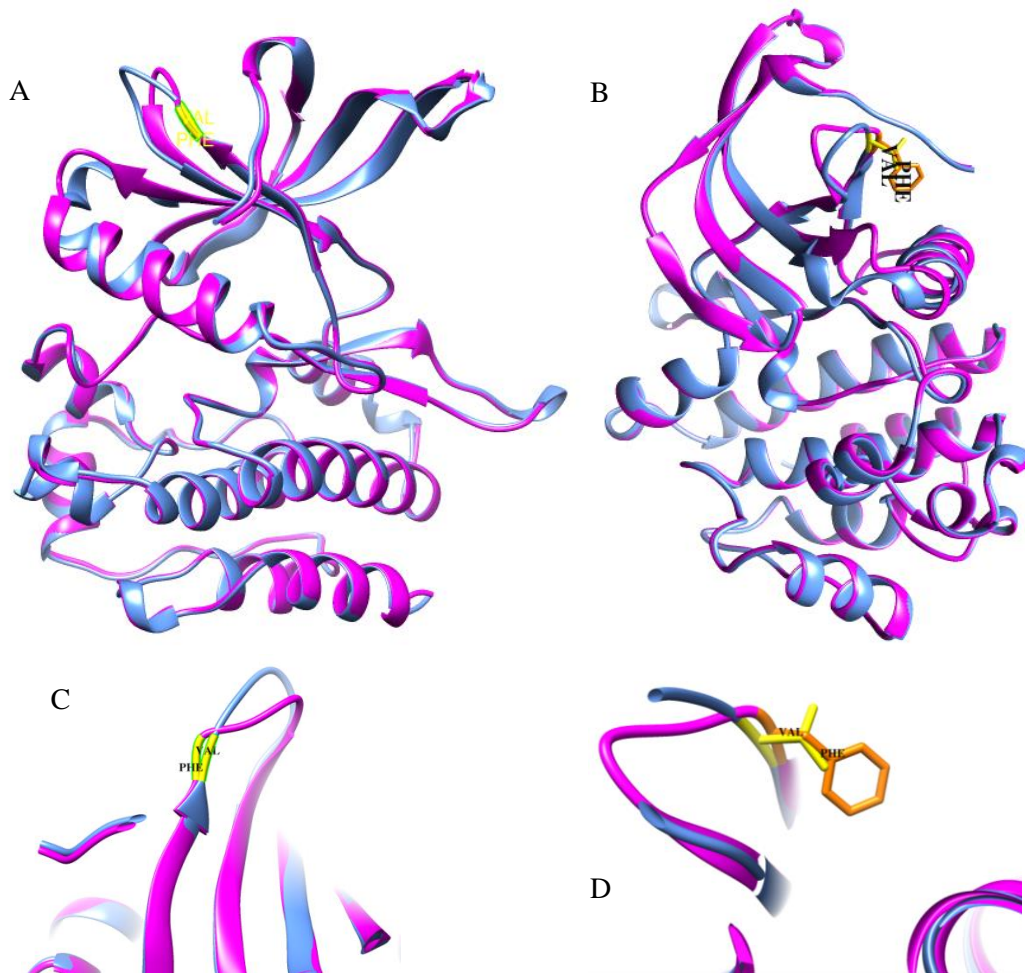
Para el proceso de señalización molecular (*docking*) ligando-receptor, primero se realizó una revisión bibliográfica extensiva del metabolismo del fármaco, para determinar si éste llegaba intacto o se generaban diversos metabolitos activos. Asimismo, se realizó la búsqueda de los distintos confórmeros del compuesto activo, se evaluarán los 110 confórmeros de Ruxolitinib® obtenidos, según el orden de las estructuras obtenidas de la página de PubChem, se corrieron en dos grupos de 35 individuos (candidatos) y uno de 40. Se seleccionarán los individuos con mejores enlaces ligando-receptor, basándose en la energía de enlace calculada por el algoritmo genérico. Se realizará el mismo proceso para la conformación nativa de la proteína JAK2, como para su forma mutada predominante JAK2 V617F.

Se utilizará Surflex-Dock de SYBYL para crear un *docking* entre JAK2 y los individuos seleccionados previamente; así como entre JAK2 V617F y los mismos individuos seleccionados anteriormente, con el objeto de evaluar si ambas secuencias pueden formar un complejo estable.

## VII. RESULTADOS

Para realizar la comparación de la señalización molecular del fármaco Ruxolitinib® con la proteína nativa y la forma mutada V617F de JAK2, primero se llevó a cabo el alineamiento de las proteínas, con el fin de obtener el porcentaje de identidad, para evaluar qué tanto se modificaba la estructura con la mutación descrita anteriormente. Para el alineamiento únicamente se utilizó el dominio JH2 de JAK2, tanto nativa como mutada, ya que éste es el dominio de interés en el estudio, porque es donde se une tanto el ligando (ATP), como el fármaco de interés.

Gráfica 1. Alineamiento en 3D de los dominios pseudoquinasa JH2 de JAK2 nativa y JAK2 V617F.



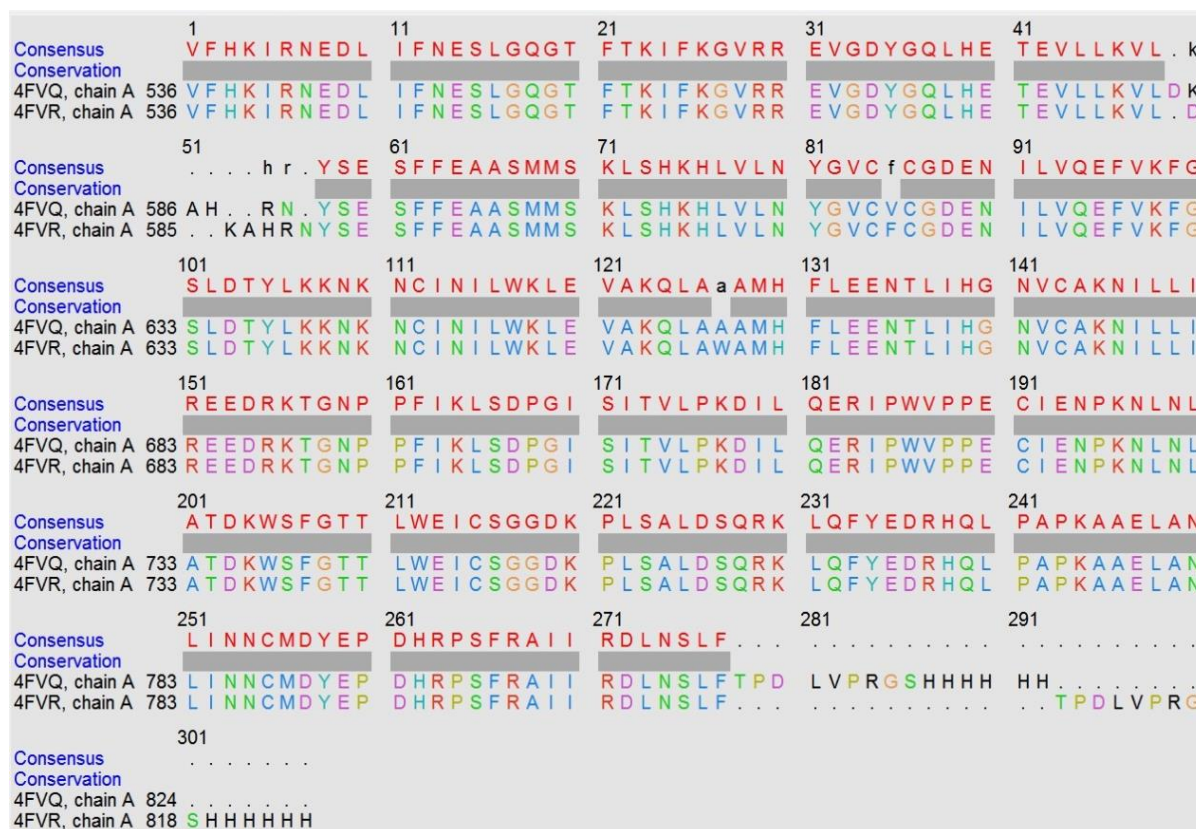
En la gráfica 1 se puede observar el alineamiento de ambas proteínas, en color celeste se observa la proteína JAK2 nativa y en color magenta la forma mutada JAK2 V617F. En las gráficas 1A y 1C se encuentran resaltados los residuos en la posición 617 en amarillo, en ambas proteínas. Como se observa en la gráfica 1B y 1D en la forma nativa este residuo corresponde a una valina y en la forma mutada a una fenilalanina; respectivamente. Las gráficas fueron generadas utilizando el programa Chimeia UCSF 1.9.

Cuadro 1. Resultados del alineamiento de JAK2 nativa y JAK2 V617F.

Porcentaje de Identidad	RMSD
92.04%	0.474Å

En el cuadro 1 se puede observar el porcentaje de identidad, que fue bastante alto entre ambos dominios JH2 de ambas proteínas, tanto nativa como mutada; siendo el RMSD bastante bajo, debido a la alta similitud entre ambas. Ambos datos se obtuvieron mediante el programa Chimera UCSF 1.9.

Figura 17. Alineamiento de secuencias de los dominios pseudoquinasa JH2 de JAK2 nativa y JAK2 V617F.



En la figura 17 se puede observar el alineamiento de las secuencias de ambas proteínas y señalada con una flecha roja el sitio de mutación. La primera secuencia (4FVQ) corresponde a la forma nativa de la proteína; mientras que la secuencia inferior (4FVR) corresponde a la forma mutada V617F, por lo que en el residuo indicado esta presenta una F en lugar de la V. Asimismo, en la secuencia consenso se denota la mutación mediante la indicación de la “f”, indicando el cambio de aminoácido. Datos obtenidos utilizando el programa Chimera UCSF 1.9.

Para obtener las propiedades farmacofóricas consideradas en la regla de Lipinski de Ruxolitinib® se consultaron las bases Drug Bank y PubChem, y se obtuvieron los siguientes resultados:

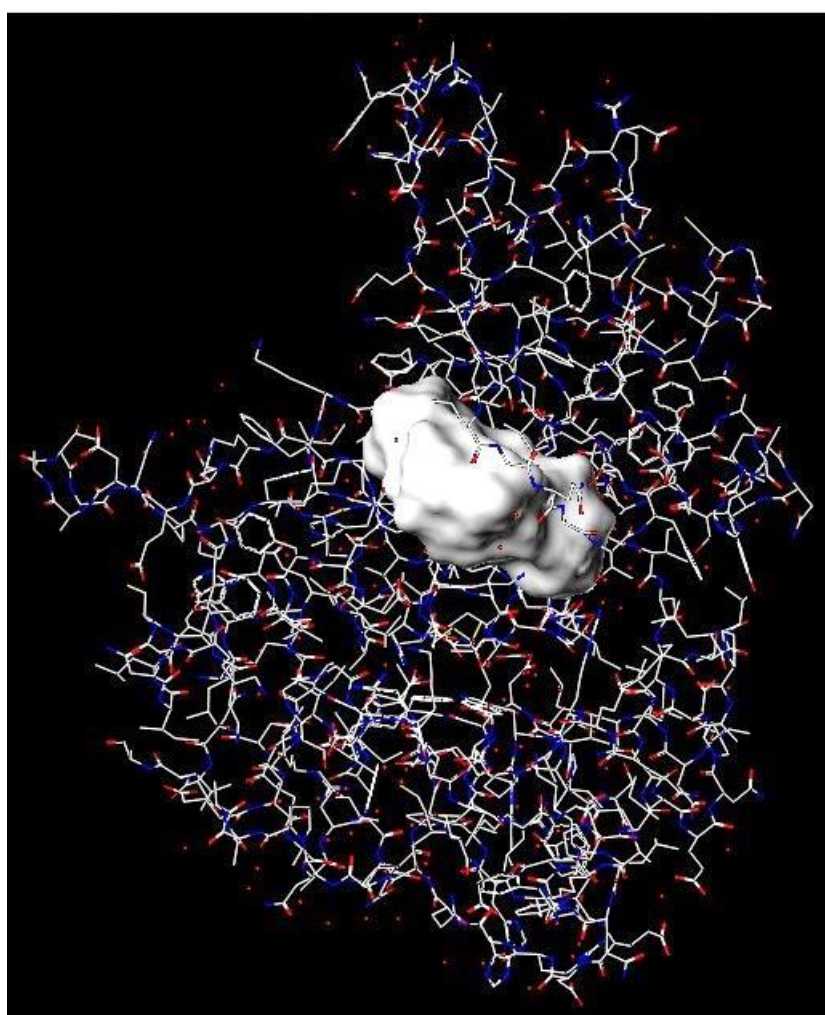


Cuadro 2. Valores de Lipinski del fármaco Ruxolitinib®.

Peso Molecular	Número de puentes de Hidrógeno donadores	Número de puentes de Hidrógeno aceptores	Log P
306.4Da	1	4	2.94

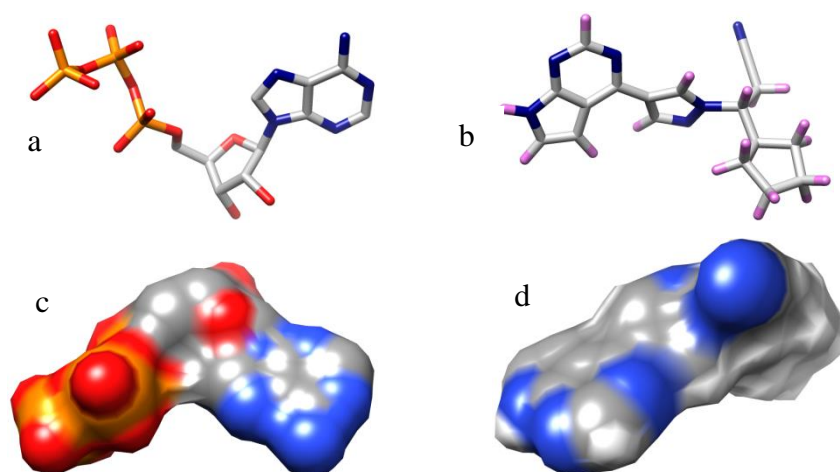
Luego de haber obtenido el alineamiento en 3D y de las secuencias del dominio JH2 de las proteínas, se realizó el *docking* del fármaco Ruxolitinib® en Surfex Dock de SYBYL1.1, se obtuvo primero el protomol que define las regiones más favorables para los donadores/aceptores de hidrógenos y las interacciones hidrofóbicas en el sitio activo.

Gráfica 2. Generación del protomol en dominio JH2 de JAK2.



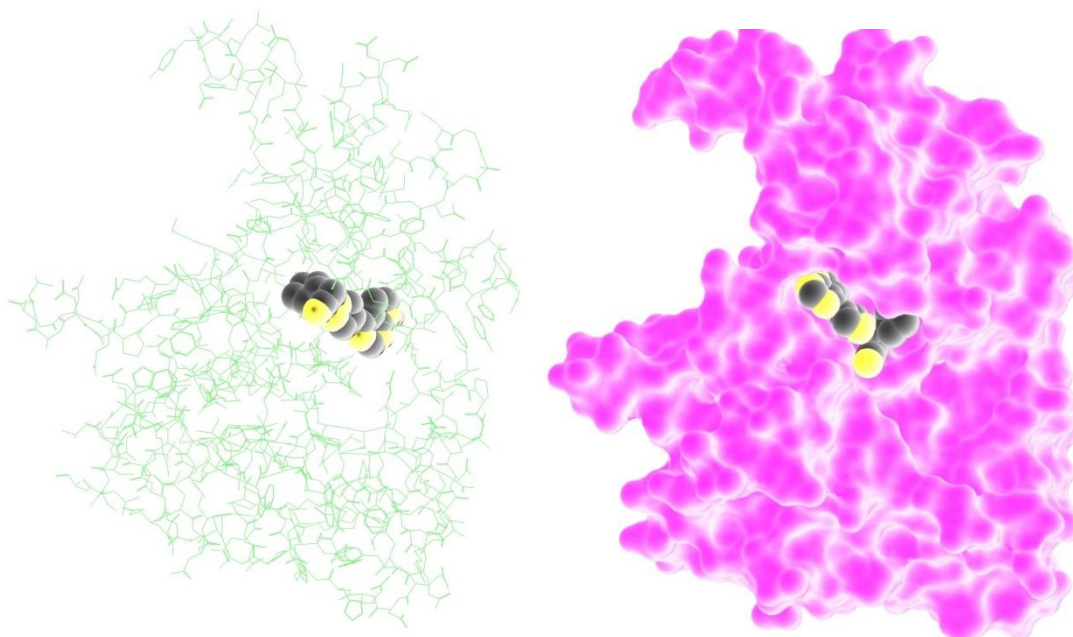
En la gráfica 2 se observa el protomol en el sitio activo del dominio JH2 de la forma nativa de JAK2, en color gris, se muestra que parte de este queda salido del dominio. El protomol indica el sitio donde debería unirse el fármaco de interés en la proteína.

Gráfica 3. Comparación de modelos de ATP –sustrato natural– y del fármaco Ruxolitinib®.



En la gráfica 3 se observan los modelos de ATP y el fármaco Ruxolitinib® en representación de esqueleto tridimensional (a y b) y el diagrama de superficie (c y d), respectivamente. Los átomos de carbono se encuentran en color gris, el color azul corresponde a los átomos de nitrógeno, en rojo los átomos de oxígeno, en mostaza los átomos de fósforo y en lila los átomos de hidrógeno. Ambas estructuras cuentan con un biciclo, seguido de un ciclopentano; sin embargo, están sustituidos de manera totalmente diferente, además de que el biciclo no se corresponde. De igual manera en el fármaco se puede ver que cuenta con un ciclopentano más al final de la cadena, completamente sustituido.

Gráfica 4. *Docking* del dominio JH2 de JAK2.



En la gráfica 4 se observa la evaluación general del *docking* realizado con el dominio JH2 de JAK2 nativa, se puede observar que el fármaco se posiciona en la cavidad del sitio activo, de igual manera que el protomol, gráfica 2.

Cuadro 3. Evaluación del *docking* Ruxolitinib® – JH2 de JAK2.

	<b>Evaluación Total</b>	<b>Choque</b>	<b>Polar</b>	<b>Estérico</b>	<b>Total</b>
Ruxolitinib	3.5578	-0.3677	2.5602	0.1508	3.407

Cuadro 4. Aspectos evaluados en el *docking* ligando-receptor.

<b>Evaluación Total</b>	Sumatoria total del compuesto
<b>Choque</b>	Penalización del compuesto por interacciones inapropiadas enzima-ligando
<b>Polar</b>	Ésta evaluación considera el acoplamiento de la polaridad entre la enzima y el ligando
<b>Estérico</b>	Esta evaluación pondera el encaje del ligando con respecto al impedimento estérico presente en el sitio activo
<b>Total</b>	Conversión de la evaluación total a un punteo en escala

En el cuadro 3 se observa la evaluación general del *docking* entre el fármaco y el dominio JH2 de la forma nativa de JAK2.

Cuadro 5. Evaluación química del *docking* Ruxolitinib® – JH2 de JAK2.

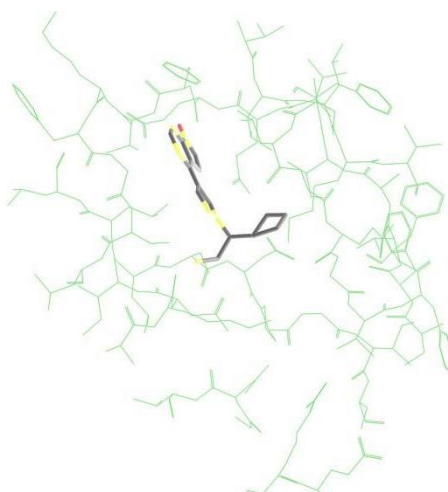
	<b>D Score</b>	<b>PMF Score</b>	<b>G Score</b>	<b>CHEM Score</b>	<b>C Score</b>	<b>Global Score</b>
Ruxolitinib	-2565.535	-24.8805	-149.3261	-20.5498	5	5

Cuadro 6. Aspectos químicos evaluados en el *docking* ligando-receptor.

<b>D Score</b>	Interacciones de carga entre fuerzas de van de Waals y el ligando
<b>PMF Score</b>	Energías libres de Helmholtz para interacciones proteína-ligando
<b>G Score</b>	Evaluación de las energías de puentes de hidrógeno proteína-ligando y energías internas proteína-ligando
<b>CHEM Score</b>	Evaluaciones para interacciones de puentes de hidrógeno, contacto lipofílico y entropía rotacional del complejo
<b>Global Score</b>	Conversión de la evaluación total a un punteo en escala

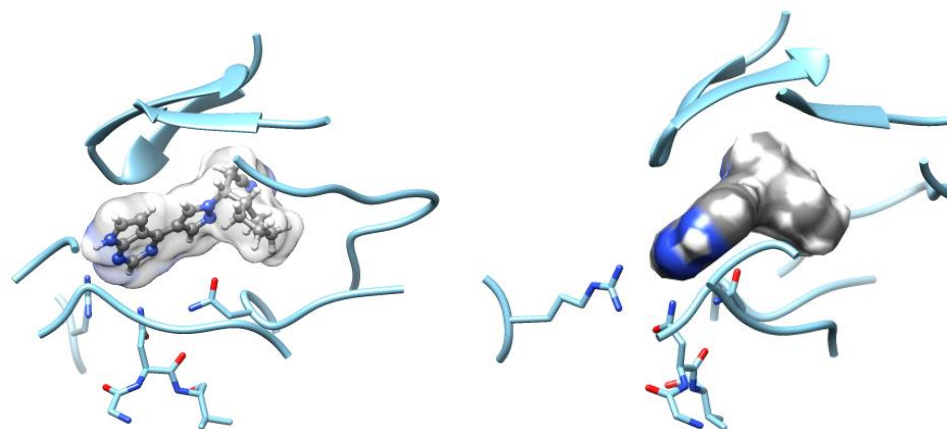
En el cuadro 5 se observa la evaluación química del *docking* entre el fármaco y el dominio JH2 de la forma nativa de JAK2.

Gráfica 5. Evaluación del sitio activo – docking del dominio JH2 de JAK2.

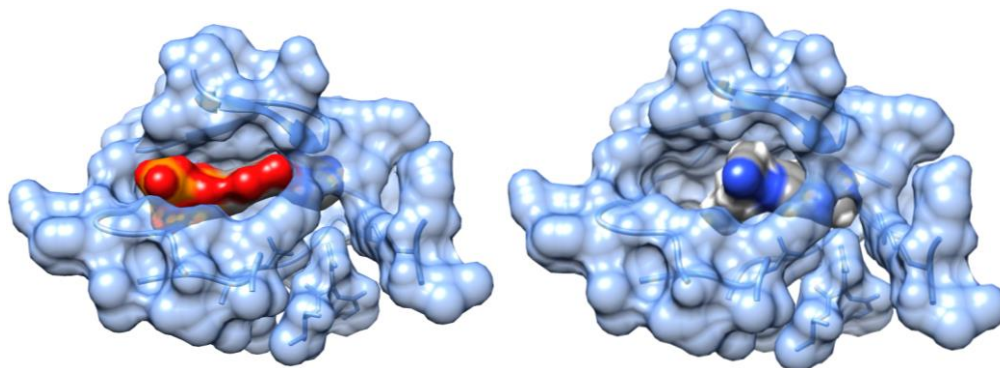


En la gráfica 5 se observa únicamente el sitio activo y cómo encaja el fármaco en el mismo, en la forma nativa del dominio JH2 de la proteína JAK2.

Gráfica 6. Evaluación del sitio activo del *docking* del dominio JH2 de JAK2.



En la gráfica 6 se observan dos vistas de distintos ángulos (rotación de 180°) del sitio activo del dominio JH2 de la forma nativa de JAK2 y la interacción con el fármaco. Los motivos para las hojas  $\beta$  están definidos como flechas. El fármaco se encuentra con código de colores según los átomos: azul para nitrógenos, gris para carbonos y blanco para hidrógenos. Generado mediante el programa Chimera UCSF versión 1.9.

Gráfica 7. Comparación del sitio activo del *docking* del dominio JH2 de JAK2 con Ruxolitinib® y ATP.

En la gráfica 7 se observa la comparación de la señalización del sitio activo del dominio JH2 de JAK2 al interactuar con el ATP (izquierda) que constituye su sustrato natural, y con el fármaco Ruxolitinib® (derecha) dirigido a pacientes con NMP. Se observa que a pesar de que la conformación de la proteína prevalece casi igual en ambos, se nota un ligero cambio en la cavidad señalada (flecha roja) en la que la interacción de dichos residuos difiere al interactuar con ATP y fármaco, respectivamente. Asimismo puede notarse que la posición de ambos sustratos es completamente distinta.

Cuadro 7. Evaluación del *docking* de conformémeros de Ruxolitinib® – JH2 de JAK2.

Confórmero	Evaluación Total	Choque	Polar	Estérico	Total
Ruxolitinib67	5.1499	-0.6412	2.7016	1.9991	3.1507
Ruxolitinib34	5.138	-0.4518	2.5683	0.5957	4.5423
Ruxolitinib101	4.9521	-0.2355	2.5568	3.7338	1.2183
Ruxolitinib46	4.8611	-0.3548	2.6287	0.2655	4.5957

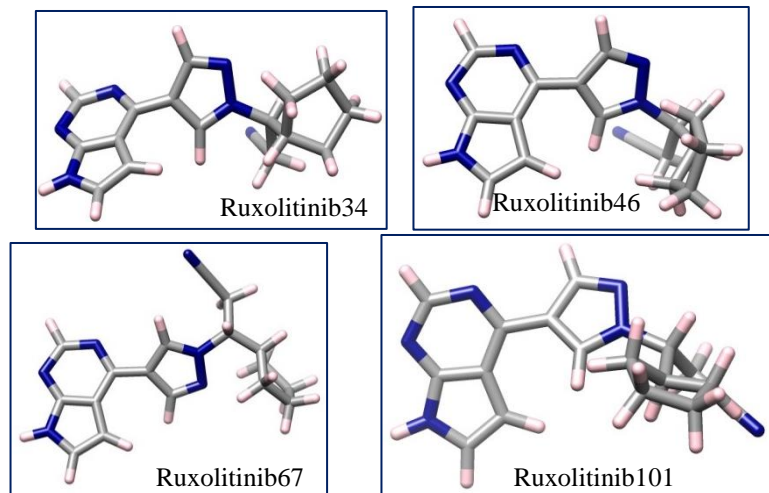
En el cuadro 7 se observa la evaluación general del *docking* entre los conformémeros de mayor evaluación total del fármaco y el dominio JH2 de la forma nativa de JAK2, es decir, los que mejor se acoplaron al sitio activo del dominio evaluado. Los conformémeros se listan de acuerdo al punteo de acoplamiento, de mayor a menor. Los aspectos evaluados se detallan en el cuadro 4. Todos los demás conformémeros evaluados pueden observarse en Anexos 1-3.

Cuadro 8. Evaluación química del *docking* Ruxolitinib® – JH2 de JAK2.

Confórmero	D Score	PMF Score	G Score	CHEM Score	C Score	Global Score
Ruxolitinib67	-2691.7399	-32.7984	-153.9831	-23.606	5	5
Ruxolitinib34	-2780.4231	-26.3243	-158.8897	-23.7003	5	5
Ruxolitinib101	-2879.6325	-46.1381	-142.1304	-23.2313	5	5
Ruxolitinib46	-2708.4943	-32.9375	-157.4559	-23.3028	5	5
<b>Ruxolitinib</b>	<b>-2565.535</b>	<b>-24.8805</b>	<b>-149.3261</b>	<b>-20.5498</b>	5	5

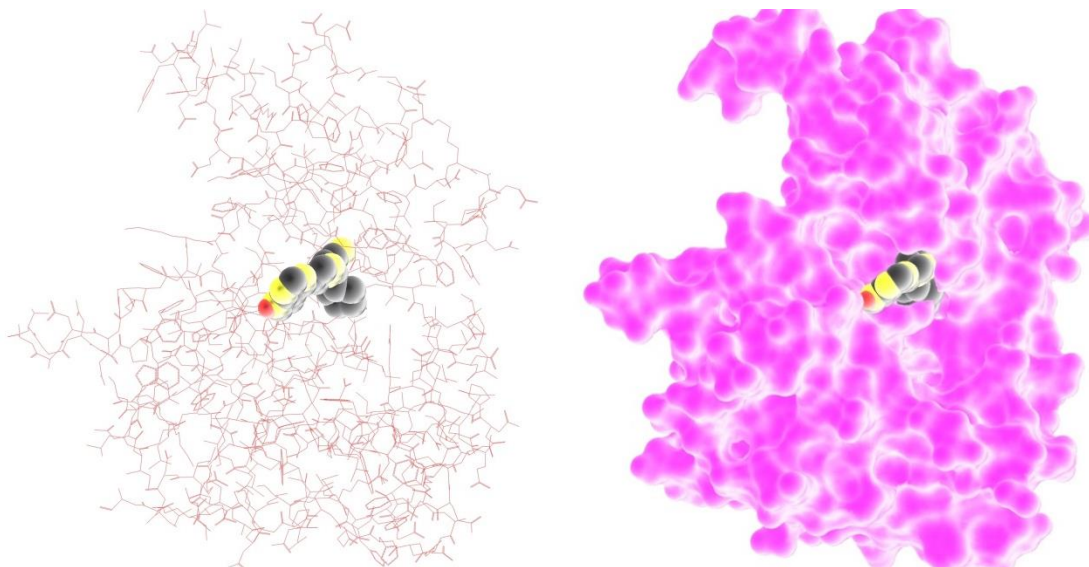
En el cuadro 8 se observa la evaluación química del *docking* entre los conformeros mejor acoplados del fármaco y el dominio JH2 de la forma nativa de JAK2. Los conformeros se listan de acuerdo al puntaje de acoplamiento, de mayor a menor. Los aspectos evaluados se detallan en el cuadro 6. Todos los demás conformeros evaluados pueden observarse en Anexos 1-3.

Gráfica 8. Estructuras químicas de los conformeros seleccionados.



En la gráfica 8 se muestran las representaciones de esqueleto de los 4 conformeros mejor acoplados al sitio activo del dominio JH2 de la forma nativa de JAK2.

Gráfica 9. *Docking* del dominio JH2 de JAK2 V617F.



En la gráfica 9 se observa la señalización del fármaco en el dominio JH2 de JAK2 V617F, puede observarse que la posición del fármaco es ligeramente distinta con respecto al dominio de la forma nativa (gráfica 4); asimismo, la conformación adoptada por la proteína difiere de la forma nativa.

Cuadro 9. Evaluación del *docking* Ruxolitinib® – JH2 de JAK2 V617F.

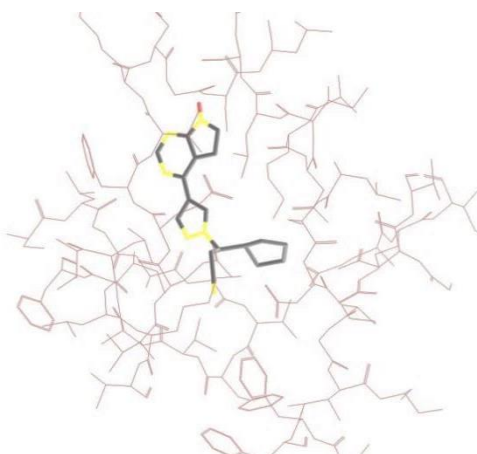
	<b>Evaluación Total</b>	<b>Choque</b>	<b>Polar</b>	<b>Estérico</b>	<b>Total</b>
Ruxolitinib	3.2356	-1.1368	2.5019	3.0872	0.1484

En el cuadro 9 se observa la evaluación general del *docking* entre el fármaco y el dominio JH2 de la forma mutante V617F de JAK2 (ver detalles de los aspectos evaluados en cuadro 4).

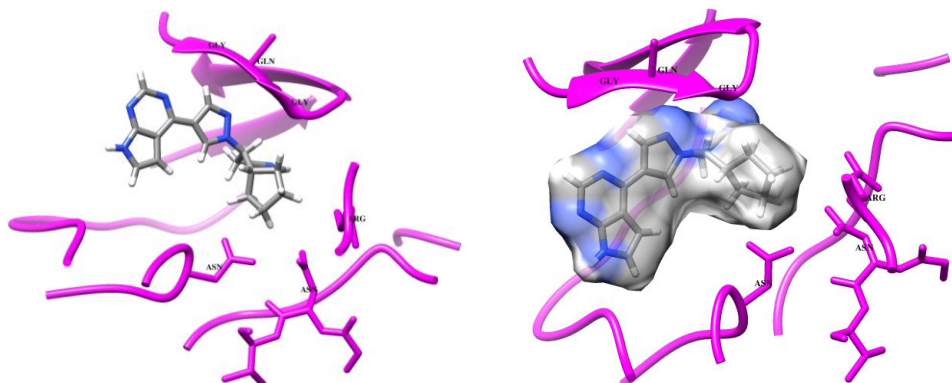
Cuadro 10. Evaluación química del *docking* Ruxolitinib® – JH2 de JAK2 V617F.

	<b>D Score</b>	<b>PMF Score</b>	<b>G Score</b>	<b>CHEM Score</b>	<b>C Score</b>	<b>Global Score</b>
Ruxolitinib	-2380.1692	-1.9440	-113.8201	-16.3419	1	1

En el cuadro 10 se observa la evaluación química del *docking* entre el fármaco y el dominio JH2 de la forma mutante V617F de JAK2 (ver detalles de los aspectos evaluados en cuadro 6).

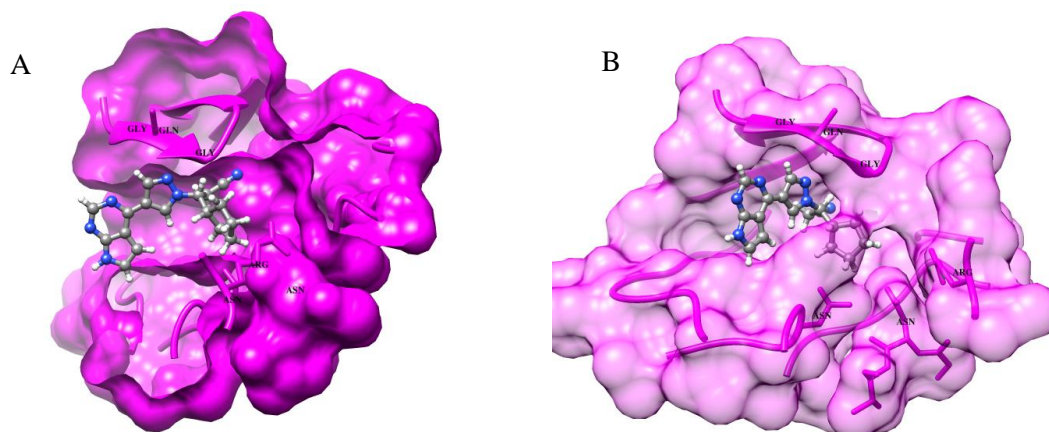
Gráfica 10. Evaluación del sitio activo – *docking* del dominio JH2 de JAK2 V617F.

En la gráfica 10 se observa únicamente la señalización con el sitio activo del dominio de JAK2 V617F, al cual está dirigido el fármaco.

Gráfica 11. Evaluación del sitio activo – *docking* del dominio JH2 de JAK2 V617F.

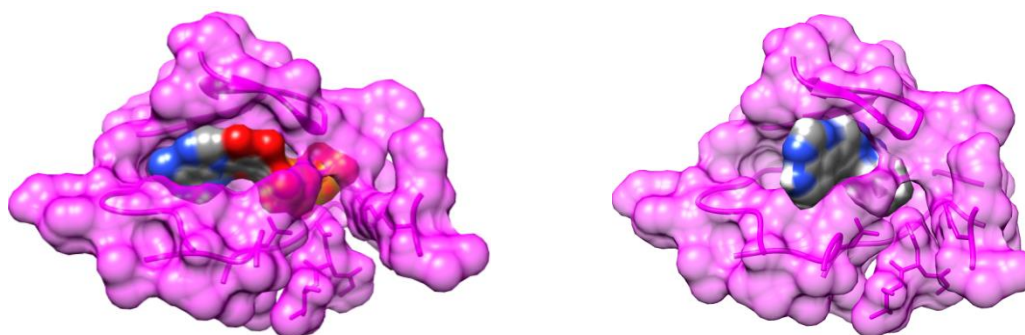
En la gráfica 11 se observan dos vistas de distintos ángulos (rotación de  $\sim 30^\circ$ ) del sitio activo del dominio JH2 de la forma nativa de JAK2 y la interacción con el fármaco.

Gráfica 12. Evaluación en 3D de las interacciones del sitio activo de docking del dominio JH2 de JAK2 V617F con el fármaco Ruxolitinib.



En la gráfica 12 se observa la evaluación tridimensional del *docking* con el sitio activo del dominio JH2 de JAK2 V617F, remarcándose los residuos importantes en dicha interacción y nombrados en ambos diseños. A) Visión lateral del *clipping* o recorte tridimensional del sitio activo en interacción con el fármaco, pueden observarse los motivos de los residuos que alteran su orientación durante esta interacción, los cuales se hallan nombrados en negro. B) Evaluación frontal de la interacción receptor-ligando, donde pueden observarse los motivos de la proteína, con los residuos importantes nombrados.

Gráfica 13. Comparación del sitio activo del *docking* del dominio JH2 de JAK2 V617F con Ruxolitinib® y ATP.



En la gráfica 13 se observa la comparación de la señalización del sitio activo del dominio JH2 de JAK2 V617F al interactuar con el ATP (izquierda) que constituye su sustrato natural, y con el fármaco Ruxolitinib® (derecha) dirigido a pacientes con NMP. Se puede notar que la conformación de la proteína cambia significativamente al interactuar con ATP y el fármaco, respectivamente. Asimismo puede notarse que la posición del fármaco en el sitio activo es totalmente diferente a la del ATP, cambiando también la orientación de los motivos adyacentes al mismo.



Cuadro 11. Evaluación del *docking* de conforméros de Ruxolitinib® – JH2 de JAK2 V617F.

Confórmero	Evaluación Total	Choque	Polar	Estérico	Total
Ruxolitinib84	5.2768	-0.5417	2.6103	4.0567	1.2201
Ruxolitinib28	4.9818	-0.4418	2.6568	3.6048	1.3769
Ruxolitinib12	4.9169	-0.2171	2.5031	3.3734	1.5435
Ruxolitinib38	4.8953	-0.5388	2.6751	0.3633	4.532

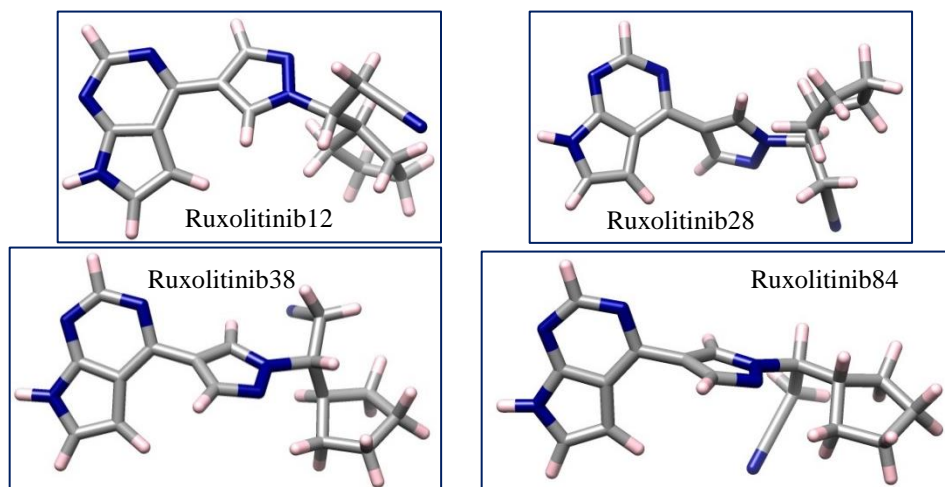
En el cuadro 11 se observa la evaluación general del *docking* entre los conforméros de mayor evaluación total del fármaco y el dominio JH2 de la forma mutante V617F de JAK2, es decir, los que mejor se acoplaron al sitio activo del dominio evaluado. Los conforméros se listan de acuerdo al puntaje de acoplamiento, de mayor a menor. Los aspectos evaluados se detallan en el cuadro 4. Todos los demás conforméros evaluados pueden observarse en Anexos 4-6.

Cuadro 12. Evaluación química del *docking* Ruxolitinib® – JH2 de JAK2 V617F.

Confórmero	D Score	PMF Score	G Score	CHEM Score	C Score	Global Score
Ruxolitinib84	-2552.5817	-29.1048	-156.8949	-22.915	5	5
Ruxolitinib28	-2530.4987	-35.1302	-150.3516	-22.125	5	5
Ruxolitinib12	-2836.4234	-45.30778	-142.0572	-23.2492	5	4
Ruxolitinib38	-2672.2401	-37.9229	-160.6856	-22.9172	5	5

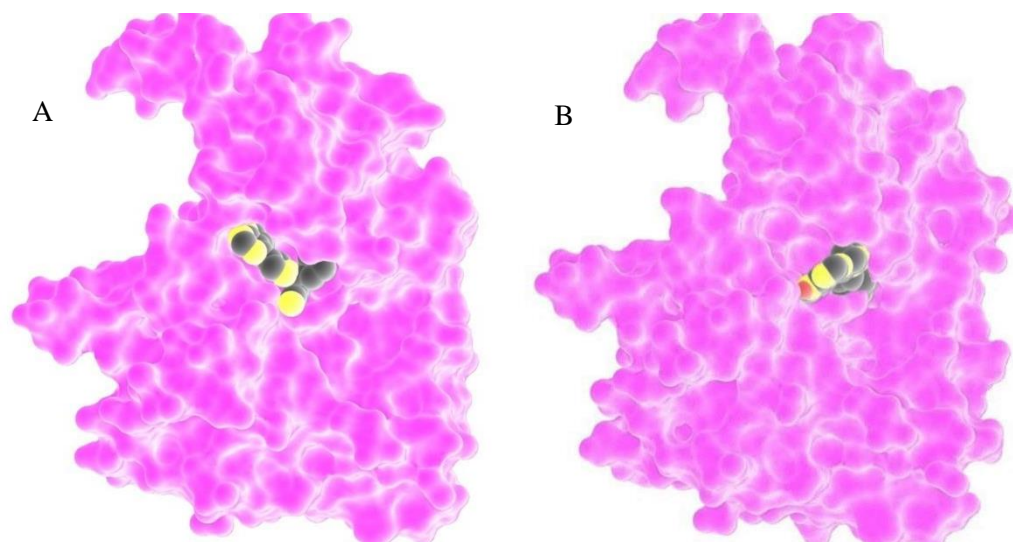
En el cuadro 12 se observa la evaluación química del *docking* entre los conforméros mejor acoplados del fármaco y el dominio JH2 de la forma mutante V617F de JAK2. Los conforméros se listan de acuerdo al puntaje de acoplamiento, de mayor a menor. Los aspectos evaluados se detallan en el cuadro 6. Todos los demás conforméros evaluados pueden observarse en Anexos 4-6.

Gráfica 14. Estructuras químicas de los conforméros seleccionados.



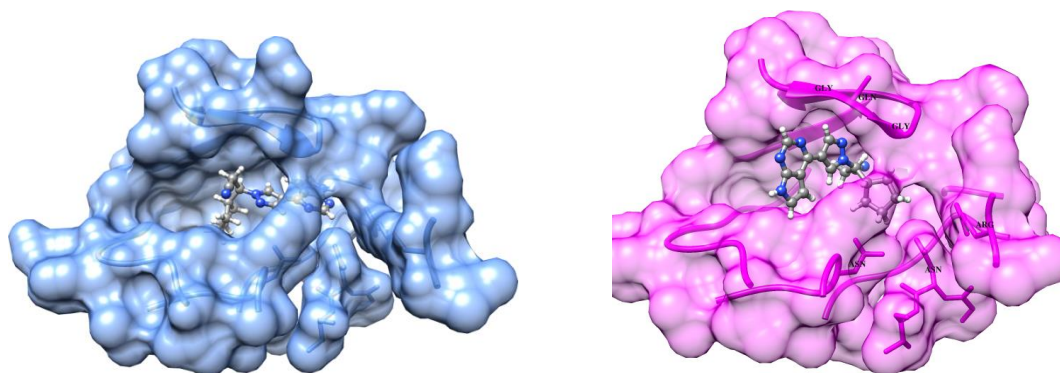
En la gráfica 14 se muestran las representaciones de esqueleto de los 4 conforméros mejor acoplados al sitio activo del dominio JH2 de la forma mutante V617F de JAK2.

Gráfica 15. Comparación del *docking* del dominio JH2 de JAK2 nativa vs JAK2 V617F.



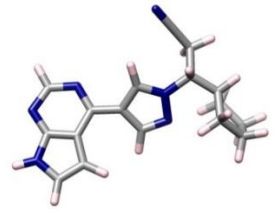
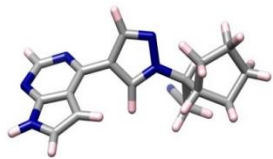




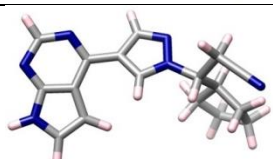
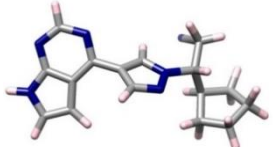
En la gráfica 15 se observa la comparación del *docking* del dominio JH2, tanto de JAK2 nativa (9A), como JAK2 V617F (9B). Se puede notar que a pesar de ser la misma proteína con el mismo fármaco, la conformación varía bastante; así como el posicionamiento del fármaco en el sitio activo.

Gráfica 16. Comparación del sitio activo del docking del dominio JH2 de JAK2 nativa vs JAK2 V617F.



En la gráfica 16 se observa la comparación únicamente del sitio activo de ambas proteínas al interactuar con el fármaco. En azul se observa la forma nativa de JAK2 y en magenta la forma mutada V617F, en esta última, se encuentran señalados los residuos que presentan el mayor cambio de orientación al interactuar con el fármaco, lo cual es evidente en el cambio de orientación de los motivos adyacentes a los mismos.

Cuadro 13. Comparación de la evaluación de *docking* y las estructuras químicas de los confórmeros de Ruxolitinib® – JH2 seleccionados de JAK2 nativa y JAK2 V617F.

	Confórmero	Evaluación Total	Estructura Química
JAK2 Nativa	Ruxolitinib 67	5.1499	
	Ruxolitinib 34	5.138	
	Ruxolitinib 101	4.9521	
	Ruxolitinib 46	4.8611	
JAK2 V617F	Ruxolitinib 84	5.2768	
	Ruxolitinib 28	4.9818	
	Ruxolitinib 12	4.9169	
	Ruxolitinib 38	4.8953	

En el cuadro 13 se observa la comparación entre los confórmeros mejor acoplados del fármaco y el dominio JH2 de la forma nativa y la forma mutante V617F de JAK2. Los confórmeros se listan de acuerdo a las mejores evaluaciones obtenidas en cada caso, con su respectiva estructura química.

## VIII. ANÁLISIS DE RESULTADOS

El análisis estructural entre la forma nativa del dominio JH2 del receptor de membrana JAK2 y la forma mutada predominante V617F del dominio JH2 de JAK2 dio por resultado un porcentaje de identidad de 92.04% y una diferencia de tan solo 0.474Å (cuadro 1); mostrando así gran similitud ambas conformaciones. En la gráfica 1 pueden observarse dichas diferencias entre ambas conformaciones y, aunque es únicamente un aminoácido el que cambia, se nota que altera significativamente los residuos adyacentes, ya que desvía la orientación del motivo adyacente lo cual resulta en un cambio en las interacciones entre los aminoácidos autoreguladores Ser523 y Tyr570. Esta alteración se debe a que la fenilalanina que reemplaza a la valina presenta un impedimento estérico (debido al anillo aromático) que deforma la interacción entre este residuo y la Ser523, la cual se encuentra adyacente a la misma, al modificarse esta interacción se afecta a la Tyr570, que aunque no se encuentra cerca de la fenilalanina, ya no puede realizar la interacción adecuada con la serina, por lo que se inhibe la autoregulación. En la figura 17 se observan la alineación de las secuencias proteicas, donde se comprueba que la forma V617F se correlaciona con una mutación puntual, en el residuo 617.

Se realizó el análisis del medicamento basándose únicamente en la regla de Lipinski de los cinco, se puede observar en el cuadro 2 que el fármaco Ruxolitinib® cumple adecuadamente con la regla, por lo que es apto para la administración vía oral en humanos. En el cuadro se puede ver que de acuerdo a las bases consultadas ellos consideran únicamente 4 puentes de hidrógeno aceptores, aun cuando este criterio se refiere al número total de átomos de nitrógeno y oxígeno en la molécula (ver sección de fármacos en marco teórico), lo cual sería un total de 6 átomos de nitrógeno en la molécula; con lo cual sigue cumpliendo con la regla, ya que es un número inferior a 10. Este hecho puede deberse a que consideran únicamente a los átomos de nitrógeno más accesibles a aceptar puentes de hidrógeno, que serían los tres átomos con doble enlace en los anillos y el nitrógeno del nitrilo, ya que los dos restantes se encuentran totalmente sustituidos y, por lo tanto, sería más difícil que actuaran como aceptores.

En la gráfica 3 puede observarse una comparación de la estructura del fármaco con el ligando natural de la proteína, que en este caso sería una molécula de ATP, la similitud de la cadena, en rasgos generales, es bastante alta, ambos cuentan con un biciclo al inicio de la cadena y otro en el medio. No obstante, al analizarlo detalladamente se pueden observar que están estructurados de manera totalmente diferente. En el caso del ATP el biciclo corresponde a una adenina, purina de la cual deriva su nombre, seguida de una pentosa y tres fosfatos; mientras que Ruxolitinib® posee un biciclo correspondiente a una pirrolpirimidina, seguido de un pirazol y terminando en un ciclopentilpropanitrilo, por lo que cuenta con un ciclo más. Esto hace que el fármaco presente un mayor impedimento estérico que el ligando natural y que, a diferencia del trifosfato, no puede donar un enlace de alta energía para activar la enzima.

Para poder evaluar de qué manera afectan las diferencias estructurales la interacción ligando-receptor, se procedió a realizar una señalización molecular (*docking*) con ambas proteínas. Las estructuras fueron obtenidas de la publicación Bandaranayake y colaboradores, dichas estructuras presentan la desventaja de haberse alcanzado mediante rayos X, por lo que son estructuras estáticas. Se obtuvo el protomol que representa la cavidad de unión al receptor, donde los ligandos serán alineados. Aunque la vista en las gráficas no es la misma (gráfica 2 y 9), puede notarse que la forma del protomol varía al evaluarse el sitio activo de cada proteína. Incluso el posicionamiento del fármaco con respecto al protomol es distinto (gráfica 16), tanto como la forma y orientación de este varían significativamente. Eso denota que la simple sustitución del aminoácido en la posición 617, sí conlleva cambios estructurales significativos para la interacción con el ligando. Es este cambio estructural en la unión al ligando lo que define la efectividad y especificidad del fármaco, a que la interacción que se da con la forma nativa del dominio JH2 de JAK2, es reversible; por lo que, a pesar de no existir ningún tipo de discriminación entre las proteínas nativas y mutantes de JAK2 en términos de actividad inhibitoria (Australian Government), la forma en que se acopla en el sitio activo de la forma nativa de la proteína, no la inhibe totalmente, al ser una unión reversible, por lo que se da una menor actividad inhibitoria. Mientras que, al formar el acoplamiento con la forma mutante del dominio JH2, esta unión es permanente, con lo cual se logra la inhibición completa e irreversible de la misma, por lo que se dice que el medicamento es selectivo a las proteínas con mutación; selectividad que es resultado de la alteración de las interacciones entre los residuos del sitio activo del dominio JH2 de JAK2.

Los resultados obtenidos de la señalización de Ruxolitinib® con la forma nativa del dominio JH2 de JAK2 mediante el programa Surflex-Dock, muestran que el fármaco tuvo una evaluación total baja (cuadro 3). La evaluación de choques es negativa, esto se interpreta como que existe un espacio vacío entre el ligando y la enzima, por lo que los valores cercanos a cero son favorables, como es el caso (cuadro 3). Ese espacio puede comprobarse al observar la gráfica 16a, en la cual se representa el espacio que ocupa el fármaco con respecto al espacio calculado como el protomol. Los valores del encaje polar y la evaluación de impedimento estérico presentan valores adecuados. Luego se evaluaron las propiedades fisicoquímicas del fármaco (cuadro 5), en estas evaluaciones, un mayor número negativo, representa una mejor evaluación. Por lo que se puede observar que la calificación de las interacciones de carga entre fuerzas de van de Waals y el ligando (D Score) es bastante baja, al presentar un punteo de -2565.54. El punteo de la evaluación de la energía libre de Helmholtz de las interacciones enzima ligando, es de -24.9 siendo bastante bajo, este criterio es importante ya que muestra la relación entre la entropía y entalpía. El G score es para determinar si la unión del ligando es favorable con la enzima, Ruxolitinib® ha obtenido una calificación -149.3, que es bastante alta; es decir, es favorable energéticamente dicha unión.

Finalmente, el punteo químico (*Chem score*) toma en consideración la eficiencia del contacto lipofílico del ligando, la entropía rotacional y, si se encontraran metales presentes, la interacción metal ligando, tomando en cuenta también las interacciones de puentes de hidrógeno. Para este aspecto se obtuvo un

punteo aceptable de -20.5. Estas evaluaciones están resumidas en las columnas *C score* y *Global score*, la primera se refiere a un consenso y casi siempre es igual al punteo global. En este caso, como los punteos obtenidos por el fármaco Ruxolitinib® son altos, alcanzó una evaluación sobresaliente de 5 (Cuadro 5).

En las gráficas 5 y 6 puede observarse con mayor detalle la evaluación del *docking* del fármaco en el sitio activo del dominio JH2 de la forma nativa de JAK2. En la gráfica 7 se hace una comparación del acoplamiento del fármaco y del sustrato natural (ATP), en esta se denota que el acoplamiento del fármaco es bastante similar al del ATP; sin embargo, la conformación adoptada por el dominio de la proteína sí varía sutilmente, sobre todo en la cavidad ubicada en la parte inferior izquierda, ya que los residuos adyacentes modifican su orientación. Estos ligeros cambios se deben a que el fármaco no completa el espacio del sitio activo de manera óptima, sobre todo por el impedimento estérico que representa el tercer ciclo de la cadena. Es debido a la forma en que se acopla el fármaco a la enzima que esa unión es reversible, por lo que a pesar de no ser selectivo, en cuanto a la forma nativa y mutada del dominio de la enzima, que permitirá que la enzima continúe trabajando regularmente, en lugar de inhibirla por completo.

De los 110 conformeros evaluados, se seleccionaron únicamente los 4 conformeros con los punteos más altos para cada conformación de la proteína. En el caso de la forma nativa de JAK2 estos conformeros fueron: 67, 34, 101 y 46 (cuadro 7). Los números corresponden al orden dado por la base de PubChem, de donde se obtuvieron. De los cuatro seleccionados los que presentan las mejores puntuaciones son los conformeros 67 y 34; ambos con valoraciones sobresalientes de 5. Sin embargo, debido a la evaluación de los aspectos de choques, *G score* y *Chem score*, se seleccionó al conformero 34 como el que mejor se acopla al sitio activo del dominio JH2 de la forma nativa de JAK2. Es importante notar que los cuatro conformeros evaluados difieren no solamente en la posición del ciclopentano final, sino también en la orientación de la pirrolpirimidina y el pirazol, por lo que son conformeros bastante diferentes entre sí (gráfica 8). De igual manera, puede comprobarse al analizar los cuadros 3-5 que el conformero 34 presenta valoraciones muy similares a las del conformero original, el enantiómero R del fármaco, siendo mejor en cuanto a las valoraciones de *PMF score*, *G score* y *Chem score*, por lo que puede decirse que éste conformero se adapta mejor al sitio activo del dominio JH2 de la forma nativa de JAK2.

Siendo el conformero 34 el que presenta una mayor afinidad para acoplarse al sitio activo de JH2, no sería recomendable utilizarlo como fármaco, debido a que la alta afinidad de este lo vuelve un buen inhibidor competitivo; para lo cual habría que analizar y compara antes los datos teóricos de este conformero con los datos de afinidad de unión del ATP, de lo contrario se podría ver inhibida la forma nativa de la enzima, lo que conllevaría el incremento de efectos adversos del medicamento en pacientes.

Los resultados obtenidos de la señalización de Ruxolitinib® con la forma mutante V617F del dominio JH2 de JAK2 mediante el programa Surflex-Dock, muestran que el fármaco tuvo una evaluación total baja

(cuadro 9). La estimación del impedimento estérico es alta y mayor al conseguido con la forma nativa de la enzima, por lo que también aumenta la valoración de choques, aunque sigue siendo negativa, esto implica que existen más puntos del fármaco que se sobrepone de manera inapropiada en el sitio activo de la enzima (cuadro 9). Al observar la gráfica 16b, en la cual se representa el espacio que ocupa el fármaco con respecto al espacio calculado como el protomol, puede comprobarse que la posición que ocupa el fármaco es en un ángulo perpendicular a la sugerida por el protomol. El valor del encaje polar es adecuado.

Posteriormente, se analizaron los datos de las propiedades fisicoquímicas del fármaco (cuadro 10), donde se puede notar que la calificación de las interacciones de carga entre fuerzas de van de Waals y el ligando (D Score) es bastante más alta que la obtenida con la forma nativa de la enzima, al presentar un puntaje de -2380.17. El puntaje de la evaluación de la energía libre de Helmholtz de las interacciones enzima ligando, es de -1.9440 siendo bastante bajo, es decir que no es favorable con respecto a la entropía y entalpía del sistema. El G score posee una calificación -16.34, que es baja; por consiguiente, dicha unión no es favorable energéticamente. Por último, el puntaje químico (*Chem score*) el puntaje fue de -2380.2. Los resultados para las columnas *C score* y *Global score*, son los más bajos, con valor de 1 (Cuadro 10). El hecho de que estos valores sean tan bajos y desfavorables se debe a la unión irreversible del fármaco con la proteína, con lo cual logra su inhibición completa.

En las gráficas 11-13 puede observarse con mayor detalle la evaluación del *docking* del fármaco en el sitio activo del dominio JH2 de la forma mutante V617F de JAK2. En las gráficas 12 y 13 se observa en detalle las interacciones en el sitio activo y se nombran los residuos que varían su posición con respecto a la que poseen en la forma nativa. El corte tridimensional de la proteína en la gráfica 13, permite analizar la forma en que se ensambla el fármaco para provocar la inhibición de la misma, al obstruir la entrada al sitio activo, como formar un enlace irreversible de acuerdo al posicionamiento de éste. En la gráfica 14 se hace una comparación del acoplamiento del fármaco y del sustrato natural (ATP), en esta se expresa que el ajuste del fármaco es completamente opuesto al del ATP; ya que el fármaco se acopla de manera perpendicular al sitio activo. Por lo que no completa el espacio del sitio activo y genera un impedimento estérico fuera del mismo, lo que impide que al llegar el ATP fuera la enzima, pueda ingresar al dominio JH2, por lo que no se da la activación de la misma. Esta forma en que se ensambla el fármaco a la enzima hace que esa unión sea irreversible, por lo que a pesar de no ser selectivo, en cuanto a la forma nativa y mutada del dominio de la enzima, logra inhibir por completo únicamente a la forma mutada. Asimismo, altera por completo la conformación de la enzima.

De los 110 conformeros evaluados, los que mejor valoraciones obtuvieron, el caso de la forma mutante V617F de JAK2 fueron: 84, 28, 12 y 38 (cuadro 11). Los números corresponden al orden dado por la base de PubChem, de donde se obtuvieron. De los cuatro seleccionados los que presentan las mejores puntuaciones son los conformeros 12 y 38; ambos con valoraciones sobresalientes de 4 y 5,

respectivamente. Sin embargo, debido a la evaluación de los aspectos de impedimento estérico y *G score* se seleccionó al conformero 38 como el que mejor se acopla al sitio activo del dominio JH2 de la forma nativa de JAK2. Excepto por los dos aspectos mencionados, los valores obtenidos en los demás rubros son bastante similares entre ambos conformeros. Es importante notar que los cuatro conformeros evaluados difieren no solamente en la posición del ciclopentano final, sino también en la orientación de la pirrolpirimidina y el pirazol, por lo que son conformeros bastante diferentes entre sí (gráfica 15). De igual manera, puede comprobarse al analizar los cuadros 9-12 que el conformero 38 presenta valoraciones mucho más altas y, por ende, mucho mejores, que las del conformero original, el enantiómero R del fármaco, siendo mejor en todas los punteos, excepto el *D score*, por lo que puede decirse que éste conformero se adapta mejor al sitio activo del dominio JH2 de la forma mutante V617F de JAK2. No obstante, cabe resaltar que el conformero original presenta bajas puntuaciones debido a que al acoplarse al sitio activo permanece de manera irreversible en él, causando su inhibición; por lo que concierne plantear si este conformero (38), que posee altas puntuaciones en los distintos aspectos, sería capaz de inhibir la enzima por completo al igual que el original o si causaría una inhibición momentánea, al igual que sucede con la unión reversible del fármaco en su conformero original con la forma nativa.

Al comparar las conformaciones del dominio JH2, tanto en la forma nativa como mutada, es posible notar diferencias características; en el caso de la forma nativa, la unión fármaco-receptor (gráfica 17A), dan por resultado una conformación bastante equivalente a la unión sustrato-receptor. Por el contrario, al examinar la conformación de la forma mutada en unión con el fármaco (gráfica 17B), el aspecto más característico es la torsión que muestra la proteína, a manera de englobar el fármaco, cerrando por completo el acceso al sitio activo y mostrando una estructura levemente más compacta que la forma nativa; así como, las cavidades y relieves menos pronunciadas en la forma mutante. Esto se debe a que el fármaco posee una estructura con resonancia, capaz de estabilizar los puentes de hidrógeno internos de los residuos que rodean el sitio activo que posee la proteína (Anexo 7).

Al comparar en detalle los sitios activos de ambas formas de la proteína, generados del *docking*, en unión al fármaco (gráfica 18), se aprecian las diferencias estructurales mencionadas anteriormente. La estructura de la forma mutada se muestra más compacta, con las tipologías de superficie menos acentuadas, pero es dicho cambio en las características estructurales de la proteína en forma mutada que admite la unión irreversible del fármaco, volviéndolo un potente inhibidor. De lo contrario, sin dichas características estructurales modificadas, sucedería lo mismo que con la forma nativa, en la cual el fármaco actúa simplemente como un inhibidor competitivo. Entre los residuos que alteran la conformación del sitio activo del dominio JH2, se encuentran dos glicinas, dos asparaginas, una arginina y una glutamina, los cuales son los residuos adyacentes al fármaco.



El cuadro 13 permite realizar una comparación visual de las estructuras químicas de los conformeros mejor evaluados con cada forma de la proteína -nativa y mutada- evidenciándose que los conformeros 12 y 101 poseen una alta similitud; sin embargo, ninguno de ellos obtuvo el mayor puntaje, es decir que su acoplamiento con la enzima es aceptable pero no óptimo. Por el contrario, los conformeros mejor evaluados el 67 y 84, para nativa y mutada respectivamente, muestran una gran discrepancia en cuanto a la orientación de sus enlaces y a sus ejes de rotación. Mediante estas comparaciones se puede visualizar más claramente cómo es afectado el sitio activo de la enzima en la forma mutada, debido al cambio de aminoácidos de fenilalanina por valina. El hecho de que las conformaciones que deba adoptar una misma molécula presenten una gran discrepancia, para encajar en el sitio activo de dos formas de una misma proteína, provee una alta selectividad al medicamento, ya que se comprueba que es más afín y que se acoplará de manera óptima al blanco terapéutico deseado, mostrando menor afinidad y un acoplamiento subóptimo con la forma nativa de la misma, en este caso.

## IX. CONCLUSIONES

Se ha evaluado *in silico* el fármaco Ruxolitinib® el cual posee una mayor afinidad por el sitio activo, o sitio de enlace, de la forma mutada predominante V617F del dominio JH2 de JAK2, implicada en el desarrollo de neoplasias mieloproliferativas, que de la forma nativa de la enzima.

A pesar de tener un alto porcentaje de identidad 92.04% y un RMSD bajo, de 0.474Å, la diferencia de 7.96% apenas perceptible en la alineación de las estructuras proteicas, determinan la conformación que la proteína adoptará al unirse al sustrato y fármaco de interés, de manera concluyente, ya que las alteraciones se dan en los puntos de autoregulación de la enzima y condicionan el tipo de unión que tendrá el fármaco con la enzima.

El *docking* molecular del fármaco con la forma nativa y mutada del dominio JH2 de la enzima JAK2, deja en evidencia que Ruxolitinib® se acopla de una mejor forma a la conformación nativa de JAK2 al tener puntuaciones altas en los aspectos de evaluación fisicoquímicos, como la energía libre de Helmholtz. Mientras que el *docking* con la forma mutada V617F, muestra un acoplamiento con bajos valores en aspectos fisicoquímicos y un alto nivel de impedimento estérico e interacciones inapropiadas enzima-ligando, lo que lo hace ideal para desempeñar el papel de inhibidor de la proteína.

Los resultados del *docking* molecular apunta a que la actividad inhibitoria de Ruxolitinib® se propicia debido a la explotación de las diferencias estructurales de la forma mutada V617F, que condicionan la manera en que la proteína cambiará su conformación al unirse al fármaco, debido a los impedimentos estéricos que éste propicia y a la estabilización de puentes de hidrógeno de los residuos adyacentes al sitio de unión que este lleva a cabo, mediante los heterociclos con resonancia que posee su estructura.

De los 110 confórmeros de Ruxolitinib® se determinó que el confórmero 34 es el más afín a la forma nativa del dominio JH2; mientras que el confórmero 38 es más afín a la forma mutada V617F del dominio JH2. No obstante, el hecho de que el confórmero 38 muestre un mejor acoplamiento a la estructura proteica *in silico* puede ser contraproducente para el efecto inhibitorio deseado, ya que al haber menos interacciones inapropiadas con la enzima y menor impedimento estérico, podría actuar únicamente como inhibidor competitivo de la forma mutada V617F.

El papel que juegan las diferencias estructurales entre la forma nativa del receptor de membrana JAK2 y la forma mutante V617F en la interacción con el fármaco Ruxolitinib®, es determinante para conferirle selectividad al momento de realizar la inhibición irreversible de la diana farmacológica; sin estas diferencias estructurales, el fármaco no actuaría como un potente inhibidor de JAK2 V617F.

## X. RECOMENDACIONES

Es posible la optimización del fármaco Ruxoltinib® dirigido a la forma mutada VV617F del dominio JH2 de la enzima JAK2, mediante el estudio de los confórmeros menos afines a la forma nativa de la enzima, para lograr que el compuesto sea más selectivo y, por consiguiente, disminuir los efectos adversos del periodo de adaptación al mismo por los pacientes.

Es necesario realizar estudios más estudios con estructuras similares a la que presenta Ruxolitinib®, como lo son medicamentos como lidocaína, ropivacaína o compuestos como benzenopropanaminium, que siguen el esquema de ciclos similar al ATP, para definir si alguno es candidato para dar origen a derivados que sean farmacológicamente activos y estén dirigidos a la actividad inhibitoria de esta mutación o de otras mutaciones en la misma enzima.

Implementar el desarrollo de más investigaciones en química y nanotecnología computacional, aplicadas a diferentes problemáticas del país, sobre todo en el área de salud, para plantear soluciones y nuevos enfoques al tratamiento de diversas patologías moleculares.

La caracterización de los metabolitos secundarios generados a partir del metabolismo de Ruxolitinib® mediante la enzima CYP3A4, podría evidenciar si estos compuestos pueden interactuar con otras enzimas. Asimismo, sería importante la realización de estudios del metabolismo de Ruxolitinib® con diferentes polimorfismos en la enzima CYP3A4, con el objetivo de determinar si estos polimorfismos pueden alterar el porcentaje de los metabolitos secundarios generados.

## XI. REFERENCIAS

- Abbas, A., *et al.* 2008. *Inmunología Celular y Molecular*. 6ª Edición. España
- Adams, S., *et al.* 2011. *The Quixote project: collaborative and open quantum chemistry data management in the internet age*. Journal of Cheminformatics. Vol. 3, No. 38. Pp. 27.
- Australian Government. 2013. *Australian Public Assessment Report for Ruxolitinib*. Therapeutic Goods Administration. Department of Health. Pp. 82.
- Bandaranayake, R. *et al.* 2012. *Crystal structures of the JAK2 pseudokinase domain and the pathogenic mutant V617F*. Nat Struct Mol Biol Vol. 19, No. 8. Pp. 754-759.
- Böhm, H. & G. Schneider. 2006. *Protein-ligand interactions: from molecular recognition to drug design. Methods and principles in medicinal chemistry*. John Wiley & Sons, Inc. Pp. 260.
- Brière, Jean. 2007. *Essential thrombocythemia*. Orphanet Journal of Rare Diseases. No. 2, Vol. 3. 17 pp.
- Campbell, N. & J. Reece. 2007. *Biología*. Editorial Médica Panamericana.
- Campbell P., *et al.* 2005. *Definition of subtypes of essential thrombocythaemia and relation to polycythemia vera based on JAK2 V617F mutation status: a prospective study*. Lancet. No. 366. Pp. 1945-1952.
- Cañizares, J. & Blanca, J. 2014. *Alineamiento de secuencias*. Bioinformática. <http://personales.upv.es/jcanizar/bioinformatica/alineamientos.html>. [Consulta: Julio, 2014].
- Chekkara, R., *et al.* 2014. *Molecular docking studies of phenylaminopyrimidine and pyrazolylaminopyrimidine derivatives as Janus Kinase 2 (JAK2) inhibitors*. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. Vol. 6, Issue 2. Pp. 225-230.
- ChEMBL. 2011. *Compound Report Card: CHEMBL1789941*. <https://www.ebi.ac.uk/chembl/compound/inspect/CHEMBL1789941>. [Consulta: Julio, 2014].
- Chrencik, J. *et al.* 2010. *Structural and thermodynamic characterization of the TYK2 and JAK3 kinase domain in complex with CP-690550 and CMP-6*. J Mol Biol. No. 400. Pp 413-433.
- Collins, T. 2007. *ImageJ for microscopy*. BioTechniques 43 (Suppl 1). Pp. 25-30.

- Cramer, Christopher. 2004. *Essentials of computational chemistry: Theories and models*. 2a. Edición. John Wiley & Sons, Inc. USA. Pp. 596.
- Deisseroth, A., et al. 2012. *U.S. food and drug administration approval: Ruxolitinib for the treatment of patients with intermediate and high-risk myelofibrosis*. *Clinical Cancer Research*. No. 18. Pp. 3212-3217.
- Delgado, A. et al. 2004. *Introducción a la química terapéutica*. 2ª Edición. Ediciones Días de Santos, S. A. Madrid. España.
- Devlin, Thomas. 2004. *Bioquímica: libro de texto con aplicaciones clínicas*. Reverté. Barcelona, España.
- Drug Bank. 2011. *Ruxolitinib*. <http://www.drugbank.ca/drugs/DB08877>. [Consulta: Julio, 2014].
- Ekins, Sean. 2006. *Computer applications in pharmaceutical research and development*. Volume 2 of Wiley Series in Drug Discovery and Development. John Wiley & Sons, Inc. Pp. 805.
- European Medicines Agency (EMA). 2012. *CHMP assessment report Jakavi*. Committee for Medicinal Products for Human Use. Pp. 84
- FDA. 2011. *Jakafi™ (ruxolitinib) tablets, full prescribing information*. U.S. Patent No. 7,589,257.
- Finazzi, G. & T. Barbui. 2007. *The treatment of polycythaemia vera: an update in the JAK2 era*. *Intern Emerg Med*, 2: 13-18.
- Friesner, Richard. 2005. *Ab initio quantum chemistry: methodology and applications*. *PNAS*. Vol. 102, No. 19. Pp. 6648-6653.
- Gäbler, K.; Behrmann, I. & C. Haan. 2013. *JAK2 mutants (e.g., JAK2V617F) and their importance as drug targets in myeloproliferative neoplasms*. *JAK-STAT*. Vol. 2. Issue 3.
- Gallardo, Miguel. 2012. *Divergencias genéticas y proteómicas en la fisiopatogenia de las neoplasias mieloproliferativas (NMP)*. Tesis Universidad Complutense de Madrid. España. 128 págs.
- Gari, Mamdooh. 2009. *The role of Janus Kinase 2 (JAK2) in the pathogenesis of myeloproliferative disorders*. *JKAU Med. Sci*. Vol. 16, No. 1, pp. 3-19.

- GeneCards. 2013. *Janus Kinase 2*. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=JAK2>. [Consulta: Julio, 2013].
- Guglielmelli, P. & A. Vannuchi. 2010. *Recent advances in diagnosis and treatment of chronic myeloproliferative neoplasms*. *Medicine Reports*. Vol. 2, No. 16.
- Harrison, Douglas. 2012. *The JAK/STAT Pathway*. Cold Spring Harb Perspect Biol. No. 4.
- Harrison, C. & A. Vannuchi, 2012. *Ruxolitinib: a potent and selective Janus kinase 1 and 2 inhibitor in patients with myelofibrosis. An update for clinicians*. *Therapeutic Advances in Hematology*. Vol. 3, No. 6, pp. 341-354.
- Hartl, D. & M. Ruvolo. 2011. *Genetics*. Jones & Bartlett Publishers. EEUU.
- Hehre, Warren. 2003. *A guide to molecular mechanics and quantum chemical calculations*. Wavefunction, Inc. USA. Pp. 796.
- Instituto Nacional de Cáncer. *Trastornos mieloproliferativos crónicos*. <http://www.cancer.gov/espanol/pdq/tratamiento/trastornosmieloproliferativos/Patient>. [Consulta: Marzo, 2013].
- Instituto Nacional del Cáncer (INC). *Trastornos mieloproliferativos crónicos: Mielofibrosis primaria*. <http://www.cancer.gov/espanol/pdq/tratamiento/trastornosmieloproliferativos/HealthProfessional/page4>. [Consulta: Julio, 2013].
- Jensen, Frank. 2007. *Introduction to computational chemistry*. 2<sup>nd</sup>. Edition. John Wiley & Sons, Inc. USA. Pp. 599.
- Landolfi, Raffaele, *et al.* 2010. *Polycythemia vera*. *Intern Emerg Med*. Springer. 5: 375-384.
- Lee, T., *et al.* 2009. *Structural effects of clinically observed mutations in JAK2 exons 13-15: comparison with V617F and exon 12 mutations*. *BMC Structural Biology*. No. 9, Vol. 58. Pp. 14.
- Leeson, Paul. 2012. *Chemical beauty contest*. *Drug discovery*. No. 26. Vol. 481. Pp. 455- 456.
- Leeson P. & B. Springthorpe. 2007. *The influence of drug-like concepts on decision-making in medicinal chemistry*. *Nat Rev Drug Discov* No.6, Vol.11. Pp. 881–890.
- Lehninger, M. *et al.* 2009. *Principios de bioquímica*. Omega. EEUU.

- Leukemia & Lymphoma Society. 2012. *Información sobre la policitemia vera*. [www.lls.org](http://www.lls.org). [Consulta: Marzo, 2013].
- Leukemia & Lymphoma Society. 2012. *Información sobre la mielofibrosis*. [www.lls.org](http://www.lls.org). [Consulta: Julio, 2013].
- Levine, Ira. 2005. *Quantum Chemistry*. 5a. Edición. Pearson Educación, S. A. Madrid, España. Pp. 736.
- Levine, Ross; D. Gilliland. 2008. *Myeloproliferative disorders*. Blood, Septiembre 15; 112(8): 2190-2198.
- Lewars, Errol. 2011. *Computational chemistry: Introduction to the theory and applications of molecular and quantum mechanics*. 2ª. Edición. Springer. Pp. 664.
- Lipinski, Christopher. 2000. *Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability*. J. Pharm. Tox. Meth. No. 44. Pp. 235-249.
- Lipinski, Christopher. 2004. *Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution*. Drug Discovery Today Technologies. No. 1, Vol. 4. Pp. 337-341.
- Lipinski, C. *et al.* 1997. *Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings*. Adv Drug Delivery Rev. No. 23. Pp. 3-25.
- Liu, Jianling, *et al.* 2011. *Combined 3D-QSAR, molecular docking and molecular dynamics study on derivatives of peptide epoxyketone and tyropeptin-boronic acid as inhibitors against the  $\beta 5$  subunit of human 20S proteasome*. International Journal of Molecular Sciences. Vol. 12. No. 3. Pp. 1807-1835.
- Lüllmann, H., *et al.* 2010. *Farmacología: texto y atlas*. Editorial Médica Panamericana.
- Manascero, Aura Rosa. 2003. *Hematología herramienta para el diagnóstico: atlas de morfología celular, alteraciones y enfermedades relacionadas*. 15ª. Edición. CEJA. Bogotá, Colombia. 195 págs.
- Metwally, E. & J. Begemann. 2007. *A novel use of protomols in Surflex-Dock: Searching for binding sites with a global protomol*. Tripos International. Pp. 2.
- Nicolás, M. *et al.* 2006. *Algunos aspectos básicos de la química computacional*. 1ª. Edición. UNAM. México. Pp.70.
- Montoro, Bruno. 2013. *Principios básicos de la farmacología*. Escola catalana de medicina. Servicio de farmacia, hospital universitario vall de'hebron, Barcelona.

- NIH. 2011. *What Is Polycythemia Vera?* <http://www.nhlbi.nih.gov/health/healthtopics/topics/poly/>. [Consulta: Abril, 2013].
- Palestro, P., *et al.* 2009. *El uso de la energía conformacional como descriptor de la actividad anticonvulsiva de sulfamidas y derivados.* Congreso argentino de fisicoquímica y química inorgánica. CONICET.
- Pharmainformatic. N. D. *Lipinski's rule of 5.* [http://www.pharmainformatic.com/html/rule\\_of\\_5.html](http://www.pharmainformatic.com/html/rule_of_5.html). [Consulta: Julio, 2014].
- PubChem. 2011. *Compound Summary for: CID 25126798.* <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=25126798#itabs-2d>. [Consulta: Julio, 2014].
- Quintás-Cardama, Alfonso, *et al.* 2011. *Janus kinase inhibitors for the treatment of myeloproliferative neoplasias and beyond.* Nature Reviews. Vol. 10. Pp. 127-140.
- Rawling, Jason, Rosler, Kristin, & Douglas, Harrison. 2004. *The JAK/STAT signaling pathway.* Journal of Cell Science. No. 117. Pp. 1281-1283.
- Reilly, John T. 2006. *Idiopathic myelofibrosis: pathogenesis to treatment.* Hematological Oncology. No. 24, Vol. 2. Pp. 56-63.
- Reddy, Tumala, *et al.* 2012. *Three-dimensional pharmacophore design and biochemical screening identifies substituted 1,2,4-triazoles as inhibitors of the annexin A2-S100A10 protein interaction.* Chem Med Chem. Vol. 7. No. 8. Pp. 1435-1446.
- Rodak, Bernadette. 2005. *Hematología: fundamentos y aplicaciones clínicas.* Editorial Médica Panamericana.
- Ruiz, Guillermo. 2009. «Capítulo 14: Neoplasias Mieloproliferativas» *Fundamentos de hematología.* 4ª. Edición. Editoriales Médica Panamericana. México. 344 págs.
- Scott, L. *et al.* 2007. *JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis.* The New England Journal of Medicine. No. 356, Vol. 5. Pp. 459-468.
- Sonbol, M. *et al.* 2013. *Comprehensive review of JAK inhibitors in myeloproliferative neoplasms.* Therapeutic Advances in Hematology. Vol., 4, No. 1. Pp. 15-35.



















- Steensma, David. 2006. *JAK2 V617F in myeloid disorders: molecular diagnostic techniques and their clinical utility*. Journal of Molecular Diagnostics. Vol. 8, No. 4. Pp. 397-411.
- Strehl, S. 2005. *JAK2 (Janus Kinase 2)*. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology. <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/JAK98.html>. [Consulta: Julio, 2013]
- Taveli, D., et al. 2006. *Estudio QSPR sobre solubilidades acuosas de sustancias orgánicas*. Congreso Argentino de Química Dr. Ángel del Carmen Devia. CONICET.
- Tefferi Ayalew. 2003. *Polycythemia vera: A comprehensive review and clinical recommendations*. Mayo Clin Proc. 78: 174-194.
- Tefferi Ayalew. 2007. *JAK2 mutations and clinical practice in myeloproliferative neoplasms*. The Cancer Journal. Vol. 13. No. 6. Pp. 366-371.
- Tefferi, Ayalew & Gary, Gilliland. 2005. *JAK2 in myeloproliferative disorders is not just another kinase*. Cell Cycle. Vo. 4, No. 8. Pp. 1053-156.
- Tefferi, A.; Skoda, R. & J. Vardiman. 2009. *Myeloproliferative neoplasms: contemporary diagnosis using histology and genetics*. Nat. Rev. Clin. Oncol. 6, 627-637.
- The Oncology Institute of Hope & Innovation. 2012. *Trombocitemia esencial*. <http://www.theoncologyinstitute.com/?pgid=566&parid=562&rid=562&lang=2>. [Consulta: Agosto, 2013].
- Tripes. 2006. *SYBYL Expert Molecular Modeling Environment*. Tripes Go. Discover. Pp. 16.
- Ungureanu, D. et al. 2011. *The pseudokinase domain of JAK2 is a dual-specificity protein kinase that negatively regulates cytokine signaling*. Nat Struct Mol Biol. Vol. 18. Pp. 971-976.
- Vargas, Rodrigo. 2012. *Diseño de un nuevo fármaco inhibidor de la proteasa presente en el virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 a partir de tres antirretrovirales (Lopnavir, Darunavir, Tipranavir), por medio de nanotecnología computacional*. Proyecto FODECYT No. 12-2010. CONCYT. USAC. Guatemala. Pp. 113.
- Varnek, A. & A. Tropsha. 2008. *Chemoinformatics approaches to virtual screening*. Royal Society of Chemistry. England. Pp. 340.
- Vida, Jesús M. 2003. *Trombocitemia esencial*. Hospital Donostia Ospitalea, País Vasco, España.

















- Wan, X., *et al.* 2013. *Ab Initio modeling and experimental assessment of Janus Kinase 2 (JAK2) kinase-pseudokinase complex structure.* PLoS Comput Biol. 9 (4).
- Weisner, J. *et al.* 2007. *Acetylcholinesterases – the structural similarities and differences.* Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry. No. 22. Vol. 4. Pp. 417-424.
- Xu, Guanhong, *et al.* 2014. *The discovery of potentially selective human neuronal nitric oxide synthase (nNOS) inhibitors: A combination of pharmacophore modeling, CoMFA, virtual screening and molecular docking studies.* International Journal of Molecular Sciences. Vol. 15. No. 5. Pp. 8553-8569.
- Yamaoka, Kunihiro, *et al.* 2004. *The Janus kinases (Jaks).* Genome Biology. Vol. 5, Issue 12. Pp. 253.1–253.6
- Yeh TC, *et al.* (1999) *The Janus kinase family of protein tyrosine kinases and their role in signaling.* Cell Mol Life Sci. 1999 Sep; 55(12):1523-34.
- Young, David. 2001. *Computational chemistry: A practical guide for applying techniques to real-world problems.* John Wiley & Sons, Inc. Pp. 370.
- Zhou, T., *et al.* 2014. *Specificity and mechanism of action of the JAK2 tyrosine kinase inhibitors ruxolitinib and SAR302503 (TG101348).* Letters to the editor. Leukemia. 28. Pp. 404-463.

## XII. ANEXOS



















Anexo 1. Cuadro de resultados del *docking* de los confórmers 1-35 de Ruxolitinib® con el dominio JH2 de la forma nativa de JAK2.

	1: Total_Score	2: Crash	3: Polar	4: Strain	5: Total	6: Ligmin	7: Full	8: D_SCORE	9: PMF_SCORE	10: G_SCORE	11: CHEMSCO	12: CSCORE	13: GLOBAL_C
 25: Ruxolitinib34	5.1380	-0.4518	2.5683	0.5957	4.5423	85.6922	79.7452	-2780.4231	-26.3243	-158.8897	-23.7003	5	5
 21: Ruxolitinib30	4.7635	-0.4467	2.6463	0.3959	4.3676	77.3341	71.7435	-2611.3820	-8.6871	-163.1798	-20.7208	3	4
 15: Ruxolitinib23	4.7545	-0.4166	2.6318	0.2735	4.4810	76.9579	71.6277	-2626.3669	-11.0093	-163.7752	-20.7364	4	4
 8: Ruxolitinib16	4.5865	-0.8492	2.5177	0.8407	3.7458	76.0631	71.0062	-2639.0932	-6.7196	-167.5267	-21.4919	4	4
 14: Ruxolitinib22	4.4909	-0.6122	2.6723	0.0953	4.3956	77.4387	71.5046	-2663.1281	-18.6237	-163.5198	-23.1047	5	5
 19: Ruxolitinib28	4.4323	-0.8509	2.5096	0.9771	3.4552	76.1958	71.5313	-2636.6495	-3.5236	-166.2818	-21.3874	3	4
 7: Ruxolitinib15	4.4245	-0.4210	2.6138	2.7679	1.6565	80.1289	78.3935	-2768.3346	-35.5813	-155.1106	-24.0390	5	5
 16: Ruxolitinib24	4.3588	-0.3547	2.6145	0.0442	4.3146	76.1039	70.2792	-2418.0682	-24.7670	-161.8834	-21.6885	4	5
 12: Ruxolitinib20	4.3555	-0.3073	2.5882	0.2136	4.1419	75.5801	69.9885	-2627.8350	-20.1749	-155.6668	-17.9008	4	4
 13: Ruxolitinib21	4.3257	-0.2483	2.4990	0.0346	4.2911	78.1247	72.3317	-2877.1225	-46.2728	-142.6302	-23.2920	5	5
 20: Ruxolitinib29	4.2889	-0.6167	2.6336	2.8204	1.4686	80.3696	79.7505	-2624.0185	-9.0652	-155.5597	-19.6266	4	4
 3: Ruxolitinib11	4.1935	-1.0889	2.3264	0.1562	4.0374	81.9817	76.5331	-2508.7837	-4.7338	-163.7101	-25.1193	4	4
 10: Ruxolitinib18	4.1469	-1.2312	2.2800	0.1242	4.0227	82.1543	76.7236	-2521.8631	-1.3829	-165.9425	-25.3301	3	4
 23: Ruxolitinib32	4.1346	-1.2955	2.4321	1.6339	2.5007	75.8523	72.8724	-2463.7312	-15.9561	-145.0802	-25.0901	3	5
 31: Ruxolitinib8	3.9554	-0.2989	2.2959	6.8552	-2.8999	74.7739	78.6887	-2696.0766	-30.0785	-149.3474	-21.7444	5	5
 9: Ruxolitinib17	3.9279	-0.5055	2.5387	0.2963	3.6316	75.0815	70.9209	-2711.2448	-29.7453	-159.7604	-21.2095	5	5




















Continúa en la siguiente página.

	1: Total_Score	2: Crash	3: Polar	4: Strain	5: Total	6: Ligmin	7: Full	8: D_SCORE	9: PMF_SCORE	10: G_SCORE	11: CHEMSCO	12: CSCORE	13: GLOBAL_C
 30: Ruxolitinib7	3.9062	-0.8242	2.3826	4.0208	-0.1146	75.4153	75.9848	-2722.6468	-27.1107	-159.7333	-23.0520	5	5
 2: Ruxolitinib10	3.8397	-0.4822	2.4586	0.8868	2.9529	75.1826	71.8230	-2542.3124	-24.7532	-140.5155	-20.3738	5	5
 28: Ruxolitinib5	3.7330	-0.2750	2.5778	0.0071	3.7260	77.5439	72.5138	-2678.0902	-29.7068	-140.1969	-17.6928	3	4
 18: Ruxolitinib26	3.7295	-1.2633	1.0138	0.2065	3.5230	78.9308	74.1748	-2738.8318	18.6466	-188.0520	-20.1504	4	4
 1: Ruxolitinib27	3.7295	-1.2633	1.0138	0.2065	3.5230	78.9308	74.1748	-2738.8318	18.6466	-188.0520	-20.1504	4	4
 4: Ruxolitinib12	3.7254	-0.9803	2.5410	2.0465	1.6789	75.7162	74.3113	-2667.5625	-13.4550	-125.0426	-17.4362	3	3
 17: Ruxolitinib25	3.7247	-0.5972	2.6118	0.1603	3.5643	77.9173	73.1054	-2319.9927	-25.7954	-143.2887	-21.1647	4	5
 24: Ruxolitinib33	3.6660	-0.6417	2.4636	0.1865	3.4795	74.4690	69.7717	-2647.2857	-25.3851	-145.9787	-20.9269	5	5
 22: Ruxolitinib31	3.6093	-0.2246	2.5913	0.0036	3.6057	77.5755	72.7079	-2678.0146	-26.2585	-143.6472	-17.4735	3	4
 5: Ruxolitinib13	3.5619	-0.5389	2.2770	0.2683	3.2937	74.8291	70.3826	-2762.6454	-30.2410	-144.5399	-20.4420	5	5
 32: Ruxolitinib9	3.4914	-1.0513	1.9321	2.2053	1.2861	74.0675	72.3314	-2552.2083	-0.5223	-134.1808	-15.5028	1	2
 27: Ruxolitinib4	3.4693	-1.0099	1.5779	0.1841	3.2852	81.9133	77.4782	-2592.8961	-25.4845	-166.1094	-25.1045	5	5
 26: Ruxolitinib35	3.2957	-0.9347	1.9855	4.4231	-1.1274	78.6127	80.1347	-2561.5622	-5.1156	-131.8823	-16.1299	3	2
 6: Ruxolitinib14	3.0487	-1.4860	1.0128	3.5910	-0.5422	74.2985	76.6316	-2710.9696	22.1001	-172.6892	-20.1975	4	4
 29: Ruxolitinib6	2.7249	-0.1952	2.2693	0.5533	2.1716	73.8090	70.8774	-2726.2988	-28.5637	-132.3840	-17.9311	5	3
 11: Ruxolitinib19	2.6912	-0.6436	2.4354	4.0078	-1.3167	76.6019	78.8951	-2457.6105	-33.3303	-113.6747	-17.2023	2	3



















Anexo 2. Cuadro de resultados del *docking* de los conformeros 36-70 de Ruxolitinib® con el dominio JH2 de la forma nativa de JAK2.

	1: Total_Score	2: Crash	3: Polar	4: Strain	5: Total	6: Ligmin	7: Full	8: D_SCORE	9: PMF_SCORE	10: G_SCORE	11: CHEMSCO	12: CSCORE	13: GLOBAL_C
 32: Ruxolitinib67	5.1499	-0.6412	2.7016	1.9991	3.1507	77.2862	73.8350	-2691.7399	-32.7984	-153.9831	-23.6060	5	5
 11: Ruxolitinib46	4.8611	-0.3548	2.6287	0.2655	4.5957	79.3186	73.1144	-2708.4943	-32.9375	-157.4559	-23.3028	5	5
 19: Ruxolitinib54	4.8566	-1.0577	2.6253	5.1261	-0.2695	73.4466	74.6960	-2710.6804	-3.2732	-151.1325	-22.4742	4	4
 8: Ruxolitinib42	4.7301	-0.2450	2.5530	0.3894	4.3407	73.7108	68.0991	-2857.7729	-45.0853	-151.4504	-23.0002	5	5
 22: Ruxolitinib57	4.7173	-0.5760	2.3251	0.1238	4.5935	77.3575	71.1562	-2623.2257	-8.4419	-171.0866	-20.1594	4	4
 17: Ruxolitinib52	4.6194	-0.2715	2.5995	0.0364	4.5830	78.0205	71.8335	-2582.6943	-3.7104	-157.1034	-21.1203	3	4
 18: Ruxolitinib53	4.6018	-0.2644	2.5392	0.0422	4.5596	73.6161	68.5634	-2797.7535	-46.8474	-145.2406	-22.2479	5	5
 33: Ruxolitinib68	4.5055	-0.4898	2.5305	0.9847	3.5208	76.0682	71.3151	-2825.9882	-40.2502	-152.5864	-22.8725	5	5
 25: Ruxolitinib60	4.4789	-0.5001	2.6835	2.0420	2.4369	77.5661	74.2763	-2713.4001	-40.0998	-154.4355	-23.1220	5	5
 9: Ruxolitinib43	4.4147	-0.4398	2.6365	2.3116	2.1031	77.5500	74.7109	-2686.8945	-29.7637	-149.8221	-22.7595	5	5
 12: Ruxolitinib47	4.3393	-0.4662	2.5935	2.9140	1.4253	77.5300	75.8318	-2593.9418	-28.7683	-157.3370	-21.8183	5	5
 24: Ruxolitinib59	4.3092	-0.2996	2.5654	0.0049	4.3042	75.2583	69.4766	-2632.1825	-21.6474	-155.0562	-17.7357	4	4
 26: Ruxolitinib61	4.2828	-0.2011	2.5651	0.0595	4.2232	75.9341	70.3271	-2797.5969	-52.2046	-139.2742	-21.8592	5	5
 7: Ruxolitinib41	4.2205	-0.2338	2.6524	0.1705	4.0500	79.8643	74.3968	-2504.8661	-18.9021	-156.8928	-21.7970	3	5
 21: Ruxolitinib56	4.2195	-0.1842	2.6022	0.0658	4.1537	73.9270	68.3195	-2461.4239	-32.3503	-151.8659	-21.4386	4	5
 15: Ruxolitinib50	4.1810	-1.4087	2.6109	2.3264	1.8546	75.3227	74.6273	-2646.2940	-20.1038	-158.0488	-23.1577	5	5
 2: Ruxolitinib36	4.1409	-0.2070	2.5938	0.0720	4.0690	74.0840	68.5909	-2406.7799	-33.6626	-149.1608	-21.1656	4	5
 4: Ruxolitinib38	4.0364	-0.4314	2.5503	1.6234	2.4130	79.6398	76.4027	-2626.7668	-12.0598	-151.8834	-19.7635	4	4





















Continúa en la siguiente página.

	1: Total_Score	2: Crash	3: Polar	4: Strain	5: Total	6: Ligmin	7: Full	8: D_SCORE	9: PMF_SCORE	10: G_SCORE	11: CHEMSCO	12: CSORE	13: GLOBAL_C
 2: Ruxolitinib36	4.1409	-0.2070	2.5938	0.0720	4.0690	74.0840	68.5909	-2406.7799	-33.6626	-149.1608	-21.1656	4	5
 4: Ruxolitinib38	4.0364	-0.4314	2.5503	1.6234	2.4130	79.6398	76.4027	-2626.7668	-12.0598	-151.8834	-19.7635	4	4
 23: Ruxolitinib58	4.0248	-0.9355	2.3793	0.7036	3.3212	83.3428	78.8593	-2948.8959	-21.5173	-152.4370	-23.0733	4	5
 1: Ruxolitinib44	4.0104	-0.3174	2.5839	0.0861	3.9243	79.2237	73.9259	-2531.7309	-18.4565	-146.5248	-21.2011	3	5
 10: Ruxolitinib45	4.0001	-0.2753	2.6090	0.4909	3.5092	77.4777	73.7267	-2452.9751	-32.5044	-126.0320	-20.4877	3	5
 13: Ruxolitinib48	3.9291	-1.1067	2.4859	0.2220	3.7071	82.3835	77.5138	-2654.2094	-17.0976	-149.1162	-25.6260	4	5
 30: Ruxolitinib65	3.9126	-0.2287	2.6311	0.0030	3.9095	78.5527	73.4256	-2588.0400	-31.5739	-148.9435	-22.1683	5	5
 35: Ruxolitinib70	3.9035	-0.4625	2.5615	1.9927	1.9109	74.5723	71.9927	-2717.4931	-28.7496	-157.4678	-21.0986	5	5
 3: Ruxolitinib37	3.8619	-0.4017	2.4154	0.2743	3.5876	76.9141	72.2500	-2784.2276	-29.7141	-146.7465	-22.1388	5	5
 5: Ruxolitinib39	3.8437	-0.2167	2.5866	0.5885	3.2552	81.8493	77.4548	-2792.4682	-47.2286	-128.4393	-21.9824	4	5
 14: Ruxolitinib49	3.7520	-1.1467	2.6266	0.7407	3.0113	79.8491	76.4864	-2568.6966	-10.1135	-155.0485	-19.2051	4	3
 20: Ruxolitinib55	3.7434	-0.4580	2.4519	0.2250	3.5184	76.9334	72.1835	-2768.9132	-33.0662	-142.0495	-22.2019	5	5
 28: Ruxolitinib63	3.7308	-0.3798	2.5808	0.3651	3.3658	82.7366	78.3936	-2808.3895	-33.8262	-137.4323	-20.4646	4	5
 27: Ruxolitinib62	3.6282	-0.4621	2.4415	1.1571	2.4711	77.7503	74.4180	-2753.0374	-32.8572	-147.3253	-22.2975	5	5
 6: Ruxolitinib40	3.5955	-0.3524	2.5447	0.2884	3.3071	75.9134	71.6556	-2511.3387	-25.2643	-135.9091	-19.3864	5	4
 16: Ruxolitinib51	3.5552	-0.4173	2.4655	0.2663	3.2889	76.2820	71.8420	-2776.2081	-24.2867	-139.7572	-21.2853	5	5
 29: Ruxolitinib64	3.2284	-0.3130	0.1596	1.3323	1.8961	72.9292	70.6295	-2486.1875	-3.6204	-156.8093	-23.9020	4	4
 31: Ruxolitinib66	3.2198	-0.3240	2.5316	0.0861	3.1336	76.4183	72.2986	-2294.6761	-22.4227	-112.3958	-17.5463	2	3
 34: Ruxolitinib69	2.0343	-0.2529	1.7006	0.1882	1.8461	73.4146	70.9242	-2199.0042	-26.6144	-104.0155	-18.0277	2	1

Anexo 3. Cuadro de resultados del *docking* de los conformeros 71-110 de Ruxolitinib® con el dominio JH2 de la forma nativa de JAK2.

















	1: Total_Score	2: Crash	3: Polar	4: Strain	5: Total	6: Ligmin	7: Full	8: D_SCORE	9: PMF_SCORE	10: G_SCORE	11: CHEMSCO	12: CSCORE	13: GLOBAL_C
 2: Ruxolitinib101	4.9521	-0.2355	2.5568	3.7338	1.2183	78.0312	76.3986	-2879.6325	-46.1381	-142.1304	-23.2313	5	5
 35: Ruxolitinib94	4.7874	-0.5054	2.4949	1.1038	3.6836	78.8455	73.8727	-2813.2934	-34.9708	-162.9094	-22.6835	5	5
 14: Ruxolitinib73	4.7511	-0.1485	2.6014	2.0484	2.7026	78.1774	74.5289	-2858.8421	-48.2674	-143.4880	-22.9995	5	5
 5: Ruxolitinib104	4.7361	-0.4083	2.5543	0.1006	4.6355	81.2998	75.0419	-2815.3090	-39.1998	-145.2561	-22.7589	5	5
 32: Ruxolitinib91	4.6596	-0.1486	2.5119	1.2110	3.4486	78.1981	73.8825	-2867.2937	-46.5567	-146.3968	-23.2247	5	5
 25: Ruxolitinib84	4.5776	-0.6767	2.2908	0.2030	4.3745	81.9714	76.2105	-2531.4291	-8.9976	-166.0525	-24.9443	3	4
 39: Ruxolitinib98	4.5328	-0.7239	2.4695	0.1037	4.4291	77.6465	71.8409	-2811.1185	-35.1899	-146.8470	-20.8923	5	5
 7: Ruxolitinib106	4.4877	-0.1754	2.5449	0.1111	4.3766	76.1452	70.4591	-2649.0881	-16.0843	-150.4136	-20.4772	4	5
 40: Ruxolitinib91	4.4479	-0.5910	2.6792	0.9304	3.5176	77.6273	72.8816	-2710.7163	-41.1353	-152.5142	-23.0784	5	5
 29: Ruxolitinib88	4.4090	-0.2392	2.6598	0.9133	3.4957	78.0864	73.3706	-2673.5685	-32.6799	-154.7157	-22.8725	5	5
 19: Ruxolitinib78	4.4023	-1.1873	2.2512	1.7199	2.6824	75.2310	71.7716	-2650.1222	-12.0999	-171.1656	-19.7607	4	4
 21: Ruxolitinib80	4.3227	-0.4348	2.6241	0.0046	4.3180	78.5254	72.6960	-2589.0071	-12.4922	-168.3894	-20.5144	3	4
 30: Ruxolitinib89	4.3168	-0.2755	2.5865	0.1482	4.1685	75.3819	69.7763	-2624.2568	-22.4951	-151.9337	-17.4897	4	4
 17: Ruxolitinib76	4.3099	-0.6287	2.6113	0.1842	4.1256	79.9635	74.4803	-2508.8148	2.8733	-166.5805	-20.3810	3	4
 26: Ruxolitinib85	4.3011	-0.5709	2.4576	0.4660	3.8351	76.3557	71.1786	-2830.5438	-35.9925	-150.8746	-22.5544	5	5
 13: Ruxolitinib72	4.2929	-0.3980	2.7061	4.8177	-0.5248	73.6385	74.3469	-2671.0236	-33.3180	-145.7857	-22.3464	5	5
 24: Ruxolitinib83	4.2129	-0.7393	2.3412	0.0651	4.1479	80.1730	75.7566	-2475.9473	-17.1052	-140.8939	-24.9075	3	5
 8: Ruxolitinib107	4.1672	-1.5594	2.4696	5.6082	-1.4410	79.1673	81.6565	-2723.8246	5.3180	-165.3421	-18.9996	3	4

Continúa en la siguiente página.

















	1: Total_Score	2: Crash	3: Polar	4: Strain	5: Total	6: Ligmin	7: Full	8: D_SCORE	9: PMF_SCORE	10: G_SCORE	11: CHEMSO	12: CSCORE	13: GLOBAL_C
 16: Ruxolitinib75	4.1460	-0.3988	2.5977	0.1651	3.9809	76.1753	70.8010	-2597.5360	-41.2692	-147.7713	-21.2940	4	5
 1: Ruxolitinib100	4.1184	-0.7509	2.4305	2.0023	2.1161	78.6910	76.2434	-2626.4867	-12.3951	-153.7719	-25.2671	4	4
 38: Ruxolitinib97	3.9474	-0.4931	2.5146	1.5368	2.4106	78.4316	75.1773	-2643.6068	-17.9361	-154.2246	-19.9748	4	5
 18: Ruxolitinib77	3.9368	-0.1672	2.6195	0.2528	3.6840	80.2547	75.2813	-2589.9282	-15.9993	-139.8733	-21.0274	4	5
 11: Ruxolitinib11	3.9051	-0.4601	2.6199	4.1787	-0.2736	75.4712	76.5821	-2710.9140	-41.1218	-126.9360	-21.4268	4	4
 12: Ruxolitinib71	3.8958	-0.4881	2.4755	1.8487	2.0471	80.4763	77.7127	-2633.5885	-29.2764	-151.9829	-21.7906	5	5
 6: Ruxolitinib105	3.8358	-0.7639	2.4020	0.4473	3.3885	76.2309	72.1833	-2487.9805	-24.3651	-148.7912	-23.8910	4	5
 37: Ruxolitinib96	3.8336	-0.6878	2.6280	6.1702	-2.3366	76.2098	79.7753	-2677.3395	-34.3065	-147.5751	-22.6347	5	5
 10: Ruxolitinib10	3.8312	-0.3410	2.4790	0.1324	3.6988	77.6872	72.6939	-2783.3848	-29.9658	-144.4306	-21.6439	5	5
 36: Ruxolitinib95	3.7748	-0.3124	2.4242	0.1703	3.6045	77.7842	73.0940	-2792.2475	-28.4395	-146.9892	-21.8698	5	5
 9: Ruxolitinib108	3.7192	-0.3654	2.4078	0.2386	3.4806	76.3191	71.6470	-2764.5506	-26.9498	-142.9063	-21.5956	5	5
 22: Ruxolitinib81	3.6834	-0.4185	2.4636	4.1332	-0.4498	75.3072	76.5535	-2643.4952	-21.6955	-144.4571	-19.2736	5	5
 23: Ruxolitinib82	3.6763	-0.4504	2.5185	0.8092	2.8672	77.2694	73.3992	-2668.5554	-23.3591	-142.3868	-20.1593	3	5
 78: Ruxolitinib7	3.6281	-0.6764	2.6265	3.0122	0.6160	77.3469	76.9031	-2661.2712	-34.1547	-158.6490	-22.4913	5	5
 34: Ruxolitinib93	3.6198	-0.8472	2.5270	0.9075	2.7123	78.4812	75.2320	-2675.7283	-24.1437	-163.8963	-21.4402	4	5
 4: Ruxolitinib103	3.6098	-0.5121	2.4410	0.3110	3.2988	76.1743	72.3656	-2784.1692	-29.9019	-143.6356	-21.0110	5	5
 33: Ruxolitinib92	3.5794	-0.7707	2.6498	2.4510	1.1285	73.7457	72.6255	-2388.3018	-39.6170	-138.1150	-20.4571	3	4
 3: Ruxolitinib102	3.5602	-1.0889	2.4932	0.2383	3.3219	78.2103	73.7257	-2859.4561	-36.3766	-152.8497	-22.1878	5	5
 15: Ruxolitinib74	3.4300	-0.5183	2.5154	3.6231	-0.1931	77.5784	77.8703	-2668.7793	-27.5001	-148.2956	-20.7876	5	5
 31: Ruxolitinib90	3.3199	-0.8448	2.5847	1.3787	1.9411	79.0148	77.2123	-2586.0019	-39.6353	-134.2753	-21.7623	5	5





















Anexo 4. Cuadro de resultados del *docking* de los confórmers 1-35 de Ruxolitinib® con el dominio JH2 de la forma mutante V617F de JAK2.

	1: Total_Score	2: Crash	3: Polar	4: Strain	5: Total	6: Ligmin	7: Full	8: D_SCORE	9: PMF_SCORE	10: G_SCORE	11: CHEMSCO	12: CSCORE	13: GLOBAL_C
 19: Ruxolitinib28	4.9818	-0.4418	2.6568	3.6048	1.3769	80.0149	78.5179	-2530.4987	-35.1302	-150.3516	-22.1250	5	5
 4: Ruxolitinib12	4.9169	-0.2171	2.5031	3.3734	1.5435	78.0567	75.9740	-2836.4234	-45.3078	-142.0572	-23.2492	5	4
 27: Ruxolitinib4	4.7963	-0.2665	2.4620	0.0758	4.7205	78.2217	72.2545	-2832.7251	-42.4819	-144.8838	-23.2833	5	4
 16: Ruxolitinib24	4.5475	-1.0676	2.5021	0.1913	4.3562	77.9563	72.0936	-2622.2681	0.6365	-176.5974	-20.9291	3	4
 25: Ruxolitinib34	4.3822	-0.2656	2.6882	0.1237	4.2585	77.5031	71.7541	-2610.1061	-37.4190	-154.9046	-22.2253	5	5
 2: Ruxolitinib10	4.3492	-0.2321	2.6401	3.5975	0.7517	74.9483	74.2874	-2522.6599	-35.9185	-137.1766	-21.6783	5	4
 21: Ruxolitinib30	4.3405	-0.4393	2.2888	2.1393	2.2011	76.4462	73.4747	-2561.7839	-26.0550	-149.5559	-21.3234	5	5
 3: Ruxolitinib11	4.3036	-0.6142	2.6508	2.6006	1.7030	78.5748	79.2378	-2661.0832	-42.5656	-138.2283	-21.7208	4	4
 29: Ruxolitinib6	4.2707	-0.2783	2.5899	3.3419	0.9288	74.7896	73.7929	-2537.3048	-37.6885	-139.9585	-21.7297	5	4
 31: Ruxolitinib8	4.0887	-0.3149	2.5813	0.2289	3.8598	83.3503	78.2892	-2529.0625	-43.5683	-144.5677	-22.1973	5	4
 24: Ruxolitinib33	3.9848	-0.4540	2.4615	0.1532	3.8315	74.5713	69.3987	-2478.7739	-18.9388	-141.5297	-20.4895	4	4
 13: Ruxolitinib21	3.9655	-0.9440	2.5444	0.0456	3.9199	76.7922	71.5004	-2768.3358	-37.0705	-150.4503	-23.1824	5	5
 30: Ruxolitinib7	3.9496	-0.1472	2.5501	2.8355	1.1141	75.3255	73.9189	-2454.9590	-29.9130	-126.5733	-19.7675	2	4
 17: Ruxolitinib25	3.9295	-0.5428	2.5686	0.2111	3.7184	76.4657	72.2087	-2460.8718	-25.3859	-132.3520	-19.5591	4	4
 10: Ruxolitinib18	3.8863	-0.2646	2.5700	0.0521	3.8342	83.1029	77.9268	-2502.3256	-32.6291	-133.5844	-21.4803	3	4
 20: Ruxolitinib29	3.8203	-1.0894	1.6535	4.0699	-0.2495	74.3607	74.8891	-2695.2828	-3.8412	-142.5273	-22.7261	4	3


















Continúa en la siguiente página.

	1: Total_Score	2: Crash	3: Polar	4: Strain	5: Total	6: Ligmin	7: Full	8: D_SCORE	9: PMF_SCORE	10: G_SCORE	11: CHEMSCO	12: CSORE	13: GLOBAL_C
 9: Ruxolitinib17	3.7309	-0.1372	2.5644	0.1927	3.5383	77.4495	72.6729	-2493.0866	-27.6839	-126.7619	-19.6861	4	4
 6: Ruxolitinib14	3.6233	-1.1287	2.4777	0.2081	3.4152	76.2764	71.6659	-2763.8291	-33.3013	-147.8740	-22.8618	5	5
 8: Ruxolitinib16	3.4987	-0.7046	2.5161	5.5398	-2.0411	74.4508	77.5003	-2481.2626	-33.5725	-142.7740	-21.8873	5	4
 14: Ruxolitinib22	3.4765	-0.8960	2.6136	0.6556	2.8209	84.4629	81.2694	-2348.8833	-36.6406	-133.4021	-20.6851	3	4
 7: Ruxolitinib15	3.4381	-0.2769	2.3945	0.1191	3.3190	75.6584	71.1778	-2247.0075	-34.1040	-133.0168	-19.3569	2	3
 12: Ruxolitinib20	3.3734	-0.4626	2.6066	0.2554	3.1180	81.0879	78.5470	-2444.1176	-24.9083	-126.5048	-19.6510	2	4
 15: Ruxolitinib23	3.3599	-0.6683	2.4810	1.8408	1.5191	76.6616	74.7209	-2646.0694	-46.4699	-166.8826	-22.6592	4	5
 11: Ruxolitinib19	3.2668	-0.8721	2.4024	0.0614	3.2054	78.3382	74.0109	-2767.8441	-26.2801	-152.9580	-21.8375	4	5
 26: Ruxolitinib35	3.1545	-0.1380	2.5797	0.5067	2.6478	75.9075	72.3331	-2303.2508	-36.9055	-109.1578	-18.0671	2	2
 1: Ruxolitinib27	3.1038	-0.8048	1.1978	0.2015	2.9023	78.3857	74.4676	-2781.7975	-22.7194	-147.2112	-21.7680	5	5
 18: Ruxolitinib26	3.1038	-0.8048	1.1978	0.2015	2.9023	78.3857	74.4676	-2781.7975	-22.7194	-147.2112	-21.7680	5	5
 22: Ruxolitinib31	3.0396	-1.6334	1.8499	1.9624	1.0772	79.8479	78.3937	-2450.2268	11.9867	-161.3816	-25.5375	3	4
 28: Ruxolitinib5	2.8331	-1.0666	1.4641	0.1285	2.7046	82.1408	78.4896	-2484.8667	-25.7446	-133.6997	-22.6263	3	4
 23: Ruxolitinib32	2.8072	-1.9767	2.4954	0.0988	2.7084	74.2656	71.0226	-2755.9716	-39.9832	-144.7834	-23.8919	5	4
 32: Ruxolitinib9	2.7986	-0.4437	2.4830	0.1496	2.6490	78.4214	74.8452	-2332.7228	-19.0557	-118.1632	-19.5233	2	3
 5: Ruxolitinib13	2.5547	-0.4890	1.1961	1.5098	1.0448	74.1957	72.7852	-2689.1580	-14.2140	-133.0737	-20.2915	4	2



















Anexo 5. Cuadro de resultados del *docking* de los confórmers 36-70 de Ruxolitinib® con el dominio JH2 de la forma mutante V617F de JAK2.

	1: Total_Score	2: Crash	3: Polar	4: Strain	5: Total	6: Ligmin	7: Full	8: D_SCORE	9: PMF_SCORE	10: G_SCORE	11: CHEMSCO	12: CSCORE	13: GLOBAL_C
 4: Ruxolitinib38	4.8953	-0.5388	2.6751	0.3633	4.5320	77.4746	71.9126	-2672.2401	-37.9229	-160.6856	-22.9172	5	5
 13: Ruxolitinib48	4.8670	-0.6518	2.6142	2.7887	2.0783	79.8942	77.7214	-2532.6547	-31.7614	-159.8523	-22.4818	4	5
 8: Ruxolitinib42	4.8144	-0.3761	2.6376	0.0884	4.7260	78.9965	72.6164	-2687.2890	-31.7887	-160.2605	-23.2015	5	5
 7: Ruxolitinib41	4.6590	-0.3854	2.4713	0.3133	4.3456	81.5794	75.8539	-2592.4630	-26.9121	-161.0026	-22.3803	4	5
 18: Ruxolitinib53	4.6065	-0.3652	2.5406	0.0274	4.5791	73.7579	67.5762	-2789.2237	-45.3201	-143.2383	-23.0854	5	5
 16: Ruxolitinib51	4.5024	-0.3399	2.5246	1.2776	3.2248	76.8043	72.7371	-2748.9444	-43.7446	-143.1832	-23.3769	5	5
 31: Ruxolitinib66	4.4388	-0.4746	2.4546	1.2428	3.1960	74.1486	70.3513	-2817.0326	-42.8714	-146.5215	-23.3835	5	5
 33: Ruxolitinib68	4.4354	-0.4252	2.4730	0.9895	3.4459	76.6836	72.5345	-2758.3577	-44.2779	-142.5705	-23.3629	5	5
 9: Ruxolitinib43	4.2816	-1.2124	2.3815	1.6931	2.5885	78.1314	74.9999	-2831.4898	-29.3439	-166.6432	-22.7831	5	5
 22: Ruxolitinib57	4.2358	-1.2279	2.5229	0.2180	4.0177	77.2464	71.8225	-2629.8136	-0.9374	-173.8887	-20.4540	3	4
 32: Ruxolitinib67	4.1609	-0.5038	2.2634	0.2237	3.9372	81.3462	76.1672	-2505.7792	-17.0514	-158.9423	-24.6054	5	5
 10: Ruxolitinib45	4.1607	-0.2229	2.6599	1.6572	2.5035	76.6290	73.4754	-2555.2756	-36.3197	-141.8716	-21.8634	4	5
 6: Ruxolitinib40	3.9816	-0.4658	2.4609	0.0237	3.9580	74.3174	68.9741	-2471.0261	-25.3435	-139.5126	-20.4629	5	4
 2: Ruxolitinib36	3.8823	-0.4424	2.5603	0.2444	3.6379	77.0432	72.1320	-2492.9347	-21.9230	-144.0526	-21.7618	4	5
 20: Ruxolitinib55	3.8627	-0.5364	2.4996	0.2700	3.5927	74.8135	71.0833	-2341.1189	-21.0838	-125.6750	-17.4585	2	2
 30: Ruxolitinib65	3.8275	-0.2310	2.6594	0.1885	3.6390	78.9781	74.0655	-2520.6505	-33.8465	-138.9717	-21.8449	4	4
 12: Ruxolitinib47	3.7291	-0.1014	2.5806	2.3464	1.3828	76.6193	74.7525	-2637.2758	-45.1468	-132.4971	-21.9563	4	4
 5: Ruxolitinib39	3.6913	-1.4109	2.4745	1.3702	2.3211	73.8476	70.7142	-2656.4261	-16.0236	-165.4695	-21.8230	5	4





















Continúa en la siguiente página.

	1: Total_Score	2: Crash	3: Polar	4: Strain	5: Total	6: Ligmin	7: Full	8: D_SCORE	9: PMF_SCORE	10: G_SCORE	11: CHEMSCO	12: CSCORE	13: GLOBAL_C
 35: Ruxolitinib70	3.6852	-0.7033	2.4250	2.9074	0.7778	76.2190	76.5279	-2551.8310	-27.5854	-124.5400	-19.3534	2	4
 25: Ruxolitinib60	3.6785	-0.7034	2.6456	2.8648	0.8138	78.5090	77.5556	-2581.6266	-45.5813	-152.2536	-22.4066	5	5
 19: Ruxolitinib54	3.6497	-0.2489	2.5218	0.0516	3.5981	79.8182	74.9608	-2432.7273	-31.3557	-122.4154	-19.6596	4	3
 17: Ruxolitinib52	3.6270	-0.6942	2.6134	4.6789	-1.0519	77.0390	78.4591	-2577.4255	-44.0219	-147.6380	-21.9798	5	5
 21: Ruxolitinib56	3.5153	-0.2330	2.5308	0.2553	3.2601	74.2350	70.1921	-2329.6098	-40.0846	-127.9349	-19.7665	4	3
 1: Ruxolitinib44	3.5033	-0.3693	2.5411	0.1106	3.3927	74.9363	70.3562	-2516.2882	-27.5903	-132.7057	-19.2412	4	4
 11: Ruxolitinib46	3.3832	-1.2482	2.5306	4.0155	-0.6323	74.1443	74.9979	-2736.8920	-22.0867	-152.2308	-22.1904	5	5
 27: Ruxolitinib62	3.2488	-1.4605	2.1155	3.8019	-0.5531	78.7560	79.5028	-2415.1181	-21.2097	-151.8360	-24.5446	3	4
 29: Ruxolitinib64	3.1444	-0.4596	2.5552	0.0045	3.1399	75.5701	71.6866	-2389.0447	-42.6521	-123.7913	-19.8007	2	3
 28: Ruxolitinib63	3.1443	-0.2588	2.5455	1.1525	1.9918	77.4579	74.7690	-2438.2550	-32.4248	-123.7025	-18.8673	3	3
 15: Ruxolitinib50	3.1225	-1.6932	2.3563	4.1102	-0.9877	73.7898	75.1237	-2729.7009	-17.0901	-156.2509	-22.0770	5	5
 14: Ruxolitinib49	2.9836	-0.6039	2.4542	1.6660	1.3176	74.4074	73.7273	-2595.0242	-30.1827	-119.9468	-19.0531	4	4
 24: Ruxolitinib59	2.9832	-0.6749	2.6580	0.7799	2.2033	76.6793	73.7048	-2333.9994	-43.7073	-144.1175	-20.4449	4	4
 23: Ruxolitinib58	2.8451	-0.8869	2.6825	2.0200	0.8252	78.4794	77.6381	-2561.9771	-9.9598	-117.0655	-19.5473	2	3
 26: Ruxolitinib61	2.5285	-1.3573	2.6162	2.5656	-0.0371	77.7535	78.7336	-2708.0630	-0.3291	-120.7281	-20.1014	2	2
 34: Ruxolitinib69	2.5107	-0.3990	1.0960	0.5198	1.9909	75.7844	73.0967	-2720.6392	-20.4213	-147.8029	-20.1277	5	4
 3: Ruxolitinib37	2.3561	-0.5254	1.2976	0.0314	2.3247	75.9433	72.8049	-2730.3076	-19.9278	-149.5857	-20.2443	5	4

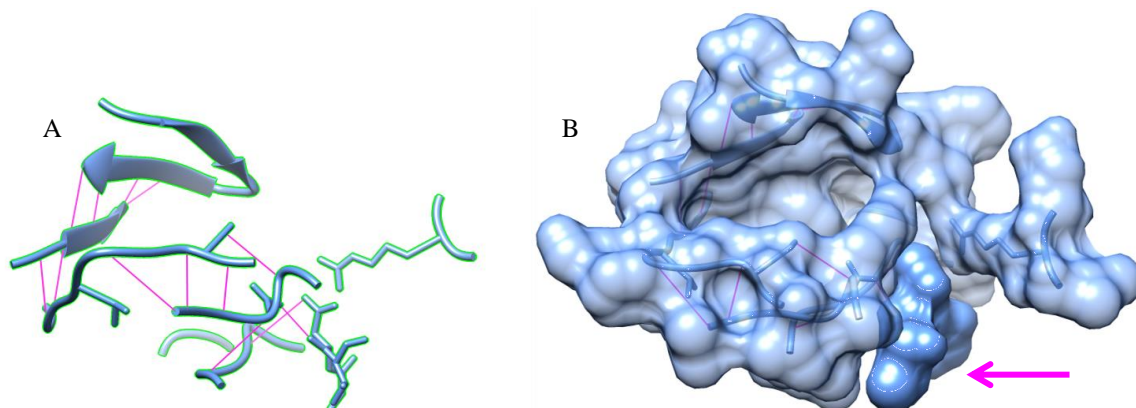
Anexo 6. Cuadro de resultados del *docking* de los conformeros 71-110 de Ruxolitinib® con el dominio JH2 de la forma mutante V617F de JAK2.

	1: Total_Score	2: Crash	3: Polar	4: Strain	5: Total	6: Ligmin	7: Full	8: D_SCORE	9: PMF_SCORE	10: G_SCORE	11: CHEMSCO	12: CSCORE	13: GLOBAL_C
 25: Ruxolitinib84	5.2768	-0.5417	2.6103	4.0567	1.2201	80.0820	78.8098	-2552.5817	-29.1048	-156.8949	-22.9150	5	5
 30: Ruxolitinib89	4.6166	-0.1907	2.4720	1.4494	3.1672	78.1039	73.8282	-2831.0746	-44.1761	-144.3784	-22.8396	4	5
 15: Ruxolitinib74	4.6045	-1.1603	2.5237	0.3518	4.2527	77.5828	71.9454	-2615.7492	3.6329	-176.4855	-21.1237	4	4
 1: Ruxolitinib100	4.4614	-0.4857	2.3577	0.1601	4.3012	80.8269	75.1126	-2580.9598	-15.8407	-153.6833	-24.8100	4	4
 40: Ruxolitinib94	4.4231	-0.3380	2.5835	0.2867	4.1364	77.3155	72.0716	-2487.6653	-30.1440	-160.4234	-21.9665	5	5
 8: Ruxolitinib107	4.4101	-0.3730	2.6000	0.0292	4.3810	80.0749	74.1611	-2856.3599	-47.0716	-148.5619	-22.6323	5	5
 39: Ruxolitinib98	4.3929	-0.4728	2.6840	0.3424	4.0505	81.2061	76.0878	-2600.0929	-34.4158	-161.8248	-22.9387	5	5
 19: Ruxolitinib78	4.2720	-0.4062	2.5366	0.1811	4.0909	84.4734	79.0254	-2541.0691	-39.1783	-149.5327	-22.4495	4	5
 37: Ruxolitinib96	4.1359	-0.5343	2.5606	0.2683	3.8676	83.9907	78.7947	-2504.8054	-40.4997	-147.5736	-21.5124	4	5
 7: Ruxolitinib106	4.1128	-0.8142	2.6201	4.1164	-0.0036	77.3381	77.3429	-2457.0664	-23.9747	-159.1059	-22.1510	3	5
 23: Ruxolitinib82	4.0111	-0.3285	2.3688	3.0761	0.9351	74.3142	73.6905	-2564.7528	-34.5097	-120.5674	-20.0604	4	4
 24: Ruxolitinib83	3.9504	-0.4372	2.6471	0.2627	3.6877	83.9015	78.9231	-2485.0741	-38.9966	-142.3413	-21.9284	3	5
 38: Ruxolitinib97	3.9460	-0.8573	2.6363	0.0838	3.8622	79.0105	74.3469	-2689.5323	-33.1481	-160.4384	-22.8090	5	5
 28: Ruxolitinib87	3.8505	-0.7512	2.6588	0.0912	3.7593	78.1941	73.1190	-2663.1564	-38.5777	-139.2094	-22.0143	5	5
 21: Ruxolitinib80	3.7753	-0.1678	2.3913	3.7548	0.0204	75.8193	75.7917	-2538.2369	-38.9078	-129.2714	-20.8427	4	4
 31: Ruxolitinib90	3.7734	-0.4271	2.6713	3.0255	0.7480	78.1841	77.4776	-2758.1650	-37.5027	-147.2253	-22.1821	5	5
 16: Ruxolitinib75	3.7522	-0.9804	2.4847	4.6099	-0.8577	77.2022	78.3600	-2489.8877	-21.5314	-154.2149	-22.0364	4	5
 18: Ruxolitinib77	3.7260	-0.5385	2.4917	0.1456	3.5803	80.2823	75.4917	-2853.7220	-28.3082	-154.6041	-21.8965	5	5

Continúa en la siguiente página.

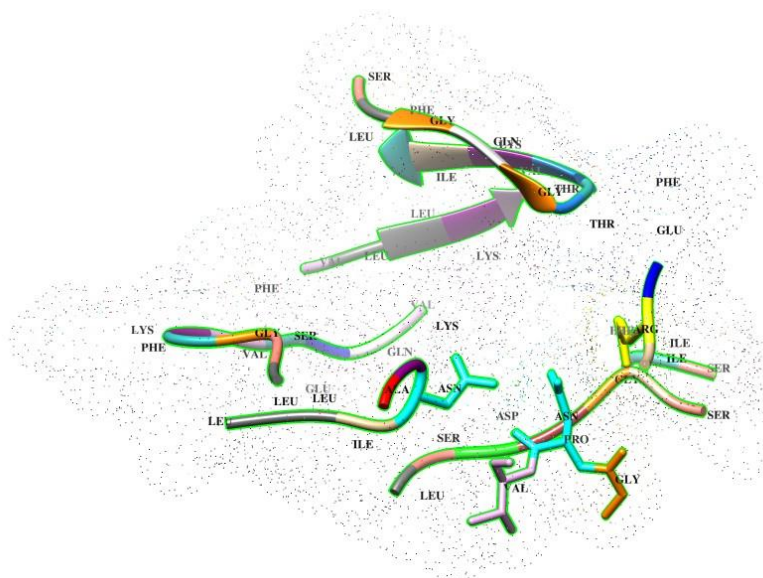
	1: Total_Score	2: Crash	3: Polar	4: Strain	5: Total	6: Ligmin	7: Full	8: D_SCORE	9: PMF_SCORE	10: G_SCORE	11: CHEMSCO	12: CSCORE	13: GLOBAL_C
 27: Ruxolitinib86	3.6962	-0.9003	2.5662	0.2449	3.4513	76.8069	72.1477	-2718.5305	-31.0805	-144.3305	-22.7975	5	5
 4: Ruxolitinib103	3.6751	-0.8297	2.6368	0.0220	3.6530	80.0149	75.1295	-2713.6273	-29.4710	-155.2519	-23.7349	5	5
 17: Ruxolitinib76	3.6217	-0.3149	2.5610	2.6453	0.9764	75.4293	74.4695	-2524.1686	-39.4241	-124.0290	-19.4488	3	4
 26: Ruxolitinib85	3.5603	-0.3142	2.4666	0.0568	3.5036	76.5560	72.2069	-2285.9110	-37.9692	-122.0405	-19.0165	2	3
 34: Ruxolitinib93	3.4960	-0.4992	2.3981	0.1605	3.3355	79.9905	75.4912	-2850.6873	-31.1018	-154.1640	-21.9293	5	5
 35: Ruxolitinib94	3.4859	-1.2802	2.4338	3.8900	-0.4041	80.8542	82.6558	-2606.7711	-10.2380	-143.8850	-24.9490	4	4
 5: Ruxolitinib104	3.4717	-0.5809	2.6688	0.1424	3.3293	76.0023	71.5081	-2600.2611	-33.5040	-145.5478	-22.1548	5	5
 13: Ruxolitinib72	3.4503	-0.1088	2.5390	0.0624	3.3878	78.2463	73.6728	-2495.0299	-30.6405	-123.9076	-19.6119	4	4
 22: Ruxolitinib81	3.4245	-0.6717	2.3666	2.6392	0.7853	76.1646	75.1045	-2622.1361	-42.7666	-154.0999	-22.2989	5	5
 10: Ruxolitinib10	3.3634	-1.3838	2.5289	0.2708	3.0926	78.7009	74.6804	-2786.6229	-27.9461	-159.6469	-23.9514	5	5
 36: Ruxolitinib95	3.3193	-0.3964	1.7124	0.3242	2.9951	80.0208	76.3199	-2679.3518	-17.0488	-131.3734	-20.5920	3	3
 32: Ruxolitinib91	3.3027	-0.1303	2.5888	0.0582	3.2445	76.4812	72.3770	-2281.8194	-37.1544	-112.0833	-18.4752	2	2
 12: Ruxolitinib71	3.2851	-1.0087	2.4348	0.2179	3.0672	81.5613	77.4206	-2836.3167	-38.4394	-138.6676	-22.2484	5	5
 29: Ruxolitinib88	3.2142	-0.8379	2.3916	0.9379	2.2763	79.5917	76.5187	-2791.0490	-28.0059	-150.7256	-21.8764	5	5
 33: Ruxolitinib92	3.1594	-1.7141	2.2773	3.8488	-0.6894	78.6901	80.1603	-2390.0731	-23.0891	-142.9240	-24.3527	3	4
 14: Ruxolitinib73	3.0597	-1.7392	2.4005	0.7788	2.2809	75.1289	72.0514	-2702.8947	-15.2356	-166.9301	-21.3050	4	4
 9: Ruxolitinib108	2.9897	-0.5827	0.6086	1.0445	1.9452	77.5039	75.2701	-2765.9362	-22.4281	-148.4389	-21.9276	5	5
 2: Ruxolitinib101	2.9715	-0.3851	2.6141	0.0051	2.9664	77.9993	74.0226	-2343.6629	-44.8977	-139.7134	-19.6383	3	4
 3: Ruxolitinib102	2.9501	-0.3530	1.7768	0.0493	2.9008	81.2070	77.3547	-2504.2736	-29.4188	-139.6178	-21.5812	4	5
 6: Ruxolitinib105	2.9399	-2.0207	2.4872	3.0851	-0.1452	76.6843	76.8803	-2673.0466	-6.3397	-154.6527	-21.3845	4	4

Anexo 7. Gráfica de la interacción de los puentes de hidrógeno intramoleculares del sitio activo del dominio JH2 de JAK2.



En la gráfica se muestran los enlaces de puentes de hidrógeno intramoleculares dentro del sitio de enlace del dominio JH2 de JAK2. A) Estructuras secundarias del sitio de enlace del dominio JH2 de JAK2, con los puentes de hidrógeno intramoleculares en rosado, se puede observar que en total existen 12 interacciones por enlaces de puentes de hidrógeno en el sitio activo de la proteína. B) Conformación tridimensional de superficie de la proteína con los enlaces de puentes de hidrógeno señalados previamente indicados en rosado, el sitio de interacción principal con el ligando se encuentra en color sólido y señalado por una flecha rosada.

Anexo 8. Gráfica de la distribución de los aminoácidos que conforman el sitio activo del dominio JH2 de JAK2.



En la gráfica se pueden observar los aminoácidos identificados que forman parte del sitio activo del dominio JH2 de JAK2, cada color representa al aminoácido identificado con la etiqueta de la abreviatura del nombre en negro. Se puede observar que los aminoácidos que van a estar más propensos a interactuar con el fármaco son las dos asparaginas de la parte inferior del sitio activo.



**USAC**  
TRICENTENARIA  
Universidad de San Carlos de Guatemala  
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia



**QTC-USAC**  
Unidad de Investigación en  
Química Teórica y Computacional

Guatemala, 14 de Julio de 2014

Licenciado  
José Rodrigo Vargas  
Universidad Del Valle de Guatemala  
Guatemala, Ciudad

Estimado Lic. Vargas.

En respuesta a su nota del 02 de Julio del corriente año, relacionada con su solicitud de autorización para utilizar SYBYL X, específicamente el Programa Surfex Dock, instalado en nuestra Unidad para uso en el trabajo de Tesis *Ad gradum* titulada "Análisis del impacto de las diferencias estructurales entre la forma nativa del receptor de membrana Janus Quinasa 2 (JAK2) y la forma mutada predominante V617F en la interacción con el fármaco Ruxolitinib® dirigido a neoplasias mieloproliferativas", le comunico que se autoriza la utilización de dicho software en las fechas y horas por Uds. requeridos.

Se les requiere únicamente velar por el adecuado uso del equipo y software que se pone a su disposición, recordándoles el brindar los créditos correspondientes al ser publicado por cualquier medio dicha investigación.

Sin otro particular, felicitándolo por la línea de investigación que desarrollan en Química Computacional y reiterándole nuestra disposición de realizar investigaciones conjuntas en beneficio del avance de la ciencia y la tecnología en el país, con las muestras de mi consideración y estima;

**ID Y ENSEÑAD A TODOS**

Oscar Manuel Cobar Pinto, Ph.D.  
Coordinador

Unidad de Química Teórica y Computacional  
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia



### XIII. GLOSARIO

Actividad farmacológica: son los efectos beneficiosos o adversos que puede producir una droga sobre un ser vivo. Si el fármaco consiste en una mezcla compleja, la actividad farmacológica vendrá dada por los principios activos o farmacóforos, pudiendo ser alterados por los demás constituyentes (Montoro, 2013).

Alineamiento de secuencias: representación y comparación de dos o más secuencias de ADN, ARN o estructuras primarias proteicas para evaluar zonas homólogas, indicando relaciones funcionales o evolutivas posibles entre los genes o proteínas estudiados (Cañizares & Blanca, 2014).

Alotrasplante: trasplante en el que las células, tejidos u órganos a ser donados difieren genéticamente entre el donante y el receptor, siendo de la misma especie pero con un genotipo distinto (Abbas, *et al*, 2008).

Autofosforilación: la fosforilación de un residuo aminoácido de una proteína catalizada por la misma molécula (Lehninger, 2009).

Blanco terapéutico: el lugar del organismo en el que un fármaco ejerce su acción (Delgado, *et al*, 2004).

Bucle: curva en forma helicoidal que se forma en ciertas partes de la conformación tridimensional de una enzima (Devlin, 2005).

Bucle catalítico: sitio de unión de uno o más sustratos por el catalizador, para llevar a cabo el ciclo catalítico. Se encuentra en el sitio activo de la enzima (Devlin, 2005).

Bucle de activación: sitio que da la señal para iniciar la actividad catalítica al unirse al sustrato o sustratos correspondientes, generalmente se encuentra adyacente al sitio activo de la enzima (Devlin, 2005).

Cambio conformacional: cambio en el ordenamiento espacial de grupos sustituyentes de una enzima que tienen libertad para adoptar posiciones diferentes en el espacio, sin rotura de enlaces (Lehninger, 2009).

Centro quiral: átomo con sustituyentes dispuestos de manera que la molécula no se puede superponer con su imagen especular (Lehninger, 2009).

Codón: secuencia de tres nucleótidos adyacentes en un ácido nucleico que codifica un aminoácido específico (Lehninger, 2009).

Confórmero: representación de una disposición espacial única de un conjunto de estereoisómeros que se caracterizan por una conformación que corresponde a un mínimo distinto potencial de energía (Lehninger, 2009).

Cromatina: complejo filamentos de ADN, histonas y otras proteínas que constituyen el cromosoma eucariótico (Hartl & Ruvolo, 2011).

Delección: mutación cromosómica consistente en la pérdida de un fragmento de ADN de un cromosoma, originando un desequilibrio (Hartl & Ruvolo, 2011).

Diasterómero: clase de estereoisómeros que no son superponibles pero tampoco son imagen especular uno del otro (Lehninger, 2009).

Dímero: proteína compuesta por dos subunidades proteicas, pueden ser idénticas o diferentes (Lehninger, 2009).

Docking: acoplamiento proteico (Young, 2001).

Dominio: unidad estructural distintiva de un polipéptido; los dominios pueden tener funciones separadas y se pueden plegar en unidades compactas independientes (Lehninger, 2009).

Enantiómero R: estereoisómero especular no superponible correspondiente a la disposición de los grupos con rotación en dirección de las manecillas del reloj (Lehninger, 2009).

Endosoma: organelo celular delimitado por una sola membrana, se encarga de transportar el material que se incorpora mediante endocitosis a la célula, mediado por un receptor extracelular (Campbell & Reece, 2007).

Exón: segmento de un gen eucariótico que codifica una porción del producto final de un gen; porción de ARN que permanece después de la maduración postranscripción y que se transcribe en proteína o se incorpora a la estructura de un ARN (Lehninger, 2009).

Ezrina: proteína de membrana que actúa como sustrato para la proteína tirosina quinasa a nivel de microvelosidades (Lehninger, 2009).

Farmacocinética: estudio de los múltiples procesos que el organismo desarrolla sobre el fármaco, desde su absorción hasta su eliminación del organismo (Lüllmann, *et al*, 2010).

Farmacodinámica: estudio del efecto bioquímico y fisiológico que desarrolla el fármaco en el organismo y su mecanismo de acción y la relación entre la concentración del fármaco y el efecto de éste sobre el organismo (Lüllmann, *et al*, 2010).

Farmacóforo: es el conjunto de características estéricas y electrónicas que es necesario para asegurar las interacciones supramoleculares óptimas con una estructura diana biológica específica y para activar o bloquear su respuesta biológica (Lüllmann, *et al*, 2010).

Farmacoterapia: ciencia y aplicación de los medicamentos para la prevención y tratamiento de las enfermedades.

Flebotomía: operación quirúrgica que consiste en hacer una incisión en una vena para evacuar una cierta cantidad de sangre (Lüllmann, *et al*, 2010).

Gen: segmento de un cromosoma que codifica una sola cadena polipeptídica funcional o molécula de ARN (Lehninger, 2009).

Granulocito: tipo de glóbulos blancos, conocidos como leucocitos polimorfonucleares, debido a que el núcleo puede presentar formas variadas, incluyen a los neutrófilos, eosinófilos y basófilos. Se les llama granulocitos debido a que están compuestos de pequeños gránulos que contienen las proteínas importantes (Campbell & Reece, 2007).

Hélice  $\alpha$ : conformación helicoidal de una cadena polipeptídica, normalmente dextrógira, en la que se produce la máxima formación de puentes de hidrógeno intracatenarios; es una de las estructuras secundarias más frecuentes en las proteínas (Lehninger, 2009).

Hematopoyético: relativo al sistema hematopoyético, encargado de la producción de células sanguíneas (Campbell & Reece, 2007).

Heterocigoto: estado de herencia en el que los alelos del mismo locus en los cromosomas homólogos son diferentes. Individuo que para un gen específico tiene en cada cromosoma homólogo un alelo distinto (Hartl & Ruvolo, 2011).

Hojas  $\beta$ : ordenamiento lateral por puente de hidrógeno de cadenas polipeptídicas en la conformación  $\beta$  extendida (Lehninger, 2009).

Homocigoto: organismo o célula en la que los alelos de un mismo locus determinado son idénticos a los del cromosoma homólogo, ya sean recesivos o dominantes (Hartl & Ruvolo, 2011).

Impedimento Estérico: efecto producido cuando el volumen ocupado por parte de una molécula impide que otra parte de la misma reaccione (Lehninger, 2009).

**Inhibidor:** moléculas que se unen a enzimas y disminuyen o interrumpen su actividad (Lehninger, 2009).

**Inhibidor selectivo:** es un inhibidor que ataca únicamente a una enzima específica o a una clase o familia de enzimas diferenciadas por su sitio activo o conformación (Lehninger, 2009).

**Inserción:** mutación por la que se añaden una o más pares de bases a una molécula de ADN (Hartl & Ruvolo, 2011).

**Isoforma:** versión de una proteína con pequeñas diferencias de otra forma de la misma proteína. Se pueden producir diferentes formas de una proteína a partir de genes diferentes pero relacionados entre sí, o pueden derivarse del mismo gen por empalme alternativo (Lehninger, 2009).

**Ligando:** pequeña molécula que se une específicamente a otra mayor (Lehninger, 2009).

**Mielofibrosis idiopática:** trastorno de la médula ósea en el cual la médula es reemplazada por tejido cicatricial fibroso (Rodak, 2005).

**Mielosupresor:** molécula que causa supresión o interfiere en la actividad de las células madre hematopoyéticas de la médula ósea, encargadas de la producción de hematíes, leucocitos y plaquetas (Rodak, 2005).

**Modelado molecular:** término general que engloba métodos y técnicas computacionales para modelar, imitar y predecir el comportamiento de las moléculas (Young, 2001).

**Moesina:** proteína codificada por el gen MSN, miembro de la familia de proteínas ERM que incluye a la ezrina y radixinina (Lehninger, 2009).

**Mutación somática:** mutación que afecta a una célula somática (y a la progenie de ésta) pero no a las células de la línea germinal; por consiguiente no se transmite a la descendencia del individuo que la porta (Hartl & Ruvolo, 2011).

**Neoplasias mieloproliferativas:** tipo de enfermedad por la que la médula ósea produce demasiadas células de glóbulos rojos, plaquetas o ciertos glóbulos blancos. Algunas neoplasias pueden convertirse en leucemia mieloide aguda (Rodak, 2005).

**Oligómero:** polímero corto, normalmente de aminoácidos, azúcares o nucleótidos (Lehninger, 2009).

**Patrón farmacofórico:** características electrónicas y estructurales comunes en un conjunto de compuestos que presentan una dada actividad, las cuales se consideran que son los mínimos requerimientos comunes que explican la acción biológica observada (Palestro, *et al*, 2009).

**Pirazol:** Es un compuesto orgánico heterocíclico que consiste en un anillo aromático simple de tres átomos de carbono y dos de nitrógeno en posiciones adyacentes. También se denomina pirazol a cualquier compuesto que contenga dicho anillo. Los pirazoles tienen efectos farmacológicos en el ser humano, y se clasifican como alcaloides (ChEMBL).

**Pirimidina:** compuesto orgánico, similar al benceno, pero con un anillo heterocíclico: dos átomos de nitrógeno sustituyen al carbono en las posiciones 1 y 3. Tres bases de los ácidos nucleicos (citosina, timina y uracilo) son derivados pirimidínicos (ChEMBL).

**Pirrol:** compuesto químico orgánico aromático y heterocíclico, un anillo de cinco miembros con la fórmula  $C_4H_5N$ . Los pirroles son compuestos de anillos aromáticos más largos, incluyendo las porfirinas de hemo, las clorinas y bacterioclorinas, de clorofilas y el anillo de corrina (ChEMBL).

**Pirrolpirimidina:** compuesto orgánico heterocíclico, formado por un grupo pirrol y una pirimidina (ChEMBL).

**Plaquetoféresis:** procedimiento para la eliminación de las plaquetas de la sangre extraída, sucediendo la infusión en el donante del resto de la sangre (Rodak, 2005).

**Policitemia Vera:** enfermedad de la médula ósea que lleva a un incremento anormal en el número de células sanguíneas, principalmente glóbulos rojos (Rodak, 2005).

**Proliferación clonal:** proceso de proliferación celular en la cual toda la progenie tiene el mismo genoma de la célula madre (Instituto Nacional de Cáncer).

**Proteína Recombinante:** es una forma manipulada de proteína, que se genera de varios modos para producir grandes cantidades de proteína, modificar secuencias genéticas y hacer productos comerciales útiles. Se obtienen a partir de una especie o una línea celular distinta a la célula original (Zhou, *et al*, 2014).

**Protomol:** representación idealizada del sitio activo, se refiere al espacio donde puede interaccionar el ligando; así como, representa un mapa de complementariedad de la cavidad del sitio activo, tomando en cuenta las interacciones hidrofóbicas y lipofóbicas del sitio (Tripos, 2006).

**Pseudoquinasa:** dominio catalíticamente inactivo parecido a una quinasa (Lehninger, 2009).

**Química computacional:** rama de la química cuántica que utiliza programas informáticos para realizar el estudio de las propiedades de moléculas al reproducirlas, y, en menor medida, sólidos extendidos (Young, 2001).

Quinasa: enzima que cataliza la fosforilación de ciertas moléculas por el ATP (Lehninger, 2009).

Radiación ionizante: radiaciones con energía suficiente para ionizar la materia, al extraer los electrones de sus estados ligados al átomo (NIH, 2011).

Radixina: proteína codificada por el gen RDX, perteneciente a la familia de proteínas ERM (Lehninger, 2009).

Regla de Lipinski: expresa el hecho conocido de que la biodisponibilidad oral supone un balance entre la solubilidad acuosa del compuesto activo y su habilidad para difundir pasivamente a través de diferente tipo de membranas biológicas. También se le conoce como “Regla de los Cinco” o “Regla de Pfizer” (Talevi, *et al*, 2006).

Residuo: unidad sencilla dentro de un polímero. El término refleja el hecho de que azúcares, nucleótidos y aminoácidos pierden unos cuantos átomos al incorporarse en sus polímeros respectivos (Lehninger, 2009).

Secuencia consenso: secuencia de ADN o aminoácidos que consiste en residuos que aparecen con mayor frecuencia en cada posición dentro de un conjunto de secuencias similares (Lehninger, 2009).

Sitio activo: región de la superficie de una enzima que fija la molécula de sustrato y la transforma catalíticamente (Lehninger, 2009).

Sitio Alostérico: sitio específico en la superficie de una molécula enzimática alostérica al que se une la molécula moduladora o efectora (Lehninger, 2009).

Sustrato: compuesto específico sobre el que actúa la enzima (Lehninger, 2009).

Transcrito: Es una molécula intermediaria, también conocida como ácido ribonucleico mensajero (ARNm), que se encarga de llevar la información genética del núcleo hacia el citoplasma donde el mensaje genético es descifrado para producir la proteína correspondiente durante el proceso de producción de las proteínas necesarias para el desarrollo y funcionamiento de las células (Hartl & Ruvolo, 2011).

Trans-fosforilación: fosforilación cruzada intramolecular en una enzima dada, es uno de los mecanismos utilizados por las proteínas de la familia JAK (Lehninger, 2009).

Trombocitemia esencial: enfermedad de la médula ósea que se caracteriza por un aumento persistente de la cifra de plaquetas y una predisposición a padecer trombosis o hemorragia (Rodak, 2005).

Voxel: se refiere a la unidad cúbica que forma parte de un objeto tridimensional, y se constituye la más mínima unidad de un conjunto tridimensional que puede ser procesada (Tripos, 2006).