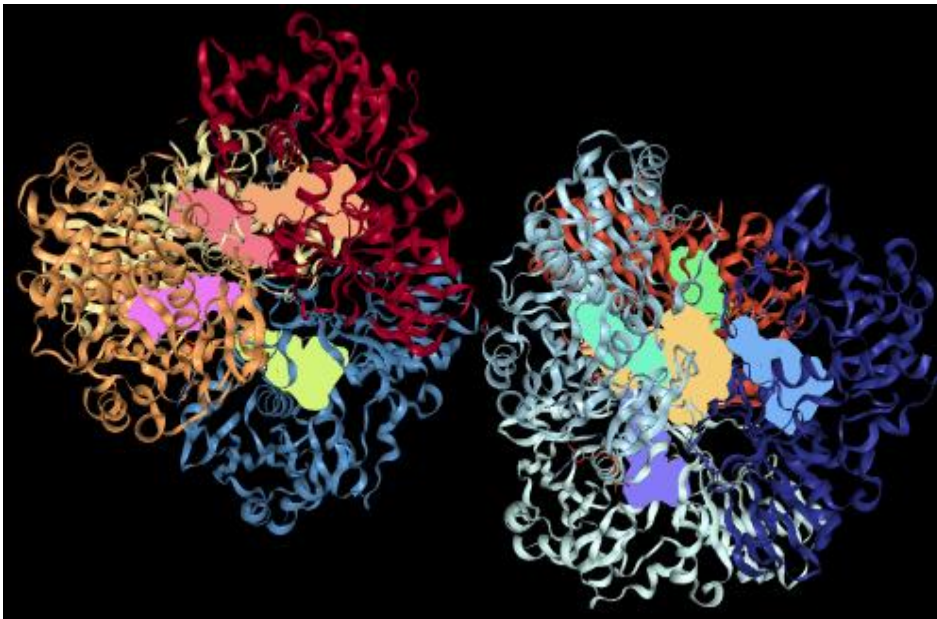


# Búsqueda de Dianas Farmacológicas en Enzimas de la Glicólisis implicadas en Cáncer

Procura de Dianas Farmacológicas en enzimas da Glicólisis implicadas no Cancro

Search for pharmacologic targets in Glycolysis enzymes involved in Cancer.



TFM-Máster BCMyG-UDC.2023

Por: JUAN JOSÉ SEIJO VIZOSO

DIRECTOR: DR. MANUEL BECERRA FERNANDEZ. Profesor de bioquímica y biología molecular de la Facultad de Ciencias de la UDC.

Agradecemento a:

Facultade de Ciencias da UDC por poder participar e compartir este mestrado de BCMyG que tanta ilusión me fixo.

Familia:

Por una morea de ausencias adicadas a navegar na nube da ciencia.

El Dr. Manuel Becerra Fernández como tutor académico del alumno D. Juan José Seijo Vizoso, estudiante del Máster en Biología Molecular, Celular y Genética, autoriza la presentación del Trabajo Fin de Máster: “Búsqueda de Dianas Farmacológicas en Enzimas de la Glicólisis implicadas en Cáncer”, para su defensa ante el tribunal evaluador.

## INDICE

1-RESUMEN.....	pag.....	1
2-INTRODUCCIÓN.....	pag.....	2
3-OBJETIVOS.....	pag.....	16
4-MATERIAL Y MÉTODOS.....	pag.....	16
5-RESULTADOS Y COMENTARIOS....	pag.....	21
5.1- Buscar dianas con alto potencial farmacológico, para el cáncer, en los enzimas de la Glicolisis y generar el mapa de dichos receptores con sus características estructurales.....	pag.....	21
5.2- Con la base de datos PDB y el programa informático ProteinsPlus/Siena conseguir la relación de receptores, del objetivo 1, asociados a ligandos.....	pag.....	26
5.3-Resultados de la búsqueda de Ligandos de TPI (Triosa-P-Isomerasa) en el receptor P_1:.....	pag.....	33
6-CONCLUSIONES.....	pag.....	36
7-REFERENCIAS.....	pag.....	36

## **1-RESUMEN. –**

El cáncer en España sigue aumentando de forma importante como lo indican las curvas de incidencia y mortalidad hasta 2040, por lo que, la investigación es fundamental para encontrar nuevos fármacos para su tratamiento. El cáncer es un conjunto de enfermedades que, a nivel subcelular, tienen unas señas de identidad en común (*hallmarks*) y entre ellas está la desregulación energética, a través, de la glicolisis aeróbica que es fuente importante de producción de energía para la intensa biosíntesis de que disponen las células tumorales.

La inhibición o la disminución de la producción de energía a través de la inhibición de los enzimas de la glicolisis puede ser una fuente de nuevos fármacos, importante para el futuro. Para realizar este proceso, en el presente trabajo, se buscan, en los enzimas, receptores de alta afinidad farmacológica y de estos, los que disponen de ligandos para por similitud buscar moléculas precursoras de fármacos. La inhibición enzimática se basa en el tipo acompetitivo (los receptores y ligandos se hallan fuera del centro activo catalítico) y con la ayuda de técnicas bioinformáticas, como la similitud de ligandos y el cribado virtual molecular, se buscan moléculas precursoras.

Las moléculas enzimáticas adecuadas se localizan en la base de datos PDB y se procesan con varios programas bioinformáticos especializados (Proteins.Plus) para la búsqueda de receptores. Con respecto a los ligandos se utilizan otros programas específicos como: Swissimilarity, PyrX, AutodockVina, MOE.

*PALABRAS CLAVE:* receptor molecular, afinidad farmacológica, ligando, macromolécula, acoplamiento molecular, cribado molecular.

## **- RESUMO. –**

O cancro en España segue aumentando significativamente como indican as curvas de incidencia e mortalidade ata 2040, polo que a investigación é fundamental para atopar novos fármacos para o seu tratamento. O cancro é un grupo de doenzas que, a nivel subcelular, teñen señas de identidade comúns e entre elas está a desregulación enerxética, mediante a glicólise aeróbica, que é unha importante fonte de produción de enerxía para unha intensa biosíntese dispoñible para as células tumorais.

A inhibición ou diminución da produción de enerxía mediante a inhibición dos encimas da glicólise pode ser unha fonte importante de novos fármacos para o futuro. Para levar a cabo este proceso, no presente traballo, búscanse nos encimas receptores con alta afinidade farmacolóxica, e destes, aqueles que posúen ligandos para buscar moléculas precursoras de fármacos por semellanza. A inhibición enzimática baséase no tipo acompetitivo (receptores e ligandos están fóra do centro activo catalítico) e coa axuda de técnicas bioinformáticas, como a semellanza de ligandos e o cribado molecular virtual, búscanse moléculas precursoras.

As moléculas enzimáticas adecuadas están localizadas na base de datos PDB e procesadas con varios programas bioinformáticos especializados (Proteins.Plus) para a busca de receptores. En canto aos ligandos, utilízanse outros programas específicos como: Swissimilarity, PyrX, AutodockVina, MOE.

*PALABRAS CHAVE:* receptor molecular, afinidade farmacológica, ligando, macromolécula, acoplamiento molecular, cribado molecular.

**-SUMMARY (ABSTRACT). –**

Cancer in Spain continues to increase significantly as indicated by the incidence and mortality curves up to 2040, so research is essential to find new drugs for its treatment. Cancer is a group of diseases that, at a subcellular level, have common hallmarks and among them is energy deregulation, through aerobic glycolysis, which is an important source of energy production for intense biosynthesis available to tumor cells.

The inhibition or decrease of energy production through the inhibition of glycolysis enzymes may be an important source of new drugs for the future. To carry out this process, in this work, receptors with high pharmacological affinity are searched for in the enzymes, and of these, those that have ligands to search for drug precursor molecules by similarity. Enzymatic inhibition is based on the uncompetitive type (receptors and ligands are outside the catalytic active center) and with the help of bioinformatic techniques, such as ligand similarity and virtual molecular screening, precursor molecules are sought.

Suitable enzyme molecules are located in the PDB data base and processed with several specialized bioinformatics programs (Proteins.Plus) for receptor search. Regarding the ligands, other specific programs are used such as: Swissimilarity, PyrX, AutodockVina, MOE.

*KEY WORDS:* molecular receptor, drug affinity, ligand, macromolecule, molecular docking, molecular screening.

## **2-INTRODUCCIÓN.**

El cáncer después de años de investigación y medidas preventivas sigue aumentando de forma intensa con datos para España, hasta el 2040, muy preocupantes, por lo que hay necesidad de nuevas terapias y fármacos más eficientes para enfrentarse a dicha situación.

En las figuras 1 a 4 se puede visualizar la situación en España y su previsión de futuro para la incidencia y mortalidad del cáncer.

### Evolución de nuevos casos en el futuro

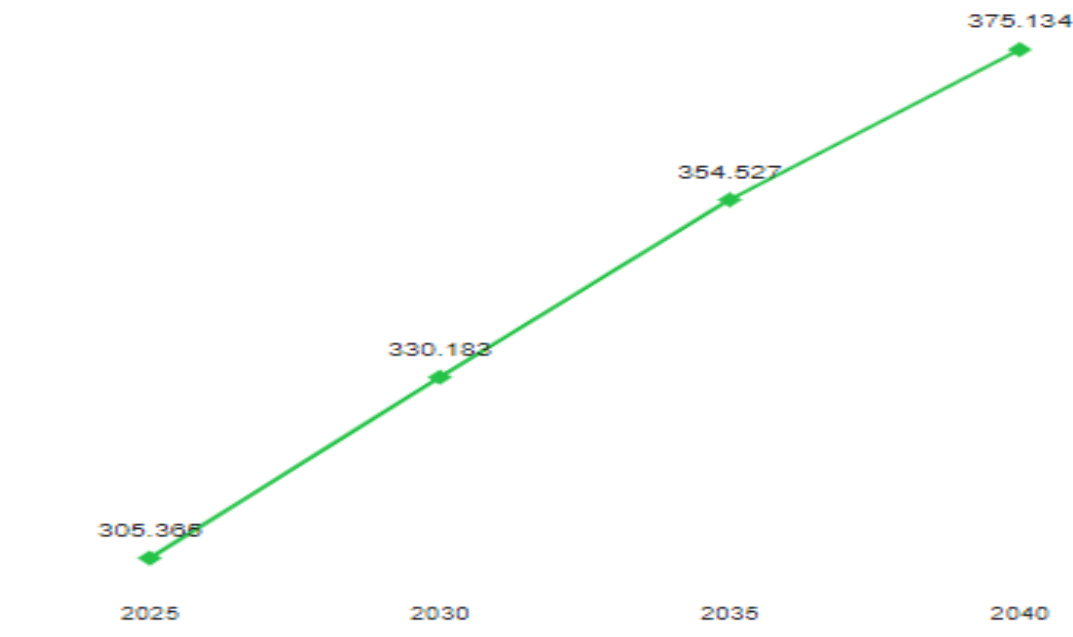


Figura 1: Evolución de la incidencia de cáncer en España. Fuente: Observatorio AECC (<https://observatorio.contraelcancer.es/explora/dimensiones-del-cancer>).

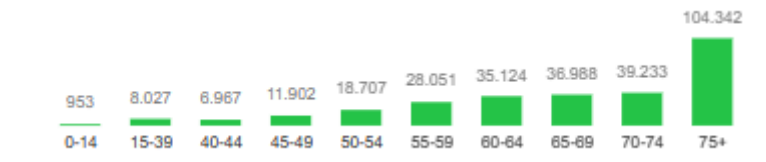


Figura 2: Nuevos casos por rango de edad en España. Fuente: Observatorio AECC (<https://observatorio.contraelcancer.es/explora/dimensiones-del-cancer>).

### Evolución de fallecidos en el futuro

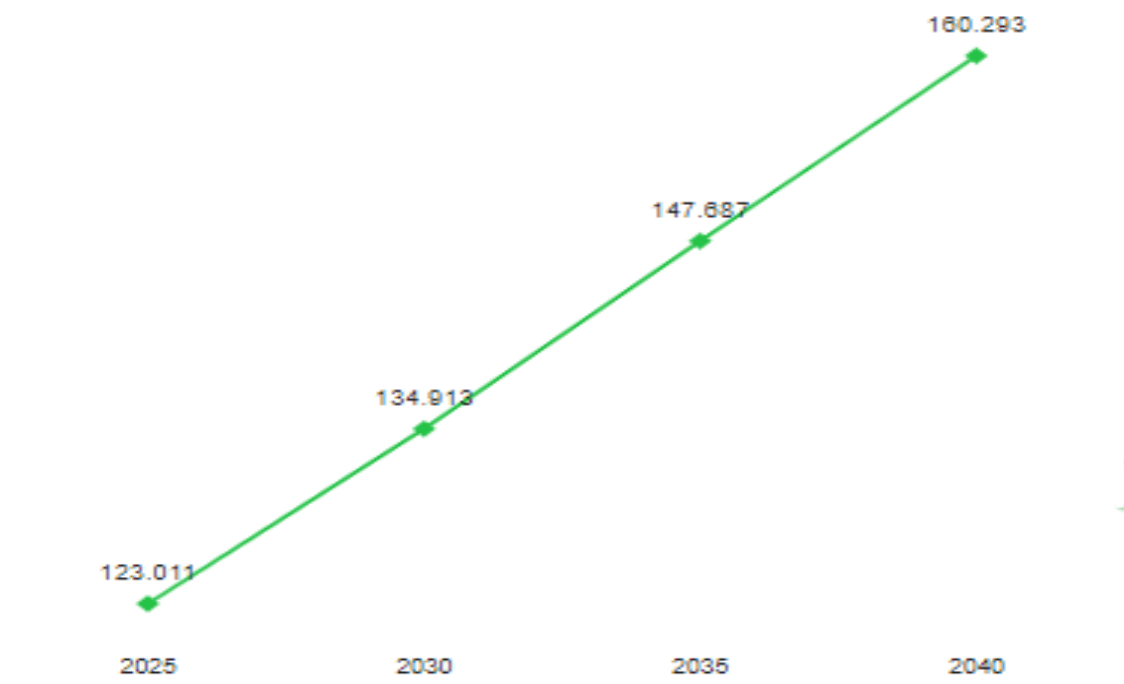


Figura 3: Evolución de la mortalidad por cáncer en España. Fuente: Observatorio AECC (<https://observatorio.contraelcancer.es/explora/dimensiones-del-cancer>).

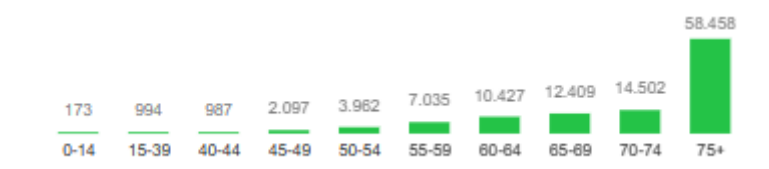


Figura 4: Fallecidos por 100000 habitantes por rango de edad. Fuente: Observatorio AECC (<https://observatorio.contraelcancer.es/explora/dimensiones-del-cancer>).

Además, el cáncer está avanzando hacia edades más jóvenes como lo demuestra un estudio de la Universidad de Harvard publicado recientemente en Nature (1).

Confluyendo con esta situación está el repunte de los principales factores de riesgo (alimentación, tabaco, obesidad, radiaciones etc.) que ensombrecen el panorama de futuro y que nos lleva a pensar en la investigación como la fuente principal de soluciones, por lo que, la inversión en ciencia debe de ser fuerte y duradera.

El cáncer no es una enfermedad única, si no, un conjunto de enfermedades (enfermedades oncológicas) que, a nivel subcelular, tienen unas señas de identidad en común (*hallmarks*)(2).

En 2011 Hannahan y Weinberg publican *Hallmarks of Cancer* (3) referenciando las principales áreas de investigación, a nivel bioquímico, que se muestran en la figura 5:



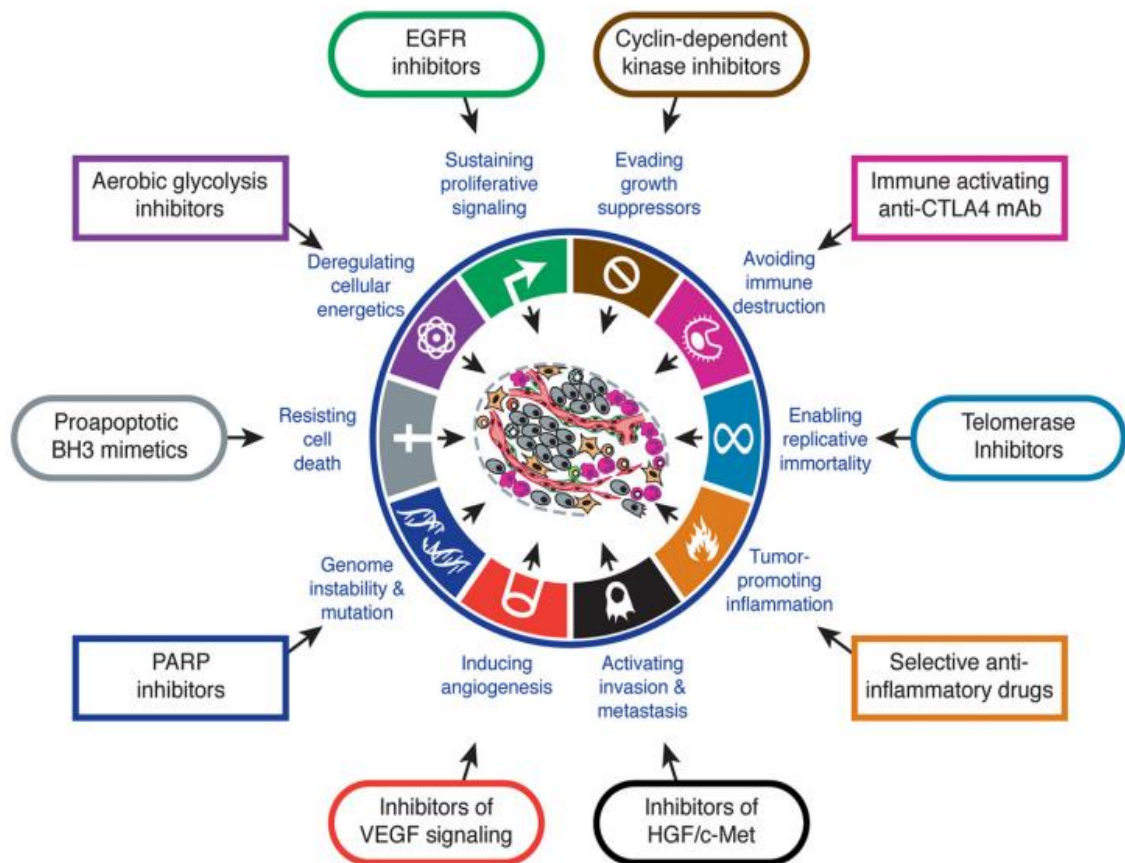


Figura 5: Objetivos fármaco-terapéuticos (3).

En donde figura el área de estudio de la desregulación energética celular, típica en la célula cancerosa, como fuente de inhibidores de la glicolisis aeróbica.

### ESTRUCTURA CELULAR DEL CÁNCER

El cáncer se presenta, de forma más habitual, como un tumor maligno sólido con una estructura interna (3) muy compleja consistente en:

- Células tumorales
- Células de sostén (fibroblastos)
- tejidos estructurales-colágeno.
- Células del sistema inmune
- Células de vasos (endocitos)
- Células nerviosas: terminaciones propioceptivas y del dolor
- Medio ambiente celular

Las células tienen diversas presentaciones fenotípicas desde *stem-cells* hasta fibroblastos tumorales o endocitos tumorales (Figura 6).

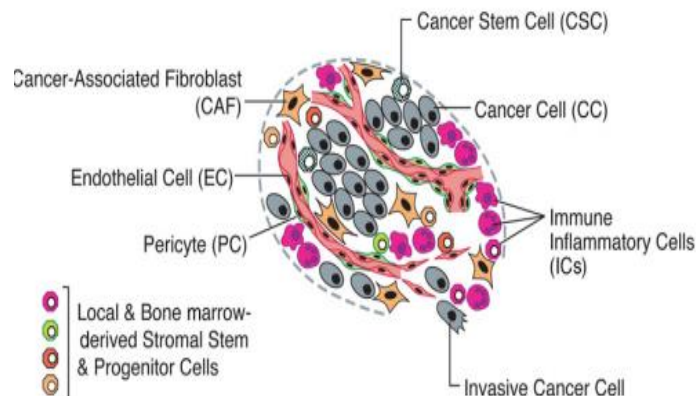


Figura 6: Células del medioambiente celular (3).

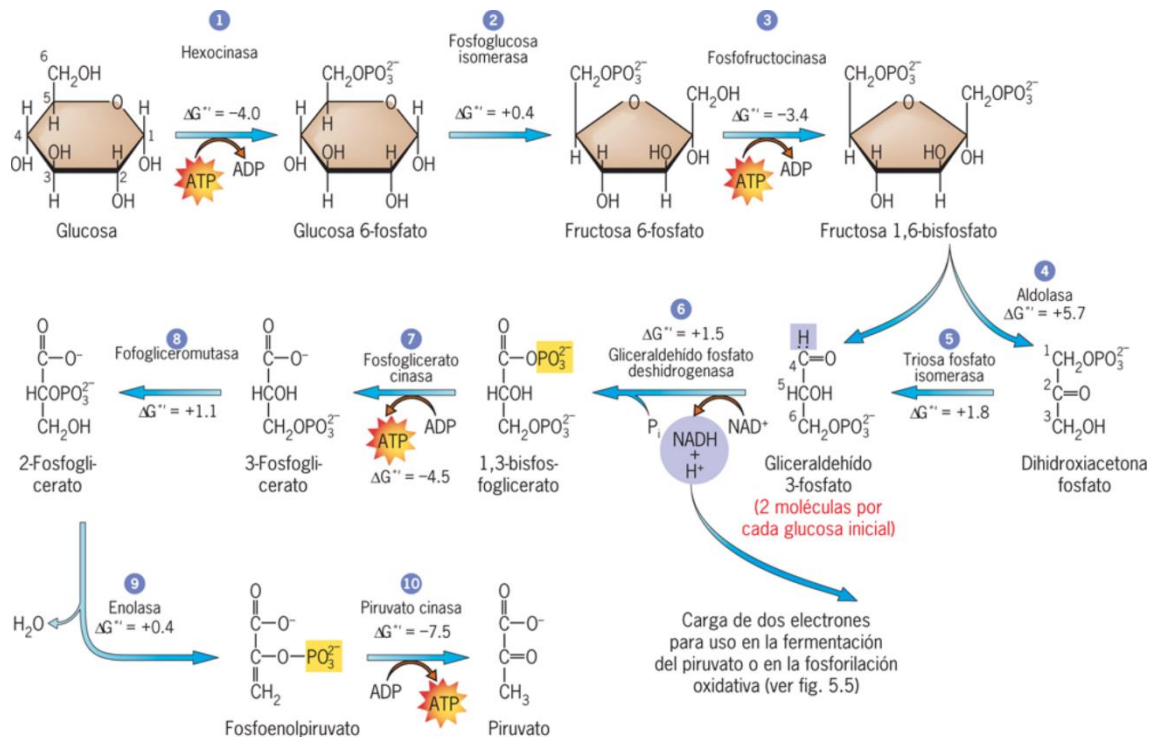
Las células del sistema inmune comprenden: macrófagos, neutrófilos, linfocitos T y B, células NK.

El medio ambiente tumoral se caracteriza por la presencia abundante de ácido láctico convirtiéndose en un medio ácido (pH 6.3 a 6.9) y cuya procedencia es derivada de la glicolisis aeróbica de las células tumorales(4), (5) . La acumulación de ácido láctico puede alcanzar concentraciones de 40 mM siendo lo normal de 1,5 a 3 mM. El ácido láctico contribuye al escape inmunológico de las células tumorales: células NK y NKT, a partir de los 20 mM de concentración sufren apoptosis, también se bloquea la proliferación de linfocitos T y la producción de interferón gamma y de interleukina 4. La inmunosupresión producida por los receptores láctico/Gpr8 también inhibe las defensas del huésped contra el crecimiento tumoral (6).

Las células dendríticas son células presentadoras de antígeno y tienen un papel fundamental en la respuesta inmune. Una de sus principales funciones es el reconocimiento de las células tumorales a través de los antígenos tumorales de los complejos MHC-II y MHC-I, lo que lleva a la activación de los linfocitos T CD4+ y CD8+, en respuesta a citoquinas del medio ambiente tales como: IL-R, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  que son producidas por las células NK, NKT y los macrófagos. El ácido láctico interrumpe la diferenciación de las células dendríticas y hace que sean tolerantes, lo cual conlleva al aumento de producción de IL-10, una potente citoquina inmunosupresora que inhibe la producción de citoquinas proinflamatorias como IFN  $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6. Además, IL-10 previene la maduración de las células dendríticas y la activación de las células T. El ácido láctico también promueve el desarrollo de células mieloides supresoras (5).

## ENZIMAS DE LA GLICÓLISIS

La base y fundamento de este estudio está en el proceso de la glicolisis que se indica en el siguiente esquema bioquímico (Figura 7):



Fuente: Gerald Karp: *Biología celular y molecular. Conceptos y experimentos*, 7e: www.accessmedicina.com  
 Derechos © McGraw-Hill Education. Derechos Reservados.

Figura 7: Glicólisis (26).

Los enzimas de la glicólisis de cara al uso de posibles inhibidores en el organismo humano se pueden clasificar desde el punto de vista farmacológico bajo los criterios de:

- Toxicidad/Tolerabilidad. Probabilidad de toxicidad para su uso en el ser humano
- Bioquímicos. Según ordenación en la glicólisis.

Enzimas glicólisis-1

-LDHA -PKM2 -TPI

Enzimas glicólisis-2A

-Hexokinasa-2 -Ffructocinasa -PFKFB3 -G6Pisomerasa -Aldolasa

Enzimas glicólisis-2B

-Glicer aldehído PDeshidrogenasa -FosfoGliceratoKinasa -FosfoGliceratoMutasa  
 -Enolasa

Los inhibidores de estos enzimas en el grupo de enzimas glicólisis-1 son los de menor probabilidad de toxicidad pues:

-LDHA es un punto final en la vía glicolítica que en las células normales se usa en pocas ocasiones (glicólisis anaerobia en células musculares por falta de oxígeno) y es de gran utilización en las células cancerígenas.

-PKM2 en las células cancerosas se presenta frecuentemente como dímero con una Km muy inferior a la forma tetramérica más habitual en células normales, por lo que, la toxicidad puede ser menor en estas últimas.

-TPI es un enzima que cubre como máximo el 50% de la vía glicolítica por lo que por muy intensa que sea la inhibición siempre queda un gran % libre de afectación con lo que la toxicidad será menor.

La estructura y constitución de estos enzimas se indica a continuación:

### *Enzimas glicólisis-1*

-LDH. Enzima láctico deshidrogenasa. Es una enzima perteneciente a la categoría de las óxido-reductasas y que reduce el piruvato a lactato gracias a que el NADH se oxida a NAD<sup>+</sup>.

Este enzima tiene un peso molecular de 140kDa, y está formada por 4 subunidades. Son conocidas 3 tipos de subunidades: H(LDHB), M(LDHA), X(LDHC) y que en combinación pueden dar lugar a 5 isoformas: LDH-1(H4) (LDH-B) (músculo cardiaco y eritrocitos), LDH-2(H3M) (músculo cardiaco y células sanguíneas). LDH-3(H2M2) (en los pulmones). LDH-4(HM3) (en riñones, placenta y páncreas). LDH-5(M4) (LDH-A) (hígado y músculo esquelético). La LDH-A se manifiesta de forma importante en tumores malignos y, puede, ser un signo de mal pronóstico. La LDH-B transforma el lactato en piruvato para sus múltiples usos ((8)), ((5)).

-PK-Enzima Piruvato quinasa. Cataliza la transferencia de un grupo fosfato del fosfoenolpiruvato al adenosín difosfato (ADP) con lo que se produce una molécula de piruvato y otra de adenosín trifosfato (ATP). Posee un peso molecular de 60 kDa y consta de tres monómeros. Está codificada por 2 genes: *HGNC PKLR* y *HGNC PKM2*. *PKLR* tiene la secuencia del enzima eritrocitario (PKR) y hepática (PKL), mientras que *PKM2* se manifiesta en el músculo dando lugar a PKM1 y PKM2. La isoforma PKM2 es característica de células con elevada síntesis de ácidos nucleicos en particular de células tumorales.

En tejidos normales la PKM2 es un tetrámero con alta afinidad molecular, pero en células tumorales es un dímero con muy baja afinidad que lo que hace es embalsar moléculas aguas arriba en la glicólisis para favorecer la biosíntesis (7), ((9)), ((10)).

-TPI-Enzima Triosa Fosfato Isomerasa. Produce la interconversión reversible de los isómeros de la triosa fosfato la dihidroxiacetona fosfato y D-gliceraldehido 3-fosfato. Este enzima es un dímero con dos subunidades idénticas con forma de barril -TIM *barrel*- en el centro del cual está el centro activo en el cual son claves dos aminoácidos: un ácido glutámico y una histidina (8),(11) .

### *Enzimas glicólisis-2A*

-HK- HEXOKINASA. -Este enzima fosforila una glucosa a partir de ATP. Son 4 isoenzimas (HK 1-4). HK 1-3 es un dímero de 100 kDa y la HK 4 monómero de 50 kDa, esta última se encuentra en gran cantidad en el hígado e islotes beta pancreáticos y controla la neoglucogénesis y la secreción de insulina. HK1 tiene una presencia muy ubicua y es la forma predominante en cualquier tejido. HK2 es el enzima principal en los tejidos insulín sensibles como corazón, músculo esquelético, tejido adiposo y en una amplia variedad de tumores. La HK1 y HK2 pueden adherirse a la mitocondria a través de un motivo estructural ausente en las otras, además presentan un efecto citoprotector en células sanas y neoplásicas con aumento del consumo de glucosa. La regulación de HK2

es muy compleja como se indica en la figura 8. La sobreexpresión de HK2 está ligada a la progresión tumoral y de metástasis (8), (12).

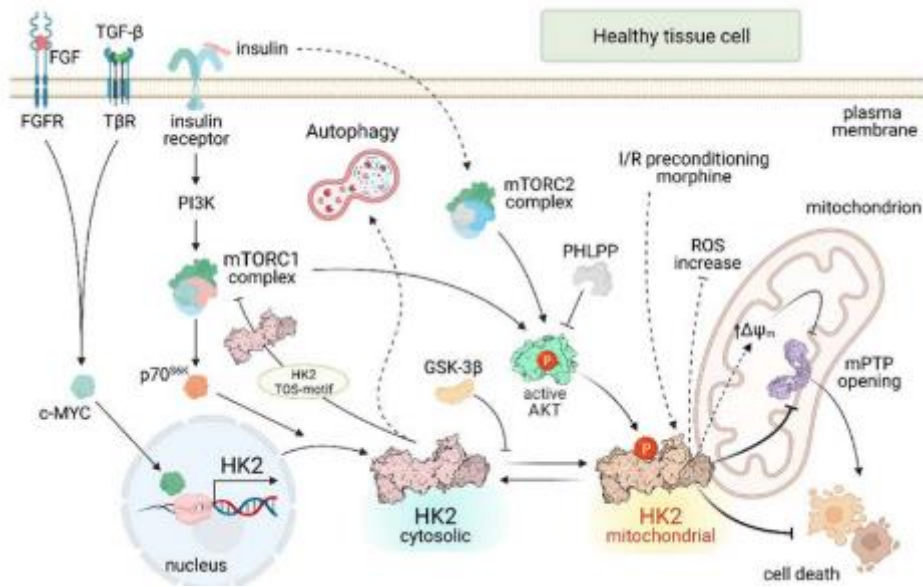


Figura 8: Vías regulatorias de HK2 en células sanas (12).

-GPI. GLUCOSA-6-FOSFATO ISOMERASA. -Es un enzima que cataliza la reacción de glucosa-6-fosfato a fructosa-6-fosfato que es reversible. Se encuentra en el citoplasma y en la matriz extracelular funciona como factor neurotrófico para cierto tipo de neuronas, también como citoquina o como factor de crecimiento. Su estructura es de un homodímero.

Se encuentra involucrada en el desarrollo y progresión de varios cánceres. Una elevada expresión en el glioblastoma y carcinoma de células renales se asocia con mal pronóstico.

La GPI no se segrega por células normales, pero sí se encuentran niveles elevados en suero y orina en pacientes con tumores malignos. En el adenocarcinoma de pulmón está sobre expresada con valor diagnóstico y pronóstico(13) .

-PKFK. FOSFOFRUCTOQUINASA (PKFK-1). -Es un enzima que cataliza el paso de fructosa-6-fosfato a fructosa 1-6 bifosfato y también controla el ritmo de flujo de la glicolisis. Posee una estructura tetramérica. Existen 3 Isoformas: PFKP (*platelet*), PFKM (*muscle*) y PKFKL (*liver*). La PKFKP se distingue por su alta prevalencia en diferentes tipos de cáncer como el de mama o el glioblastoma.(14)

PFKFB3.-Es un enzima bifuncional, 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bifosfatasa 3, juega un papel importante en la regulación de la glicolisis controlando el nivel estable de fosfo-fructo quinasa-1 en el citoplasma que es el activador alostérico más potente de 6-fosfofructo-1-quinasa (PKF-1), un enzima clave en el ritmo de progreso de la glicolisis. Existen 4 isoenzimas PFKFB 1-4 que se codifican por diferentes genes de los cuales PFKFB3 destaca por su sobreexpresión en numerosos cánceres. Es un dímero. Debido a

su papel sobre PKF-1 se postula como un objetivo para generar inhibidores para el cáncer.(15) .

**ALDOLASA.** - Es un enzima que cataliza la rotura de la fructosa 1,6 difosfato en dos triosas: dihidroxiacetona fosfato y gliceraldehido 3-fosfato. Existen 3 isoenzimas en el cuerpo humano codificadas por 3 genes diferentes: Aldolasa-A, Aldolasa-B, Aldolasa-C. Es un homo tetrámero.

La Aldolasa-A se encuentra en el embrión, músculo esquelético adulto y se manifiesta aumentada en varios tumores. La Aldolasa-B se encuentra preferentemente en el hígado. La Aldolasa-C se encuentra en el hipocampo y células de Purkinje del cerebro. ALDO-A es una molécula clave en las capacidades de emigración/invasión de las células del cáncer de pulmón. (8)

### *Enzimas glicólisis-2B*

**-GLICERALDEHIDO-3-FOSFATO-DESHIDROGENASA (GAPDH).**- Es un enzima que produce la conversión reversible del gliceraldehido-3-fosfato (G-3-P) a 1,3-difosfoglicerato y participa en numerosas funciones celulares además de la vía glicolítica como en la exportación desde el núcleo de tRNAs, replicación y reparación del ADN , endocitosis, exocitosis, organización del citoesqueleto, metabolismo del hierro, carcinogénesis y muerte celular (Figura 9). GAPDH con niveles significativamente elevados se observan en muchos tipos de cánceres humanos y, a menudo, se correlacionan con una supervivencia acortada. GAPDH es un tetrámero que tiene 4 subunidades idénticas de 37 kDa y el gen codificante se halla en el cromosoma 12 (16).

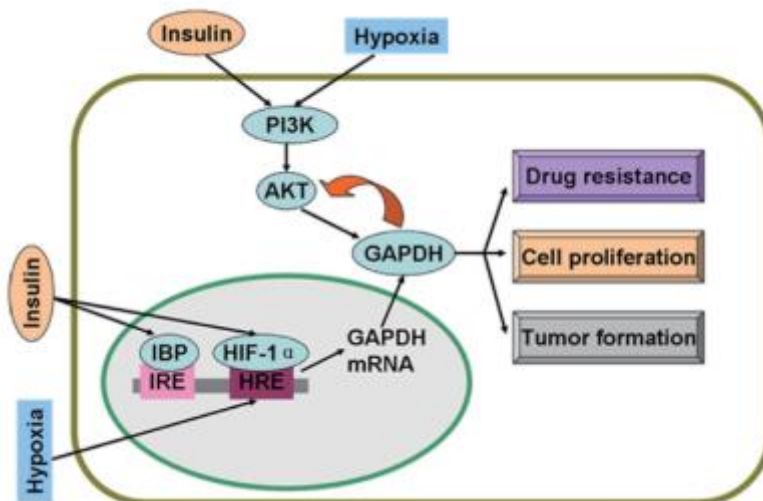


Figura 9: Mecanismos reguladores de GAPDH por la insulina e hipoxia (16).

**-FOSFOGLICERATOQUINASA (PGK1).**-Es un enzima que cataliza el paso de 1-3 difosfoglicerato a 3-fosfoglicerato y la formación de un ATP. Es la primera reacción en generar ATP en la glicólisis anaeróbica. Es un monómero y existen 2 isoenzimas: PGK1 y PGK2 en el genoma humano con genes diferentes. PGK1 con el gen en el cromosoma X y se encuentra en casi todos los tejidos y la PGK2 con el gen en el cromosoma 6 y se manifiesta en la espermiogénesis (17), (18).

-FOSFOGLICERATOMUTASA (PGAM1).- Es un enzima glucolítico que cataliza la conversión de 3-fosfoglicerato a 2-fosfoglicerato. En investigaciones recientes se descubrió que su sobreexpresión está ligada en varios cánceres (mama, esófago, páncreas, colon, riñón, pulmón, glioma) con el crecimiento tumoral, supervivencia e invasión.

Es una proteína dimérica con dos subunidades diferentes de 30 kD: B (*brain*) y M (*muscle*) que proceden de dos genes diferentes. En humanos, MB-PGAM principalmente en el corazón, BB-PGAM en el cerebro, riñón e hígado, MM-PGAM en células musculares adultas (19) .

ENOLASA. -Es un enzima que realiza la transformación de 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato durante la glicólisis. Es un dímero que posee subunidades ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) con procedencia de 3 genes diferentes, por la combinación de las subunidades se producen 5 isoenzimas ( $\alpha\alpha$ ,  $\alpha\beta$ ,  $\alpha\gamma$ ,  $\beta\beta$ ,  $\gamma\gamma$ ):

Isoenzima  $\alpha\alpha$  o Enolasa 1 se encuentra en una gran variedad de tejidos como hígado, cerebro, bazo, tejido adiposo.

Isoenzima  $\beta\beta$  o Enolasa 3 (enolasa específica muscular) se encuentra en los músculos de los adultos.

Isoenzima  $\gamma\gamma$  o Enolasa 2 (enolasa neuro específica) se encuentra presente en células neuronales.

La Enolasa 1 es también una oncoproteína multifuncional presente en la superficie de las células y en el citoplasma que contribuye a afectar a siete de los diez “*hallmarks of cancer*”: su función glucolítica desregula su bioenergética, mantiene la proliferación celular, inhibe la apoptosis celular, también inhibe la apoptosis y ayuda al tumor a evitar la destrucción inmune. En la superficie celular actúa como receptor del plasminógeno promoviendo la capacidad de invasión del cáncer y metástasis a través de la inducción de angiogénesis (20), (21).

## **METABOLISMO ENERGÉTICO DEL CÁNCER**

Las células cancerígenas pueden obtener energía por varias vías(6):

-Glicólisis aeróbica

-Glicólisis anaeróbica

-Oxidación del ácido pirúvico vía ciclo de Krebs

-Por LDHB pasando el ácido láctico a pirúvico

Glicólisis Aeróbica. –Es el proceso de glicólisis con punto final en la formación de ácido láctico (Figura 7) que ocurre en el citosol y con presencia de oxígeno.

Alteraciones como la inestabilidad génica, la mutagénesis, la expresión génica aberrante y vías de señalización alteradas causan cambios en la vía glucolítica en un 70-80 % de los cánceres humanos que conducen a la glicólisis Aeróbica (efecto Warburg). El fenotipo glucolítico es un componente esencial de la reprogramación de las células cancerosas y ocurre en la oncogénesis temprana incluso antes de que se desarrolle la hipoxia tisular (6).

Este proceso de glucólisis aerobia ocurre como resultado de la activación de:

- regulador maestro HIF-1 $\alpha$  (normoxémico e hipoxémico)
- oncogenes promotores del crecimiento celular (cMyc, mTORC1, Akt,K-ras) (Figura 10)
- vías de señalización (PI3K/Akt/mTORC1, Ras/Raf/Mek/ERK)
- transportadores de glucosa (GLUT1) y lactato (MCT4)
- enzimas glucolíticas clave (HK2, PFK1, ENO1, PKM2, LDHA) (Figura 8)

Y con la pérdida de función de:

- supresores tumorales (p53 mutante, PTEN mutante), micro RNAs 29, 143 y 144, sirtuinas 3 y 6
  - vía de señalización AMPK
- (6),(9) .

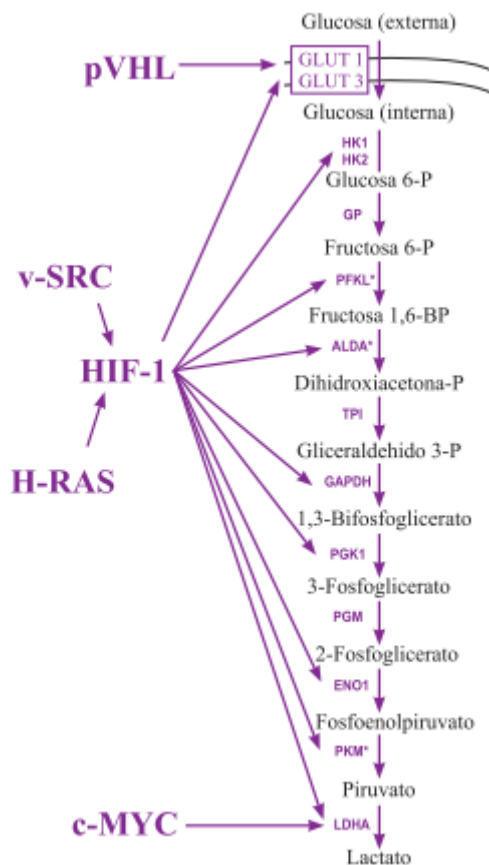


Figura10: Transporte de glucosa y glicólisis. Regulación por diversos oncogenes (9).

### Glicólisis Anaerobia. -

Como cualquier otra célula la célula cancerosa puede usar este proceso para obtener energía ante una falta de oxígeno importante, su destino final también es el ácido láctico.

### Oxidación del ácido pirúvico por vía del ciclo de Krebs. -



Es la vía principal de obtención de energía en las células normales, se realiza en las mitocondrias con un rendimiento energético elevado, pero con un proceso lento debido a las múltiples reacciones de este ciclo de ácidos tricarboxílicos (Figura 11).

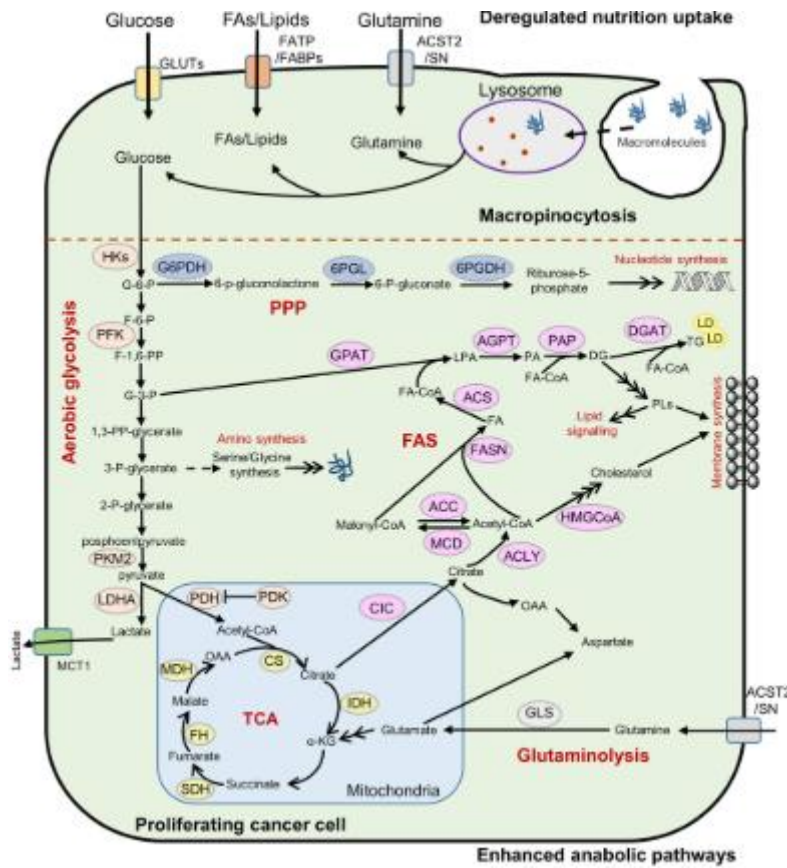


Figura 11: Vías anabólicas y catabólicas primarias de las células cancerosas (22).

En las células cancerosas también ocurre esta vía energética que, a pesar, de que la vía principal es la glicólisis aeróbica muchas células cancerosas mantienen intactas dicha capacidad en sus mitocondrias (4).

Por LDHB pasando el ácido láctico a pirúvico. –

El enzima LDHB produce la conversión de lactato en piruvato en las células que usan el ácido láctico como nutriente para el metabolismo oxidativo o para la gluconeogénesis. Los protones generados por este enzima promueven la acidificación lisosomal dependiente de la V-ATPasa y la autofagia, creando una fuente adicional energética y biosintética en microambientes restrictivos.

La importancia de LDHB en la progresión de varios tumores se vio en diversas publicaciones. La intervención directa del enzima Aurora-A con LDHB resulta en la fosforilación del enzima y los aumentos resultantes en la actividad catalítica potencian la generación del NAD+, el flujo glucolítico y la biosíntesis de metabolitos glicoderivados, con lo que todo ello facilita la progresión tumoral (23) .

En resumen, la vía preferente suele ser la glicólisis aeróbica (efecto Warburg) en la que, a pesar de, tener O<sub>2</sub> suficiente elige la glicólisis que aun siendo mucho menos eficiente

con respecto a la vía del piruvato (2/36ATP) es mucho más adecuada para nutrir de moléculas a los intensos procesos de biosíntesis y mucho más rápida alcanzando hasta 200 ciclos por cada uno de la vía del piruvato. Esta vía produce un enorme exceso de ácido láctico alcanzando las 400 moléculas, por ninguna en la vía del piruvato, que va a acidificar el medio ambiente tumoral (6), (5).

**El cáncer basa su producción de energía, principalmente, en sólo dos enzimas que son:**

**-FOSFOGLICERATO QUINASA (PGK1)**

**-PIRUVATO QUINASA-M2(PKM2)**

**Y su defensa contra el sistema Inmune que es:**

**-LÁCTICO DESHIDROGENASA-A(LDHA)**

El tumor conforme aumenta su crecimiento produce una importante depleción de nutrientes -glucosa, glutamina, aminoácidos, lípidos, etc.-desde el torrente sanguíneo y, además, produce sustancias anorexígenos que llevan al organismo a una situación de difícil manejo, salvo, que se instauren terapias efectivas que faciliten la recuperación.

La disminución de la producción de energía y biosíntesis puede ser una medida terapéutica eficaz que frenaría el crecimiento tumoral y, además, actuaría disminuyendo la producción de ácido láctico que ayudaría a la recuperación de la función de las células del sistema inmune aumentando las defensas antitumorales.

## **INHIBICIÓN ACOMPETITIVA**

Una de las vías para conseguir disminuir la producción de energía por parte de las células cancerosas es a través de la inhibición enzimática acompetitiva de los múltiples enzimas de la glicólisis. Esto es el objetivo de este trabajo académico de investigación.

La inhibición enzimática acompetitiva consiste en que el inhibidor no se une en el mismo sitio que el sustrato, pero su unión al enzima aumenta la afinidad del sustrato por el enzima, dificultado su disociación e impidiendo la formación de los productos (25) (Figuras 12 y 13).

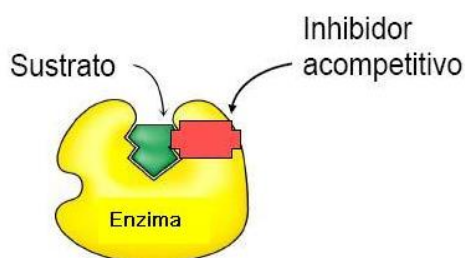


Figura 12: Esquema simple de la inhibición acompetitiva (25).

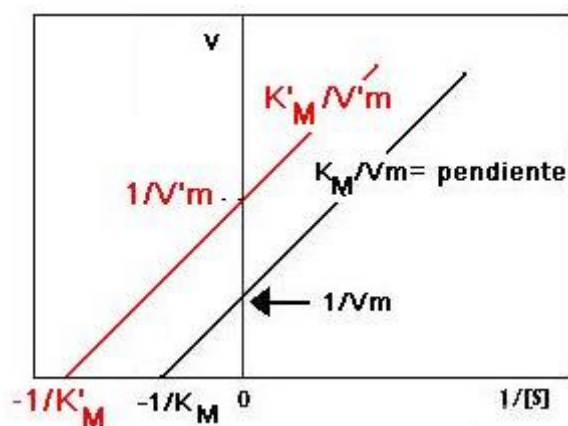


Figura 13: Rectas de doble recíproco, la del rojo corresponde al inhibidor acompetitivo (25).

## DESCUBRIMIENTO DE NUEVOS FÁRMACOS ASISTIDO POR ORDENADOR

El metabolismo ha emergido con un papel esencial en el cáncer, su papel central en todos los estadios de la enfermedad sugiere, que fármacos basados en el Metabolismo sean esenciales para el tratamiento efectivo y cura del cáncer (2).

En este trabajo se visualiza un área prometedora de nuevos fármacos y poco explorada, hasta el momento, que es la bioenergética del cáncer.

En esta nueva búsqueda de nuevos fármacos se van a utilizar dos técnicas bioinformáticas avanzadas que son:

### -Docking (acoplamiento) molecular:

Es un método que hace predicciones sobre la conformación más adecuada de una molécula al estar unida con otra con la finalidad de formar un complejo estable. Predice la fuerza de asociación o la afinidad de enlace usando funciones de *scoring* (puntuación). Se usan programas como:

AutodockVina, Autodock4, Pyrx.

### -Cribado virtual molecular:

El cribado virtual molecular es un proceso de filtrado por ordenador de moléculas depositadas en base de datos, sintéticamente accesibles, para obtener potenciales candidatos a fármacos.

La búsqueda de nuevos fármacos candidatos a través del cribado virtual (*VS*, *virtual screening*) se realiza en bases de datos moleculares (quimiotecas virtuales) de las cuales se muestran varios ejemplos a continuación:

Bases de datos generalistas:

ZINC 20: <https://zinc.docking.org/>

CHEMBL: <https://www.ebi.ac.uk/chembl/>

DRUGBANK: <https://go.drugbank.com/>

Bases de datos especializadas-Metabólica en plantas:

MPD3: <https://mpd3.com/>

PDTDB: <https://pdt.biogem.org/search.php/https>

KANAYA: <http://www.knapsackfamily.com/KNApSAcK/>

Se pueden usar múltiples programas:

PyrX/AutodockVina/SwissDock/Jamda /MOE

### **3-OBJETIVOS.**

Este estudio académico consta de una primera fase de búsqueda de receptores enzimáticos de alta afinidad farmacológica utilizando sistemas bioinformáticos especializados, otra fase de localización de ligandos moleculares y, a través, del método de similitud de ligandos conseguir listados de moléculas para usar como futuros fármacos. Se plantean los siguientes objetivos:

- 1.- Buscar dianas con alto potencial farmacológico, para el cáncer, en los enzimas de la glicólisis y generar el mapa de dichos receptores con sus características estructurales.
- 2.- Con la base de datos PDB y el programa informático ProteinsPlus/Siena conseguir la relación de ligandos asociados a cada receptor del objetivo 1.
- 3.- En el receptor P\_1 del enzima TPI obtener un archivo de ligandos para *docking* molecular con el método de similitud de ligandos (SwissSimilarity).

### **4-MATERIAL Y MÉTODOS.**

En este estudio de investigación académico se usaron múltiples programas informáticos para cubrir las diversas facetas de la investigación. A continuación, se describen los recursos utilizados para la consecución de los objetivos planteados para este estudio.

PDB (*Protein Data Bank*).- <https://www.rcsb.org/>

- Es una de las mayores bases de datos de proteínas estructurales conocidas, más de 200000 estructuras físicas en PDB.

En la elección de la estructura de la proteína adecuada se utilizaron los siguientes criterios:

-proteína de *Homo sapiens*

-variante más frecuente en el cáncer

- tipo nativo preferentemente
- criterios S-Profiler (ProteinsPlus) estructurales
- criterios EDIA (ProteinsPlus) de densidad electrónica

ProteinsPlus (Hamburg).- <https://proteins.plus/>

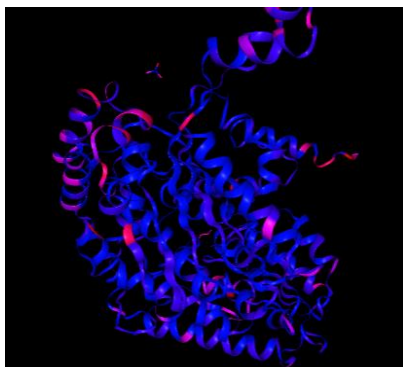
Es un sistema informático muy complejo y con múltiples programas especializados que ofrece la universidad de Hamburgo de forma *on-line*. De entre ellos los más usados en este trabajo académico son:

-StructureProfiler. – <https://proteins.plus/StructureProfiler>

Programa para estudio de la estructura de las macromoléculas con diversos parámetros el primero es la resolución estructural que debe de ser igual o inferior a 2.5 angstroms. Se suele utilizar en la opción modo combinado.

-EDIA. - <https://proteins.plus/EDIA>

Programa que permite cuantificar el encaje de un átomo o un conjunto de átomos en la densidad electrónica. La función de puntuación de la densidad electrónica para átomos individuales cuantifica el encaje de la densidad electrónica de un átomo y para un conjunto de átomos. EDIA indica la puntuación a través de una gradación de color que se puede expresar sobre la propia proteína (Figura 14). Se utiliza como criterio, complementario, en la elección de las moléculas del PDB.

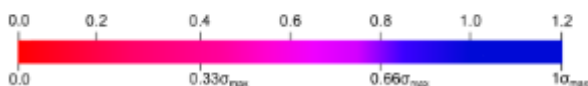


### Result

You can see the result of Edia in the NGL Viewer on the left side.

EDIA is decomposable into a fault analysis:

The following color scheme is used in the visualization of EDIA:



Water and Metal EDIA<sub>max</sub> scores are identical to their EDIA score. Thus both are only listed in the EDIA tables.

Figura 14: Resultados obtenidos empleando el programa

-DogsiteScorer.- <https://proteins.plus/DogsiteScorer>

Es un programa que introduciendo el código PDB de la macromolécula calcula las zonas en 3D que pueden ser receptores farmacológicos con un índice de afinidad farmacológica

(0-1) además de datos estructurales del receptor correspondiente. Cada receptor determinado puede servir de base para el siguiente programa que es Siena (24).

-Siena.- - <https://proteins.plus/DogsiteScorer/Siena>

Una vez elegido el receptor farmacológico con DogsiteScorer se transfiere a Siena que busca las macromoléculas que dispongan de un receptor igual o similar (1-0,7) en la base de datos PDB, además se indica si existen ligandos y cuales son (24).

-Jamda.- <https://proteins.plus/Jamda>

Programa informático del grupo ProteinPlus de la universidad de Hamburgo dedicado al *docking* y cribado molecular que en conexión directa con DogsiteScorer y Siena asigna el receptor empleado en la macromolécula utilizado para *docking* y los ligandos se importan en archivos inchi o mol2. En los resultados figura la energía de afinidad y otros datos.

SWISSDRUGDESIGN. <https://www.expasy.org/resources/swissdrugdesign>

Es un servidor que contiene herramientas informáticas de diseño de fármacos, desde el cribado virtual de moléculas (SwissSimilarity), la optimización de moléculas líder o *lead* (SwissBioisostere) y predicción de dianas de las moléculas pequeñas (SwissTargetPrediction). Está operado por el Swiss Institute of BioInformatics (Lausanne).

SwissSimilarity.- <http://www.swissimilarity.ch/>

Programa informático que busca las moléculas con similitud importante a la original en múltiples bases de datos internacionales. La molécula original se introduce en el programa a través de su código smiles.

SwissADME.- <http://www.swissadme.ch/>

Aplicación informática para adquirir los perfiles farmacológicos de moléculas. La molécula original se aporta en formato smiles. Un apartado importante son los criterios de “*drugability*” de la molécula, siendo los más importantes los criterios de Lipinsky:

-Coeficiente de reparto octanol-agua (logP) inferior a 5

-Poseer un peso molecular inferior a 500 uma (unidad de masa atómica)

-No debe contener más de diez aceptores de enlaces por puentes de hidrógeno

-No debe contener más de cinco donadores de enlaces por puentes de hidrogeno

SwissTargetPrediction.- <http://www.swisstargetprediction.ch/>

Predice un perfil de interacciones conocidas en la base de datos ChEMBL proporcionándole la molécula original en formato smiles.

SwissDock.- <http://www.swissdock.ch/>

Programa informático para cribado virtual molecular que necesita el aporte de la macromolécula en un fichero pdb y los ligandos en otro fichero mol2. Los resultados incluyen un fichero con los datos, entre otros, de la energía de afinidad ( $-\Delta G$ ).

PyrX .- <https://pyrx.sourceforge.io/>

Programa para *docking* y cribado virtual de moléculas para uso en Windows y que se apoya en AutodockVina y Autodock4.

AutodockVina.- <https://vina.scripps.edu/>

Programa para *docking* y cribado virtual molecular disponible para varios sistemas operativos: Linux, Windows, Mac.

Utiliza la energía de afinidad como parámetro para la ordenación de moléculas.

AutodockTools.- <https://autodock.scripps.edu/>

Programas para *docking* (Autodock4, Autogrid4). Disponible para varios sistemas operativos. Referidos al *docking* molecular nos pueden dar resultados de diversos tipos de energías como:

-energía intermolecular (1)

-energía interna (2)

-energía de torsión (3)

-energía no enlazante (4)

Siendo la Energía de Afinidad = (1) +(2) +(3)-(4)

Discovery Studio.- <https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download>.

Es un programa informático sofisticado que abarca desde el diseño de moléculas, relación ligandos-macromoléculas, preparación de macromoléculas para *docking* etc.

Open Babel. [https://openbabel.org/wiki/Main\\_Page](https://openbabel.org/wiki/Main_Page)

Programa informático, *on-line*, de intercambio de formatos de ficheros estructurales de moléculas. En el sistema de entrada del programa se carga el fichero original y en la zona de salida se genera un fichero de salida con el formato que se desea y luego se procede a iniciar el cambio de formato con la opción correspondiente.

## TÉCNICAS LIGANDO-RECEPTOR:

-Similitud de Ligandos. -

Búsqueda de ligandos por similitud molecular a través del programa SwissSimilarity (<http://www.swiss similarity.ch/> ) conocido un ligando de referencia en formato smiles. Es un método muy eficiente, pues, con pocos medios técnicos se pueden conseguir amplios resultados funcionando *on-line*.

Se carga la molécula de referencia en formato smiles y se escoge una de las opciones que da el programa: *Drugs*, *Bioactive*, *Commercial*, *Synthesizable*.

En el caso de la opción *Commercial* se realizan las búsquedas en la base de datos Zinc-20 (>180000000 de moléculas) que dispone de las referencias de los laboratorios que las

comercializan. Para asegurar que las nuevas moléculas cumplan criterios básicos para ser fármacos se debe de acotar la búsqueda a Zinc (*Drug-like*) (sobre 10000000 de moléculas) (Figura 15). El proceso se comienza con el método Combined 2D-3D y se continua en 2D Fp2, así se generan archivos con moléculas en formato smiles.

### 3 - Select compound library and screening method

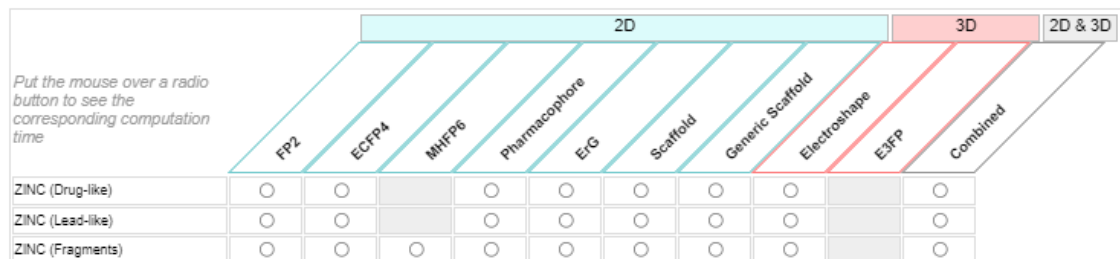


Figura 15: Captura de pantalla de las opciones del programa SwissSimilarity

### -Cribado virtual de Ligandos en el receptor. -

Método ya referenciado que se usa cuando no existen ligandos conocidos asociados a receptores o macromoléculas, necesita de una importante capacidad de computación, pero es muy versátil, se puede usar en cualquier receptor. En el caso de grandes quimiotecas se pueden usar programas de inteligencia artificial con sistemas de computación en paralelo

Se pueden utilizar, también, múltiples programas como: AutodockVina, PyrX, SwissDock, Jamda, MOE

T.E.S.T (*Toxicity Estimation Software Tool*) .- <https://www.epa.gov/chemical-research/toxicity-estimation-software-tool-test>

Este tipo de programa informático se desarrolló para que fácilmente se pueda estimar la toxicidad de sustancias químicas utilizando la tecnología QSARs (*Quantitative Structure Activity Relationships*), estos son modelos matemáticos que se usan para predecir valores de toxicidad a partir de las características físicas de la estructura de las moléculas (descriptores moleculares). Las pruebas toxicológicas es frecuente llevarlas a cabo durante el desarrollo preclínico de una molécula que se pretenda utilizar en humanos.

### ARCHIVOS INFORMÁTICOS MOLECULARES.

Tipos:

.Smiles.- OC(=O)CC[C@H](CP(O)(O)=O)C(O)=O (*Simplified Molecular Input Line Entry System*). Es un tipo de anotación química que permite al usuario representar una estructura química, de tal forma, que pueda ser usada en un ordenador.

.Inchi.-InChI=1S/C6H11O7P/c7-5(8)2-1-4(6(9)10)3-14(11,12)13/h4H,1-3H2,(H,7,8)(H,9,10)(H2,11,12,13)/t4-/m1/s1.(*International Chemical Identifier*) Es un identificador de sustancias químicas diseñado para proporcionar una forma estándar y legible de codificar la información molecular y para facilitar la búsqueda de información en bases de datos (IUPAC y NIST).



.Pdb. Formato de archivo con datos estructurales en 3D original de la base de datos PDB (*Protein Data Bank*).

.Pdbqt. Formato de archivo molecular en 3D generado con AutoDockTools y que puede contener hasta 9 conformeros de una molécula ordenados por su  $\Delta G$  (energía de afinidad).

.Mol2 . Es un archivo que se utiliza para almacenar un modelo de molécula. Los datos de dicho archivo se guardan en formato SYBYL. Técnicamente, Mol2 es un archivo de texto sin formato que contiene toda la información necesaria para visualizar la molécula (incluidas las coordenadas 3 D). Muy a menudo, los archivos Mol2 están asociados con el programa SYBYL-X producido por Tripos.

.sdf (*Structure-data file*). Es un tipo de formato de archivo de datos de moléculas químicas desarrollada por MDL (Biovia) y engloba al formato molfile que contiene información de átomos, enlaces, conexiones y coordenadas de una molécula.

.mmCIF. Fue desarrollado por la IUCr (International Union of Crystallography) para ampliar el formato .CIF (*Crystallographic Information File*), de representación de datos, utilizado para describir las estructuras de moléculas pequeñas y los experimentos de difracción asociados.

## 5-RESULTADOS Y COMENTARIOS.

### 5.1.- Buscar dianas con alto potencial farmacológico, para el cáncer, en los enzimas de la Glicólisis y generar el mapa de dichos receptores con sus características estructurales.

Una de las fuentes importantes de datos para este estudio proviene de la base de datos PDB (*Protein Data Bank*) y la identificación de las estructuras de las enzimas de la glicólisis que se emplearán en posteriores etapas del trabajo. Para ello, se aplicaron los criterios mencionados en materiales y métodos y se realizó una búsqueda en la base de datos del PDB de las enzimas de la glicólisis que tienen disponible su estructura. En la tabla 1 se recogen los códigos PDB de las diferentes estructuras seleccionadas.

Tabla 1: Código PDB seleccionado de las enzimas de la glicólisis.

ENZIMAS-GLICOLISIS-2A	ENZIMAS-GLICOLISIS-2B	ENZIMAS-GLICOLISIS-1

ENZIMA	PDB	ENZIMA	PDB	ENZIMA	PDB
ALDOLASA	6XMH	ENOLASA	3B97	LDHA	5W8L
FFRUCTOKINASA	4XZ2	FGLICERATOKINASA	3C3B	PIRUVATOKINASAM2	1T5A
G6PISOMERASA	1LAT	FGLICERATOMUTASA	5Y2L	TPISOMERASA	4POC
HEXOKINASA	2N2T	GLICERALDEHIDOPDESH	4WNC		
PFKFB3	2L1V				

Con los datos estructurales de las moléculas descritas en la tabla 1 y el sistema informático Proteinsplus en su variante informática DogsiteScorer que describe zonas topológicas en

la macromolécula, basándose en propiedades fisicoquímicas, que se corresponden con posibles receptores que pueden acoplar ligandos con una afinidad importante y que el programa define con la variable numérica (0-10) el índice de afinidad farmacológica (la probabilidad de ser un receptor con utilidad farmacológica). En la siguiente tabla 2, se ordenan los receptores de alta afinidad farmacológica (0,8-1) de los enzimas de la glicólisis. Los criterios de elección son:

1-Afinidad farmacológica elevada 0,8 a 1.

2-Se eligen al menos 3 receptores por enzima para favorecer el hallazgo de ligandos, aunque el índice farmacológico sea inferior a 0,8.

Tabla 2: Receptores moleculares en enzimas de la glicólisis ordenados por el índice de afinidad farmacológica

Nº	índice Farmacológico	Receptor	Enzima	PDB
1	0.9	P_0	GPisomerasa	1IAT
2	0.88	P_1	Enolasa	3B97
3	0.86	P_1	FGliceratoKinasa	3C3B
4	0.86	P_7	PKM2	1T5A
5	0.85	P_8	PKM2	1T5A
6	0.84	P_4	Hexokinasa	2N2T
7	0.84	P_8	Hexokinasa	2N2T
8	0.84	P_2	GDPDH	4WNC
9	0.84	P_7	GDPDH	4WNC
10	0.83	P_3	GDPDH	4WNC
11	0.83	P_4	GDPDH	4WNC
12	0.83	P_5	GDPDH	4WNC
13	0.83	P_6	GDPDH	4WNC
14	0.83	P_6	Hexokinasa	2N2T
15	0.82	P_0	FFructokinasa	4XZ2
16	0.82	P_3	Hexokinasa	2N2T
17	0.82	P_10	PKM2	1T5A
18	0.82	P_9	PKM2	1T5A
19	0.82	P_2	LDHA	5W8L
20	0.82	P_8	GDPDH	4WNC
21	0.82	P_12	Enolasa	3B97
22	0.82	P_0	FGliceratoMutasa	5Y2I
23	0.81	P_9	GDPDH	4WNC
24	0.81	P_4	Enolasa	3B97
25	0.81	P_1	FFructoKinasa	4XZ2
26	0.81	P_10	FFructoKinasa	4XZ2
27	0.81	P_0	PFKFB3	2I1V

28	0.81	P_1	PKM2	1T5A
29	0.81	P_11	PKM2	1T5A
30	0.81	P_16	PKM2	1T5A
31	0.81	P_0	LDHA	5W8L
32	0.81	P_1	LDHA	5W8L
33	0.81	P_3	LDHA	5W8L
34	0.80	P_0	GDPDH	4WNC
35	0.80	P_0	Enolasa	3B97
36	0.80	P_0	FGliceratoKinasa	3C3B
37	0.80	P_0	Aldolasa	6XMH
38	0.80	P_2	Aldolasa	6XMH
39	0.80	P_0	Hexokinasa	2N2T
40	0.80	P_1	Hexokinasa	2N2T
41	0.80	P_2	Hexokinasa	2N2T
42	0.80	P_0	TPI	4POC
43	0.79	P_1	Aldolasa	6XMH
44	0.76	P_1	PFKFB3	211V
45	0.73	P_2	FGliceratoKinasa	3C3B
46	0.73	P_1	FGliceratoMutasa	5Y2I
47	0.73	P_1	G6Pisomerasa	1IAT
48	0.73	P_3	G6Pisomerasa	1IAT
49	0.72	P_2	FGliceratomutasa	5Y2I
50	0.70	P_1	TPI	4POC
51	0.61	P_2	TPI	4POC
52	0.55	P_3	PFKFB3	211V

Los receptores, con su afinidad farmacológica, también se pueden distribuir por enzimas de la glicólisis, lo cual, se puede consultar en la Tabla 4 del objetivo 2.

El programa Dogsitescorer aporta múltiples datos estructurales de los receptores como: volumen, superficie interior, etc... que son cuantificables, pero no si el receptor es superficial o profundo en la macromolécula, lo cual depende de la apreciación del observador. Además, en la conexión con el programa Siena se pueden obtener los aminoácidos que componen el receptor.

En este estudio académico se elige el enzima triosa fosfato isomerasa (TPI) como objetivo de estudio pormenorizado (Figura 16) y, en particular, el receptor P\_1 que es el tema central del objetivo 3. En la tabla 3 se recogen alguno de los datos estructurales de los tres receptores obtenidos para el enzima TPI. A continuación, se estudia el receptor P\_1 desde un punto de vista estructural:

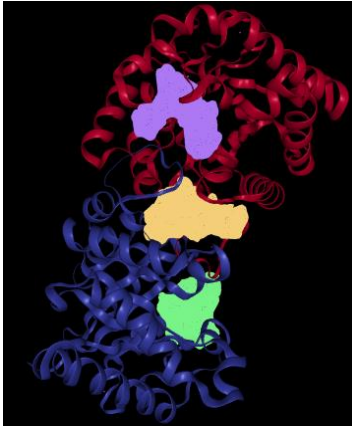





Figura 16: Receptores obtenidos para la TPI (código pdb: 4POC). En violeta se indica el receptor P\_1, en verde el P\_2 y en amarillo del P\_0. Fuente: w3ProteinsPlus/DogsiteScorer

Tabla 3: Datos estructurales de los receptores del enzima TP1.

	Receptor	Volumen en Å <sup>3</sup> cúbicos	Superficie en Å <sup>2</sup> cuadrados	Índice de afinidad farmacológica
	P_0	673,83	660,19	0,8
	P_1	476,11	673,27	0,7
	P_2	373,56	479,08	0,61

### RECEPTOR P\_1:

Es un receptor relativamente pequeño en volumen (476,11 Å<sup>3</sup> cúbicos). A continuación, se muestran características de tamaño, estructura, átomos y aminoácidos provenientes de: w3. Protein.Plus/Dogsitescorer.

Características de tamaño y forma

-volumen (Å<sup>3</sup>)      476,11

-superficie (Å<sup>2</sup>)      673,27

-profundidad (Å)      14,54

Características de los elementos químicos del receptor:

-Átomos del receptor      104

-Carbonos (C)      70

-Nitrógenos (N)      14

-Oxígenos (O)      20

Características de los grupos funcionales:

-Donantes de enlaces de hidrógeno      13

-Aceptores de enlaces de hidrógeno	32
-Metales	0
-Interacciones hidrofóbicas	24
-Relación de hidrofobicidad	0,35
Composición de aminoácidos:	
-Ratio de aminoácidos apolares	0,38
-Ratio de aminoácidos polares	0,42
-Ratio de aminoácidos con carga +	0,12
-Ratio de aminoácidos con carga -	0,08

Aminoácidos:

-ALA (2), ASN (2), GLU (2), GLY (5), HIS (2), ILE (1), LEU (2), LYS (1), SER (3), TRH (1), TRP(1), VAL(4) .

### RECEPTOR P\_1.-

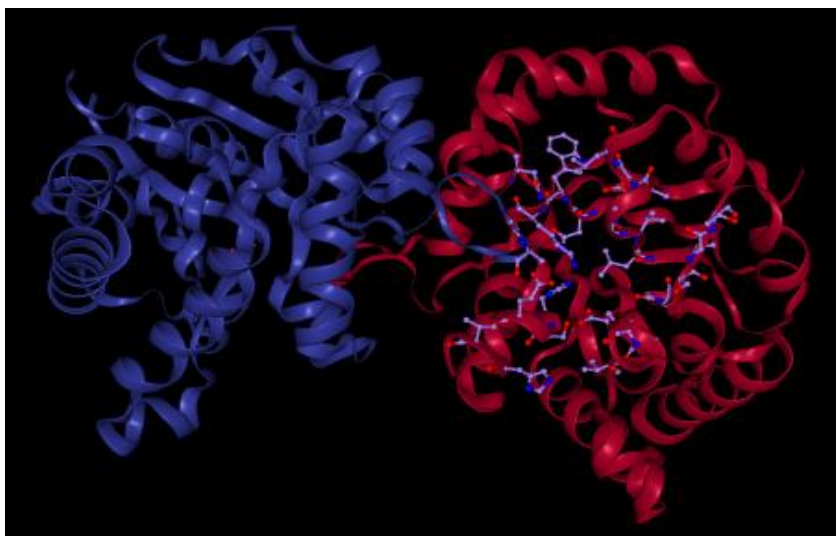


Figura 17: Aminoácidos representados en formato de bolas y varillas indicando la situación del receptor P\_1. Fuente: w3.ProteinsPlus/Siena

Los aminoácidos pertenecientes al receptor P\_1, obtenidos por el sistema informático w3. ProteinPlus/Siena, se describen a continuación (Figura 17):

ASN\_11\_A,TRP\_12\_A,LYS\_13\_A,ASN\_15\_A,HIS\_95\_A,SER\_96\_A,GLU\_97-A,HIS\_100\_A,VAL\_101\_,GLU\_165\_A,VAL\_167\_A,ILE\_170\_A,GLY\_209\_A,GLY\_210\_A,SER\_211\_A,VAL\_212\_A,THR\_213\_A,LEU\_230\_A,VAL\_231\_A,GLY\_232\_A,GLY\_233\_A,SER\_235\_A,LEU\_236\_A,GLY\_72\_B,ALA\_73\_B.

**5.2.-. Con la base de datos PDB y el programa informático ProteinsPlus/Siena conseguir la relación de receptores, del objetivo 1, asociados a ligandos.**

Determinado el receptor en DogsiteScorer se hace transferencia de sus datos a ProteisPlus/Siena que nos busca todos los receptores similares al elegido en PDB con sus macromoléculas correspondientes y si disponen de ligandos o no, todo esto se cuantifica y se muestra en la tabla siguiente (Tabla 4):

Tabla 4: Ligandos asociados a enzimas de la glicólisis y entradas provenientes de PDB de receptores similares.

### EnzimasGlico-1

LDHA (5W8L). -

NOMBRE	Índice Farmacológico	Nº Lig-Enzimas	PDB Entradas
P_2	0,82	18	410
P_0	0,81	246	410
P_1	0,81	15	409
P_3	0,81	15	414

PKM2 (1T5A). -

NOMBRE	índice Farmacológico	Nº Lig-Enzimas	PDB Entradas
P_7	0,86	0	398
P_8	0,85	0	725
P_10	0,82	12	298
P_9	0,82	109	291
P_0	0,81	0	618
P_1	0,81	0	626
P_11	0,81	12	298
P_16	0,81	108	285
P_2	0,81	0	296
P_3	0,81	0	602
P_14	0,8	108	285
P_15	0,8	108	285
P_6	0,8	*No disponible	*No disponible

TPI (4POC). -

NOMBRE	Índice	Nº	PDB
--------	--------	----	-----

	Farmacológico	Lig-Enzimas	Entradas
P_0	0,8	0	126
P_1	0,7	5	294
P_2	0,61	11	312

## EnzimasGlico-2 A

HEXOQUINASA-2 (2NZT). -

NOMBRE	Índice Farmacológico	Nº Lig-Enzimas	PDB Entradas
P_4	0,84	0	25
P_8	0,84	1	30
P_6	0,83	0	25
P_3	0,82	0	25
P_0	0,8	0	25
P_1	0,8	17	28
P_2	0,8	6	34

FFRUCTOQUINASA (4XZ2). -

NOMBRE	Índice Farmacológico	Nº Lig-Enzimas	PDB Entradas
P_3	0,86	0	37
P_2	0,85	0	32
P_12	0,84	30	45
P_8	0,83	1	41
P_0	0,82	0	32
P_1	0,81	0	32
P_10	0,81	0	32
P_4	0,8	0	41

PFKB3 (2L1V).-

NOMBRE	Índice Farmacológico	Nº Lig-Enzimas	PDB Entradas
P_0	0,81	22	35
P_1	0,76	5	39
P_3	0,55	0	35

G6PISOMERASA (1LAT).-

NOMBRE	Índice Farmacológico	Nº Lig-Enzimas	PDB Entradas
P_0	0,9	0	70
P_1	0,73	31	114
P_3	0,73	0	72

ALDOLASA (6XMH).-

NOMBRE	Índice Farmacológico	Nº Lig-Enzimas	PDB Entradas
P_0	0,8	0	230
P_2	0,8	49	211
P_1	0,79	48	196

## EnzimasGlico-2B

GLICERALDEHIDO FOSFATO DESHIDROGENASA (4WNC).-

NOMBRE	Índice Farmacológico	Nº Lig-Enzimas	PDB Entradas
P_2	0,84	175	292
P_7	0,84	175	293
P_3	0,83	175	292
P_4	0,83	178	292
P_5	0,83	194	308
P_6	0,83	193	308
P_8	0,82	179	292
P_9	0,81	177	292

FOSFOGLICERATOQUINASA(3C3B). -

NOMBRE	Índice Farmacológico	Nº Lig-Enzimas	PDB Entradas
P_1	0,86	20	40
P_0	0,8	0	0
P_2	0,73	16	45

FOSFOGLICERATOMUTASA (5Y2L)

NOMBRE	índice Farmacológico	Nº Lig-Enzimas	PDB Entradas
P_0	0,82	13	61
P_1	0,73	0	36
P_2	0,72	0	36

ENOLASA(3B97)

NOMBRE	índice Farmacológico	Nº Lig-Enzimas	PDB Entradas
P_1	0,88	0	8



P_12	0,82	*No disponible	*No disponible
P_4	0,81	*No disponible	*No disponible
P_0	0,8	0	4

\*.-Los accesos al servidor de ProteinsPlus (Universidad de Hamburgo) fueron muy dificultosos por múltiples cortes y señalización de errores (Siena) con un periodo de más de 2 meses para completar la tabla 4.

Derivado de los resultados de la tabla 4 se constituye la tabla 5 con todas las macromoléculas con los receptores similares que disponen de ligandos y a partir de estos datos se puede averiguar que ligandos están disponibles en cada receptor. Una vez conocidos los ligandos disponibles para cada receptor con DogsiteScorer se puede disponer del código smiles del ligando y su fórmula química. Con el archivo smiles del ligando se puede proceder a cargar en SwissSimilarity para la búsqueda de moléculas (*hits*) que sean aspirantes a probables fármacos.

Tabla 5: Receptores con ligandos asociados encontrados por Siena en PDB. Ordenados por índice farmacológico.

Nº	índice Farmacológico	Receptor	Enzima	PDB Código	Nº Lig-Enzima	PDB Entradas
1	0,86	P_1	FGliceratokinasa	3C3B	20	40
2	0,84	P_8	Hexokinasa-2	2NZZ	1	30
3	0,84	P_12	FFructokinasa	4XZ2	30	45
4	0,84	P_2	GliceraldehidoPDeshidrog.	4WNC	175	292
5	0,84	P_7	"	4WNC	175	293
6	0,83	P_8	FFructokinasa	4XZ2	1	41
7	0,83	P_3	GliceraldehidoPDeshidrog.	4WNC	175	292
8	0,83	P_4	"	4WNC	178	292
9	0,83	P_5	"	4WNC	194	308
10	0,83	P_6	"	4WNC	193	308
11	0,82	P_2	LDH-A	5W8L	18	410
12	0,82	P_10	PKM-2	1T5A	12	298
13	0,82	P_9	PKM-2	1T5A	109	291
14	0,82	P_8	GliceraldehidoPDeshidrog.	4WNC	179	292
15	0,82	P_0	FGliceromutasa	5Y2L	13	61
16	0,81	P_0	LDH-A	5W8L	246	410
17	0,81	P_1	LDH-A	5W8L	15	409
18	0,81	P_3	LDH-A	5W8L	15	414
19	0,81	P_11	PKM-2	1T5A	12	298
20	0,81	P_16	PKM-2	1T5A	108	285
21	0,81	P_0	PFKB3	2L1V	22	35
22	0,81	P_9	GliceraldehidoPDeshidrog.	4WNC	177	292
23	0,8	P_14	PKM-2	1T5A	108	285

24	0,8	P_15	PKM-2	1T5A	108	285
25	0,8	P_1	Hexokinasa-2	2NZT	17	28
26	0,8	P_2	Hexokinasa-2	2NZT	6	34
27	0,8	P_2	Aldolasa	6XMH	49	211
28	0,79	P_1	Aldolasa	6XMH	48	196
29	0,76	P_0	PFKB3	2L1V	5	39
30	0,73	P_1	G6PIsomerasa	1LAT	31	114
31	0,73	P_2	GliceratoKinasa	3C3B	16	45
32	0,7	P_1	TPI	4POC	5	294
33	0,61	P_2	TPI	4POC	11	372

### TPI-P\_1(Triosa fosfato Isomerasa-Receptor P\_1). –

Centrándonos en el receptor P\_1 del enzima TPI, en la búsqueda realizada con Siena se obtuvieron 4 ligandos diferentes:

-PEP

-4PB

-3PG

-2PG

### Ligando PEP .-

Ácido Fosfoenol Pirúvico. Según datos de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1005> se describe el código smiles y la fórmula estructural (Figura 18):

C=C(C(=O)O)OP(=O)(O)O

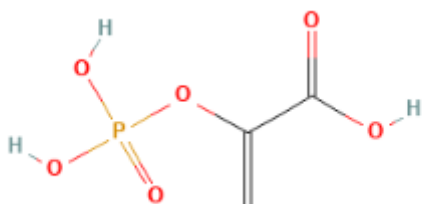


Figura 18: Código smiles (arriba) y fórmula estructural (abajo) del ácido fosfoenolpirúvico (PEP).

Según datos de Siena el ligando PEP se encontró en la triosa fosfato isomerasa del músculo de conejo, con código PDB4OWG. Una vez que se accede a 4OWG en PDB se puede visualizar la estructura en tres dimensiones a través de la opción 3D view (Figura 19) . Una vez en PDB permite exportar los datos en formato mmCIF. Este archivo se

puede leer con Discovery Studio y aportar datos estructurales importantes que se pueden visualizar en las figuras 20 y 21.

Los datos de carácter estructural provenientes del archivo mmCIF correspondiente pueden dar información de:

-Interacciones de los ligandos. Se muestran las distancias interatómicas entre ligando y macromolécula (Figura 20).

-Tipos de enlace entre ligando y macromolécula (Figura 21).

-En la superficie del receptor se pueden mostrar:

Zonas de predominio de aminoácidos aromáticos. Zonas de enlaces de H. Zonas según carga electrostática. Zonas hidrofóbicas. Zonas según ionización. Zonas de acceso del solvente al receptor.

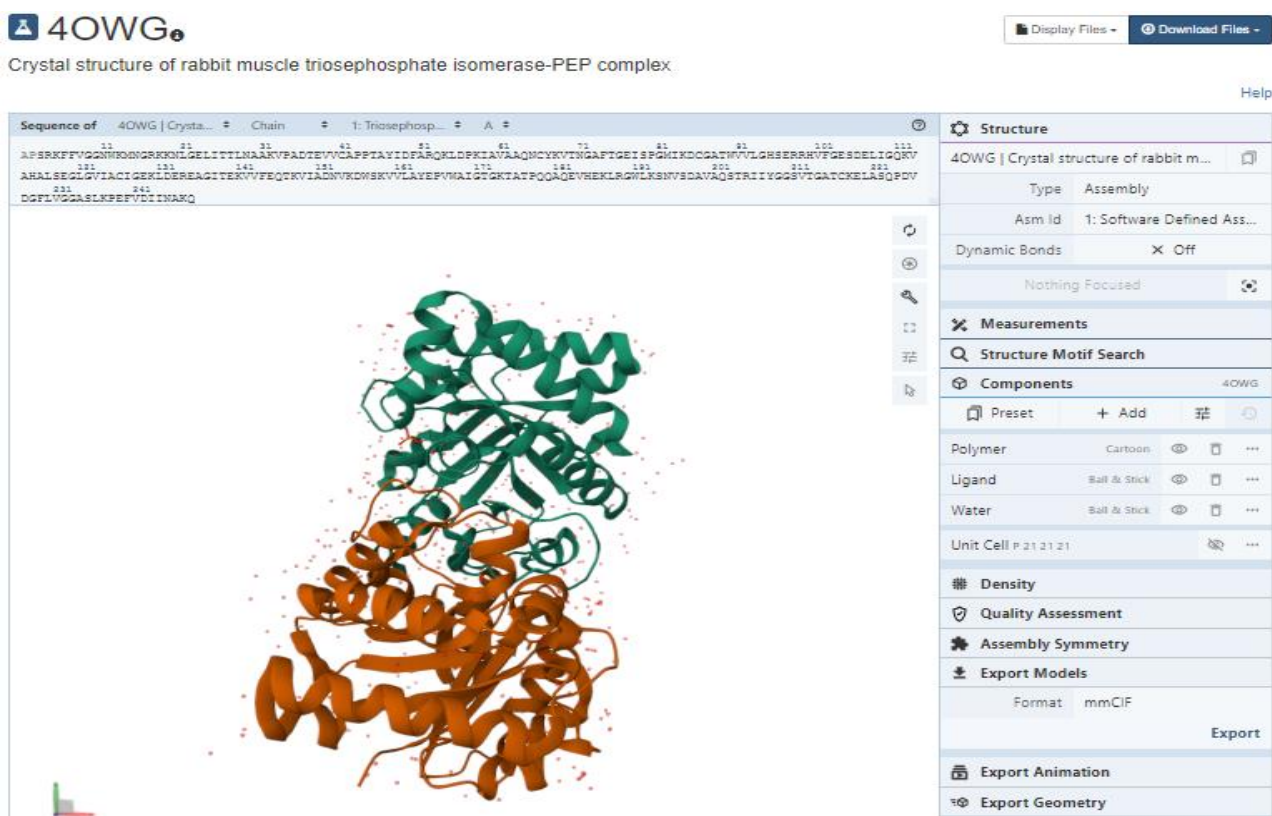


Figura 19: Complejo macromolécula-ligando PEP (Código PDB: 4OWG) en opción 3D view y archivo de salida mmCIF.

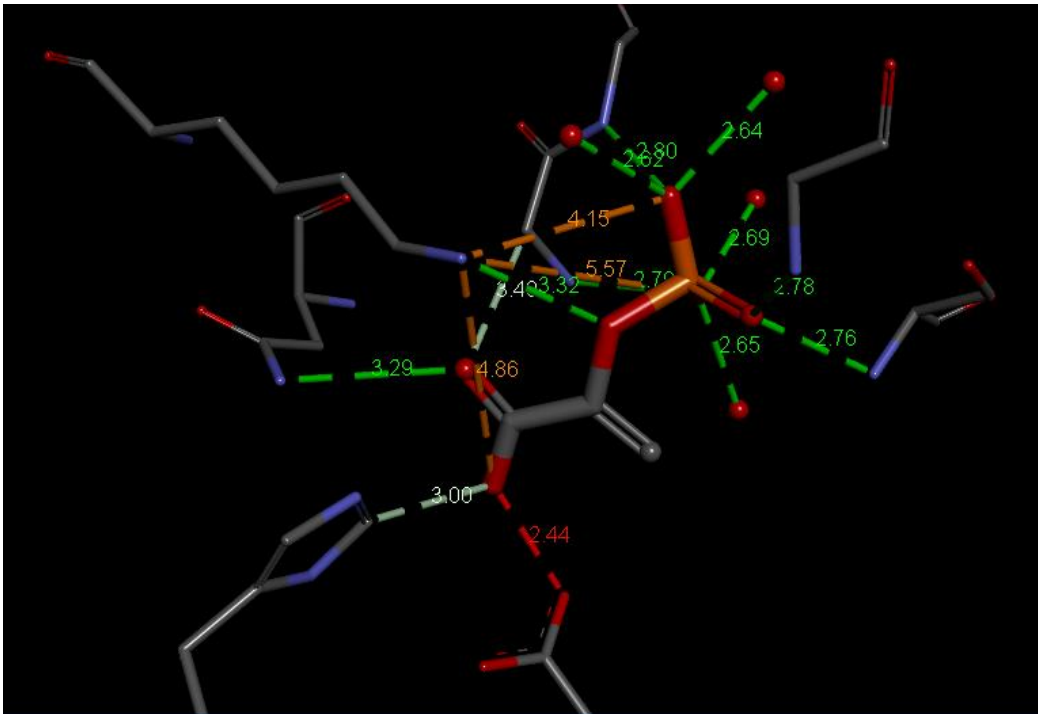
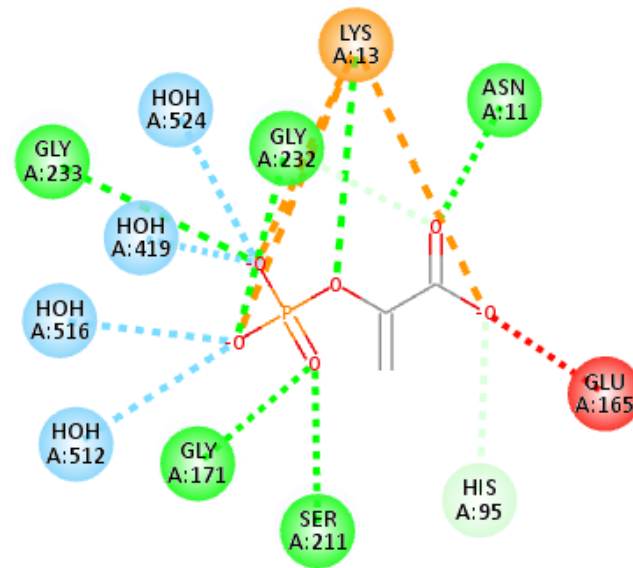


Figura 20: Discovery Studio: imagen 3D de los enlaces del PEP y sus longitudes.



**Interactions**

- |  |   |
|--|---|
|  Attractive Charge          |  Carbon Hydrogen Bond          |
|  Water Hydrogen Bond        |  Unfavorable Acceptor-Acceptor |
|  Conventional Hydrogen Bond |   |

Figura 21: Discovery Studio: Imagen 2D de los enlaces del PEP y tipos de enlace con la macromolécula.

Este proceso, también, se puede realizar con el resto de ligandos: 4PB, 3PG, 2PG.

### 5.3.-Resultados de la búsqueda de Ligandos de TPI (Triosa Fosfato Isomerasa) en el receptor P\_1:

Obtención de ligandos adecuados para *docking* molecular en formato molecular 2D tipo Smiles:

A partir de los ligandos hallados en el receptor P\_1 en formato smiles (PEP, 4PB, 3PG, 2PG) obtenidos anteriormente, se cargaron en el programa SwisSimilarity eligiendo la base de datos Zinc como proveedora de moléculas y la búsqueda en: *druglikeness*, *leadlikeness* y *fragment* tanto en 3D como en 2D para obtener ligandos similares disponibles en la base de datos Zinc. Como resultado de la búsqueda, se obtuvo un archivo de 693 moléculas en formato smiles.

El archivo completo de los ligandos obtenidos para el receptor P\_1 de TPI se puede consultar en el enlace siguiente:

[https://udcgal-my.sharepoint.com/:b:/r/personal/juan\\_svizoso\\_udc\\_es/Documents/TPI-P\\_1-%20lig-693.pdf?csf=1&web=1&e=6intDW](https://udcgal-my.sharepoint.com/:b:/r/personal/juan_svizoso_udc_es/Documents/TPI-P_1-%20lig-693.pdf?csf=1&web=1&e=6intDW)

Con el archivo anterior de 693 moléculas se procedió a realizar *docking* molecular con Jamda y así, a través, de la función de puntuación disponible obtener un archivo ordenado pero en formato mmCIF que se puede manejar con el programa Discovery Studio. Como el programa Jamda no admite el formato smiles pero si el formato inchi, se tuvo que recurrir al programa Open Babel para transformar los archivos smiles en inchi y posteriormente se cargaron en Jamda para el proceso de *docking* molecular. Jamda dispone, procedentes de Dogsite scorer y Siena, los datos de la macromolécula y del receptor correspondiente. Los archivos de datos entregados por Jamda se pueden consultar en el enlace siguiente:

[https://udcgal-my.sharepoint.com/:f:/r/personal/juan\\_svizoso\\_udc\\_es/Documents/TPI-P\\_1-lig-693-Jamda?csf=1&web=1&e=ciaYJi](https://udcgal-my.sharepoint.com/:f:/r/personal/juan_svizoso_udc_es/Documents/TPI-P_1-lig-693-Jamda?csf=1&web=1&e=ciaYJi)

La primera molécula según *score* (puntuación) de Jamda (-235.331) es la 2-(fosfonometil)-ácido pentanedioico (2-PMPA, 2-(phosphonomethyl)-pentanedioic acid) (Figura 22) cuyo formato smiles es el siguiente:

P(=O)([O-])([O-])C[C@H](C(=O)O)CCC(=O)[O-]

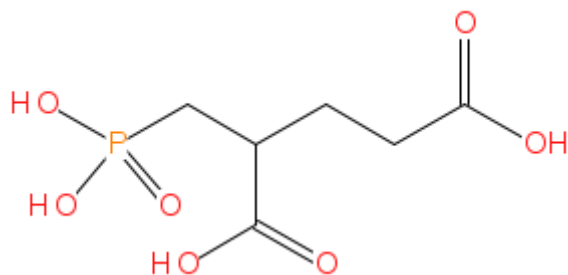


Figura 22: Representación molecular de la molécula 2-PMPA, 2-(phosphonomethyl) pentanedioic acid

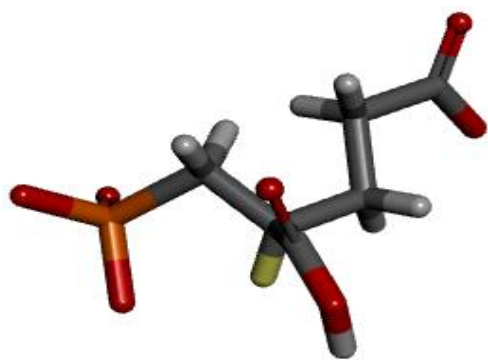
Se puede describir un:

-Perfil ADME-farmacológico (SwissAdme). <http://www.swissadme.ch/>

Se introduce la molécula en formato smiles en el programa arriba indicado y nos da unos resultados que nos informan de que es una molécula soluble en agua y con unas características farmacocinéticas que indican que su absorción por el tracto digestivo es baja y que no inhibe citocromos (CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4). En la probabilidad como fármaco (*druglikeness*) cumple con las reglas de Lipinsky. Y para su síntesis la dificultad es baja 3.80 (0-10).

-Perfil estructural (Discovery Studio).

Con el archivo en formato mmCIF que contiene datos estructurales de la molécula (ligando) obtenidos mediante medios experimentales, no son datos basados en predicciones, se pueden cargar en el programa Discovery Studio y visualizar las características estructurales (Figura 23).



Index	Name	Visible	Tagged	Visibility Locked	JAMDA Score	JAMDA Rank	RMSD
1	_1	<input checked="" type="checkbox"/> Yes	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> No	-2,35331	1	nan

Figura 23: Representación en varillas de la molécula 2-PMPA, 2-(phosphonomethyl) pentanedioic acid obtenida con Discovery Studio.

-Perfil de Interacciones (SwissTargetPrediction). <http://www.swisstargetprediction.ch/>

Con la molécula en formato smiles se carga en el programa SwissTargetPrediction para obtener un perfil de interacciones y nos entrega los siguientes resultados (Figura 24):





Target	Common name	Uniprot ID	ChEMBL ID	Target Class	Probability*	Known actives (3D/2D)
Glutamate carboxypeptidase II	FOLH1	Q04609	CHEMBL1892	Protease		13 / 14 
NAALADase II	NAALAD2	Q9Y3Q0	CHEMBL2609	Protease		1 / 1 

Figura 24: Resultado obtenido con SwissTargetPrediction tras cargar la molécula 2-PMPA en formato smiles.

Que indican interacción, con alta probabilidad, con las proteasas:

-Carboxipeptidasa del glutamato II

-NAALADasa II (N-acilado-alfa-L vinculado amino dipeptidasa II)

-Perfil toxicológico (TEST). -

La molécula en formato smiles se carga en el programa T.E.S.T para obtener el perfil toxicológico y se obtienen los resultados que se muestran a continuación (Figura 25):

Prediction results		
Endpoint	Experimental value	Predicted value
Mutagenicity value	N/A	0,26
Mutagenicity result	N/A	Mutagenicity Negative

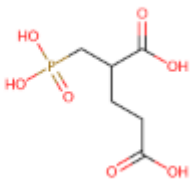
Individual Predictions		
Method	Predicted value	
Hierarchical clustering	0,19	
Nearest neighbor	0,33	

Figura 25: Resultado obtenido con TEST tras cargar la molécula 2-PMPA en formato smiles.

En este caso el resultado muestra que la mutagenicidad de la molécula es negativa, lo cual es muy importante para poder proseguir las pruebas *in vitro* y posteriormente si todos los resultados son adecuados empezar con la fase clínica.

## 6-CONCLUSIONES.

El estudio del área de la bioenergética del cáncer con la aplicación de poderosas técnicas bioinformáticas, hoy en día disponibles, puede suponer una ayuda importante para conseguir nuevos fármacos más eficaces y poder ser usados en casos avanzados de la enfermedad.

El avance en el estudio de nuevas dianas terapéuticas más específicas (receptores enzimáticos de alta afinidad farmacológica) en colaboración con técnicas avanzadas de *docking* y cribado molecular significa un acortamiento en tiempo y recursos económicos en la consecución de fármacos específicos.

Como toda tecnología puede tener sus dificultades y puntos débiles, en este caso, uno de los más destacados es la presencia de hallazgos tipo falsos positivos que son moléculas que a nivel virtual dan parámetros muy aptos para su posterior uso, pero, en la práctica del laboratorio, en pruebas *in vitro*, el resultado es negativo y para ello se recurre a pruebas de inhibición enzimática *in vitro* que en el caso de inhibición enzimática acompetitiva serían las rectas del doble recíproco (Linevauer-Burk).

El futuro pasa por un refinamiento de las técnicas de *docking* y cribado virtual molecular que disminuyan los resultados falsos positivos y una mayor rapidez en la consecución de moléculas con capacidad inhibitoria enzimática importante.

En el objetivo 1 se consiguió un listado de 52 receptores, ordenados por el índice de afinidad farmacológica y en el objetivo 2 un listado de 33 receptores con ligandos asociados lo que significa que en un 63% de los receptores podremos utilizar el método de similitud de ligandos con su alta eficiencia para conseguir listados de moléculas que una vez procesadas por *docking* molecular y ordenadas (función de puntuación) tendremos un listado o archivo de moléculas que en colaboración con la base Zinc20 conseguir ,de ellas, todas las disponible comercialmente. Con estas moléculas se puede pasar a una fase “*in vitro*” de cuantificación inhibitoria celular (prueba citotóxica cuantificadora por MTT) y calcular el IC50 (dosis inhibitoria en que es viable el 50% de la población celular) y que se puede comparar con la IC50 de los fármacos disponibles en la clínica. En la prueba citotóxica con MTT (sales de tetrazolio ) se utilizan cultivos celulares 2D correspondientes al tipo de cáncer específico.

El MTT es un compuesto perteneciente a la familia de sales de tetrazolio, soluble en agua y con color amarillo. Al reducirse, el MTT se convierte en un compuesto de la familia formazanos, de color violeta e insoluble en agua. Para cuantificarlo se suele disolver en un disolvente orgánico, como DMSO (dimetilsulfóxido) y se mide su color mediante la A570.



## 7- REFERENCIAS.

1. Tomotaka Ugai. Is early-onset cancer an emerging global epidemic? current evidence and future implications. *Nature*.
2. Lunt SY, Fendt SM. Metabolism – A cornerstone of cancer initiation, progression, immune evasion and treatment response. *Curr Opin Syst Biol*. 2018 Apr 1;8:67–72.
3. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* [Internet]. 2011;144(5):646–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
4. Pavlova NN, Thompson CB. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metab* [Internet]. 2016;23(1):27–47. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2015.12.006>
5. Pérez-Tomás R, Pérez-Guillén I. Lactate in the tumor microenvironment: An essential molecule in cancer progression and treatment. *Cancers (Basel)*. 2020;12(11):1–29.
6. Vaupel P, Multhoff G. Revisiting the Warburg effect: historical dogma versus current understanding. *Journal of Physiology*. 2021 Mar 1;599(6):1745–57.
7. Mazurek S, Boschek CB, Hugo F, Eigenbrodt E. Pyruvate kinase type M2 and its role in tumor growth and spreading. Vol. 15, *Seminars in Cancer Biology*. 2005. p. 300–8.
8. Fukushi A, Kim H Do, Chang YC, Kim CH. Revisited Metabolic Control and Reprogramming Cancers by Means of the Warburg Effect in Tumor Cells. *Int J Mol Sci*. 2022;23(17).
9. Zahra K, Dey T, Ashish, Mishra SP, Pandey U. Pyruvate Kinase M2 and Cancer: The Role of PKM2 in Promoting Tumorigenesis. *Front Oncol*. 2020;10(March):1–9.
10. Zhu S, Guo Y, Zhang X, Liu H, Yin M, Chen X, et al. Pyruvate kinase M2 (PKM2) in cancer and cancer therapeutics. *Cancer Lett* [Internet]. 2021;503(August 2020):240–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.11.018>
11. Pekel G, Ari F. Therapeutic Targeting of Cancer Metabolism with Triosephosphate Isomerase. *Chem Biodivers* [Internet]. 2020 May 1 [cited 2021 Oct 29];17(5):e2000012. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cbdv.202000012>
12. Ciscato F, Ferrone L, Masgras I, Laquatra C, Rasola A. Hexokinase 2 in cancer: A prima donna playing multiple characters. *Int J Mol Sci*. 2021;22(9).
13. Han J, Deng X, Sun R, Luo M, Liang M, Gu B, et al. GPI Is a Prognostic Biomarker and Correlates With Immune Infiltrates in Lung Adenocarcinoma. *Front Oncol*. 2021;11(November):1–19.
14. Lang L, Chemmalakuzhy R, Shay C, Teng Y. PFKP signaling at a glance: An emerging mediator of cancer cell metabolism. *Adv Exp Med Biol*. 2019;1134:243–58.
15. Wang Y, Qu C, Liu T, Wang C. PFKFB3 inhibitors as potential anticancer agents: Mechanisms of action, current developments, and structure-activity relationships. *Eur J Med Chem* [Internet]. 2020;203:112612. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112612>

16. Zhang JY, Zhang F, Hong CQ, Giuliano AE, Cui XJ, Zhou GJ, et al. Critical protein GAPDH and its regulatory mechanisms in cancer cells. *Cancer Biol Med*. 2015;12(1):10–22.
17. Liu H, Wang X, Shen P, Ni Y, Han X. The basic functions of phosphoglycerate kinase 1 and its roles in cancer and other diseases. *Eur J Pharmacol* [Internet]. 2022;920(January):174835. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2022.174835>
18. Fu Q, Yu Z. Phosphoglycerate kinase 1 (PGK1) in cancer: A promising target for diagnosis and therapy. *Life Sci*. 2020;256(February).
19. Sharif F, Rasul A, Ashraf A, Hussain G, Younis T, Sarfraz I, et al. Phosphoglycerate mutase 1 in cancer: A promising target for diagnosis and therapy. *IUBMB Life*. 2019;71(10):1418–27.
20. Huang CK, Sun Y, Lv L, Ping Y. ENO1 and Cancer. *Mol Ther Oncolytics* [Internet]. 2022;24(March):288–98. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.omto.2021.12.026>
21. Almaguel FA, Sanchez TW, Ortiz-Hernandez GL, Casiano CA. Alpha-Enolase: Emerging Tumor-Associated Antigen, Cancer Biomarker, and Oncotherapeutic Target. *Front Genet*. 2021;11(January):1–9.
22. Zhao H, Li Y. Cancer metabolism and intervention therapy. *Molecular Biomedicine*. 2021;2(1):1–27.
23. Gonzales G, Gonzales Castañeda C, Espinosa Guerinoni D, Rojas Tubeh C. La oxidación del piruvato. *Acta Médica Peruana*. 2007;24(3):187–97.
24. Volkamer A, Griewel A, Grombacher T, Rarey M. Analyzing the topology of active sites: On the prediction of pockets and subpockets. *J Chem Inf Model*. 2010 Nov 22;50(11):2041–52.
25. [http://facultatciencies.uib.cat/prof/josefa.donoso/campus/modulos/modulo4/modulo4\\_14.htm](http://facultatciencies.uib.cat/prof/josefa.donoso/campus/modulos/modulo4/modulo4_14.htm)
- 26 [https://udcgal-my.sharepoint.com/:b:/r/personal/juan\\_svizoso\\_udc\\_es/Documents/TPI-P\\_1-%20lig-693.pdf?csf=1&web=1&e=6intDW](https://udcgal-my.sharepoint.com/:b:/r/personal/juan_svizoso_udc_es/Documents/TPI-P_1-%20lig-693.pdf?csf=1&web=1&e=6intDW)
- 27 [https://udcgal-my.sharepoint.com/:f:/r/personal/juan\\_svizoso\\_udc\\_es/Documents/TPI-P\\_1-lig-693-Jamda?csf=1&web=1&e=ciaYJi](https://udcgal-my.sharepoint.com/:f:/r/personal/juan_svizoso_udc_es/Documents/TPI-P_1-lig-693-Jamda?csf=1&web=1&e=ciaYJi)

