



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

IDENTIFICACIÓN DE POTENCIALES ESTABILIZADORES DEL
CUARTETO-G TELOMÉRICO COMO AGENTES
ANTITUMORALES

Autora

Melissa Correa Osorio

Año

2020



FACULTAD DE INGENIERÍAS Y CIENCIAS APLICADAS

IDENTIFICACIÓN DE POTENCIALES ESTABILIZADORES DEL CUARTETOG
TELOMÉRICO COMO AGENTES ANTITUMORALES

Trabajo de titulación presentado en conformidad con los requisitos establecidos
para optar por el título de Ingeniera en biotecnología

Profesor Guía
Dr. Yunierkis Pérez Castillo

Autora
Melissa Correa Osorio

Año
2020

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

"Declaro haber dirigido el trabajo, Identificación de potenciales estabilizadores del cuarteto-g telomérico como agentes antitumorales, a través de reuniones periódicas con el estudiante Melissa Correa Osorio en el semestre 202010, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".



Ynierkis Pérez Castillo

Doctor en ciencias

C.I.:1756959035

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

"Declaro haber revisado este trabajo, Identificación de potenciales estabilizadores del cuarteto-g telomérico como agentes antitumorales, del estudiante Melissa Correa Osorio en el semestre 202010, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".



Eduardo Tejera Puente
Doctor en Ciencias Farmacéuticas
C.I 1756501977

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

"Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes"

Melissa Correa O.

Melissa Correa Osorio

C.I.1759852922

AGRADECIMIENTO

A mis padres y hermano por todo su soporte incondicional, su amor y comprensión en cada etapa de mi vida. A Jerry por ser mi compañero fiel durante los últimos años. A Santiago Solórzano y al Dr. Yunierkis Pérez por su valiosa orientación.

DEDICATORIA

Este trabajo de titulación va especialmente dedicado a mis padres Carlos y Bety por su ayuda y motivación en los buenos y malos momentos, por escucharme y aconsejarme siempre que lo necesité y sobre todo por confiar en mí. Por siempre inculcarme buenos valores, para ser mejor cada día y a nunca desfallecer ante los obstáculos.

RESUMEN

El cáncer es una de las principales causas de muerte en la actualidad. Los mecanismos que interfieren en el desarrollo de la enfermedad son varios. Existen factores comunes cuando se desarrolla la actividad tumoral. Este es el caso de la telomerasa, una enzima que se encuentra inactiva en las células somáticas, pero que en el 80% de células cancerígenas recupera su actividad. La principal acción de la telomerasa se relaciona con conferirle inmortalidad al telómero, al evitar que se dé el acortamiento natural. Esta característica refleja que el tamaño del telómero y la presencia de la telomerasa pueden ser indicadores del desarrollo de tumorogénesis. La forma estructural del telómero indica que la estabilidad del Tloop es efectuada por una agrupación de guaninas (G4). Por lo tanto, Conseguir la estabilidad de G4 podría tener un efecto antitumoral, ya que se ha comprobado que al interactuar con moléculas pequeñas bloquea la actividad de la telomerasa. Encontrar estabilizadores para G4 se puede realizar en el laboratorio, sin embargo la probabilidad de éxito es baja, además de ser costosa. Para solucionar este problema la química computacional resulta ser una buena estrategia. Para la ejecución del presente trabajo se emplearon técnicas de acoplamiento y cribado virtual para encontrar estabilizadores de G4. Se usó un total de 108 moléculas activas y 3620 señuelos. Para mejorar la calidad de los resultados se aplicaron combinaciones de programas de acoplamiento (Dock6, Gold y OpenEye) con quince funciones de puntuación energética. Para la validación externa se usó el modelo CompScore. Se dividió el 80% de ligandos y 80% de señuelos de forma aleatoria para el entrenamiento del modelo. Los valores restantes se usaron para la validación. Con los datos de entrenamiento se maximizo el enriquecimiento de los activos usando BEDROC con un $\alpha=160,9$. El modelo resultante se usó para recalificar los datos de validación con un factor de enriquecimiento (EF) al 1% de los datos. Los resultados mostraron 6 compuestos activos con EF=40,4 lo cual

indica una buena tasa para el enriquecimiento. A partir de esto se concluye que se tuvo una buena calidad por parte del modelo.

ABSTRACT

Cancer is one of the leading causes of death today. There are several mechanisms that interfere with the development of the disease. There are common factors when tumour activity develops. This is the case of telomerase, an enzyme that is inactive in somatic cells, but in 80% of cancer cells it recovers its activity. The main action of telomerase is related to conferring immortality to the telomere by preventing natural shortening. This characteristic reflects the fact that telomere size and the presence of telomerase can be indicators of the development of tumorigenesis. The structural shape of the telomere indicates that the stability of the T-loop is effected by a grouping of guanines (G4). Therefore, achieving G4 stability could have an anti-tumour effect, as it has been proven that by interacting with small molecules it blocks telomerase activity. Finding stabilizers for G4 can be done in the laboratory, however the probability of success is low and it is also expensive. To solve this problem, computational chemistry is a good strategy. For the execution of this work, docking techniques and virtual screening were used to find G4 stabilizers. A total of 108 active molecules and 3620 decoys were used. To improve the quality of the results, combinations of docking programs (Dock6, Gold and OpenEye) with fifteen energy scoring functions were applied. The CompScore model was used for external validation. 80% of ligands and 80% of decoys were randomly divided for model training. The remaining values were used for validation. With the training data the enrichment of the assets was maximized using BEDROC with a $\alpha=160.9$. The resulting model was used to rescore the validation data with an enrichment factor (EF) at 1% of the data. The results showed 6 active compounds with EF=40.4 indicating a good rate for enrichment. From this it is concluded that the model was of good quality.

Índice

1. Capitulo I. Introducción	1
1.1 Antecedentes	1
1.2 Planteamiento del problema	4
1.3 Objetivos	5
1.3.1 Objetivo general	5
1.3.2 Objetivos específicos	5
1.4 Justificación	6
2. Capitulo II. Marco teórico	7
2.1. Los telómeros y la telomerasa en el cáncer	7
2.1.1 Características de los telómeros y su papel en el cáncer	7
2.1.2 Características de la telomerasa y su papel en el cáncer	10
2.2 Definición y características del G4 telomérico	11
2.2.1 Detección virtual de ligandos para G4	16
2.3 Importancia de las herramientas computacionales en el descubrimiento de fármacos	17
2.3.1 Acoplamiento molecular	18
2.3.1.1 Definición y características del acoplamiento molecular	18
2.3.1.2 Evaluación de los resultados de acoplamiento	21
2.3.2 Cribado virtual (VS)	21
2.3.3 Puntuación consenso	22
3. Capitulo III. Metodología	23
3.1 Obtención de estructuras cristalográficas	23
3.2 Acoplamiento primario	24
3.2.1 Preparación del receptor	24
3.2.2 Preparación del ligando	24
3.2.3 Acoplamiento	24
3.3 Búsqueda de estabilizadores del G4	25
3.4 Generación de moléculas señuelo	25
3.5 Acoplamiento para las moléculas señuelo	26

3.5.1 Preparación del ligando y receptor	26
3.5.2 Acoplamiento	26
3.6 Re-puntuación.....	26
3.6.1 Preparación del receptor, esferas y caja.....	26
3.6.2 puntuaciones.....	27
3.7 Modelos de cribado virtual	28
3.8 Métricas de enriquecimiento	28
4.Capitulo IV. Resultados y discusión	29
5.Conclusiones y recomendaciones.....	42
5.1 Conclusiones	42
5.2 Recomendaciones	42
REFERENCIAS	43

1. Capítulo I. Introducción

1.1 Antecedentes

Los extremos de los cromosomas de los mamíferos se encuentran cubiertos por estructuras protectoras de ADN y proteínas de unión, conocidas como telómeros (Porru et al., 2017). En las células somáticas adultas los telómeros se componen de secuencias no codificantes de aproximadamente 1000-2000 repeticiones de pares de bases en tándem TTAGGG (Tomita, 2018). Durante cada ciclo de división celular, los telómeros se replican de forma incompleta, lo cual genera que sus extremos se acorten de manera progresiva. Sin embargo, cuando los telómeros alcanzan una longitud muy corta se induce la respuesta de daño al ADN denominada apoptosis y como resultado se inicia la senescencia. Bajo este concepto, se consideran a los telómeros como factor clave para limitar el potencial proliferativo de la mayoría de células normales (Jafri et al., 2016).

En la actualidad son claras las diferentes funciones de los telómeros, como proteger los extremos de los cromosomas, los mecanismos para evitar su fusión entre sí y la forma en que evitan ser reconocidos como sitios de daño en el ADN (Tekchandani et al., 2017). De la misma forma se encuentra claramente establecido cómo el acortamiento de los telómeros se asocia con el envejecimiento, sin representar una consecuencia fatal para la vida, por ser este un proceso natural (Ivancich et al., 2017). No obstante, existe evidencia que indica que en ciertos casos los telómeros son disfuncionales, como resultado de su acortamiento crítico en las células somáticas normales, lo cual provoca una respuesta al daño a nivel de ADN (Creese et al., 2017). Sin embargo, en células anormales no están claros todos los mecanismos que puede usar los telómeros en

respuesta al daño, pero se conoce que las células oncogénicas no entran en un proceso de senescencia y continúan con la división celular, activando o regulando el silenciamiento de la telomerasa (Zorzan et al., 2016).

La telomerasa es una proteína que posee actividad de transcriptasa inversa. Además, forma complejos con otras proteínas y un ARN funcional, el cual es codificado por TERC (gen del ARN de la telomerasa humana), con el fin de formar un amplio conjunto de ribonucleoproteínas que le brinda mayor estabilidad (Asamitsu et al., 2019). La telomerasa en su estado activo, también se encuentra implicada en diferentes mecanismos de reparación de daño del ADN, usando entre sus estrategias el alargamiento alternativo de los cromosomas (ALT), para detener el desgaste del telómero (Ivancich et al., 2017). Una de las hipótesis sobre la telomerasa manifiesta que su actividad generalmente es silenciada en todas las células somáticas, pero usando diferentes estrategias logra activarse en células cancerígenas (Tariman et al., 2017).

En las células tumorales, la telomerasa confiere la inmortalidad celular y también regula la generación de ARNm. Estas características reflejan que la telomerasa está directamente relacionada con la aparición de tumores malignos y su difusión en diferentes órganos (Ivancich, Schrank, Wojdyla, Leviskas, & Kuckovic, 2017) A partir de estos descubrimientos, se ha generado un amplio interés sobre los mecanismos que pueden estabilizar la actividad que se ejerce entre el telómero y la telomerasa, dirigido como un enfoque terapéutico contra el cáncer.

Algunos estudios sugieren que la estabilización del cuarteto G telomérico (G4), puede inhibir directamente la acción de la telomerasa mediante el bloqueo de la

unión de la telomerasa al telómero (Huppert & Balasubramanian, 2017). El ADN telomérico es propenso a formar estructuras secundarias de cuatro cadenas, que se estabilizan por el apilamiento de residuos de guanina en una disposición plana y por la unión entre sí mediante enlaces de puentes de hidrógeno. A esta conformación se la conoce como G4 (Asamitsu et al., 2019). Una gran variedad de estructuras G4 se han dilucidado a nivel atómico, generando una nueva vía para el diseño de ligandos dirigidos hacia la estructura del G4 (Porru et al., 2017).

Aquellos ligandos que presentan una interacción selectiva entre promotor y G4 se caracterizan por regular la expresión génica y el ciclo celular. Estas cualidades indican que pueden ser agentes terapéuticos y de diagnóstico (Q. Li et al., 2013). Muchos de estos ligandos en pruebas *in vivo* reflejan actividad biológica, no solo la inhibición de la telomerasa, sino también la regulación por disminución del oncogén y supresión de células cancerosas. Este tipo de resultados en la actualidad han generado grandes avances a nivel farmacológico (Hochadel et al., 2017).

Uno de los ligandos con mejores resultados de interacción con G4, es la quarfloxina, sus excelentes resultados han permitido que actualmente se encuentre en fase preclínica, además de haber completado la fase II durante el proceso. Se clasificó como agente terapéutico contra varios tumores. Se considera que quarfloxina altera los complejos de G4, los cuales posteriormente se unen a la región promotora del oncogén c- MYC para inhibir su expresión génica y eventualmente inducir a la apoptosis del tumor (Y. Li et al., 2016). Otro caso exitoso es el uso de emicoron, una molécula que interactúa con G4 y cuyas propiedades biológicas han demostrado que esta interacción induce al daño selectivo de ADN en los telómeros de las células cancerosas frente a las células

normales. Esta característica le confiere un efecto antiproliferativo eficaz en varias líneas celulares de tumores (Porru et al., 2017).

1.2 Planteamiento del problema

Los últimos estudios realizados sobre estabilizadores de G4 mencionan que la interacción entre G4 y el ligando ejerce efectos antiproliferativos a través de mecanismos dependientes e independientes de los telómeros. No obstante, hasta el momento encontrar compuestos que estabilicen G4 ha resultado en un gran desafío. La mayoría de estabilizadores no han conseguido ser lo suficientemente estables y específicos hacia la estructura de G4 (Beauvarlet et al., 2019). Este problema se atribuye a que en el proceso construcción de ligandos se toma en cuenta todas las tipologías de G4 como un conjunto, sin considerar que estas son diferentes (paralela, antiparalela e híbrida) y presentan características estructurales específicas. Por lo cual, cuando se aplican los resultados a todas las estructuras no se obtiene especificidad hacia la conformación de G4. Esto afecta directamente las posibles interacciones entre el ligando-compuesto (macromolécula) (Porru et al., 2017).

Aunque se ha informado que un número creciente de moléculas pequeñas posee propiedades estabilizadoras del G4, pocas de ellas han progresado lo suficiente para llegar al proceso final de obtención de fármacos. La principal causa de no culminar todas las etapas preclínicas, se atribuye a la alta dosis que requeriría este posible fármaco frente a otros medicamentos anticancerígenos (Cres et al., 2017). Además, la interacción entre los posibles compuestos comerciales y G4, ocurre de forma poco eficiente. Algunos análisis in vitro han llegado a afirmar que se da una baja afinidad hacia la estructura de G4. El compuesto se une a G4 inicia teniendo alta selectividad pero esta característica se reduce durante el proceso, lo

cual da como resultado una limitación en el efecto farmacológico. Este tipo de falencias en proceso se cree que puede derivar en posibles efectos inesperados durante la fase preclínica (Meier et al., 2018).

A pesar de que existen muchos datos disponibles sobre G4 y sus ligandos, solo un número limitado se ha explorado para la detección virtual o en la detección de nuevas moléculas bioactivas. Aunque en la actualidad se usen múltiples técnicas para el descubrimiento de fármacos asistido por herramientas virtuales, existe una clara falta de comprensión en el mecanismo molecular primario que se encuentra tras la actividad de los aciertos que se consigue empleando estas técnicas (Joy, Vijayakumar, & Sunhye, 2015). Por otra parte, para la validación de los resultados requiere la combinación de distintos métodos o herramientas para superar las falencias que presenta un único protocolo, lo cual puede hacer que proceso se considere más complejo (Monsen & Trent, 2018).

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Desarrollar una metodología de cribado virtual basada en estructura para la identificación de estabilizadores potenciales del cuarteto G

1.3.2 Objetivos específicos

- Generar un conjunto de datos adecuados para la validación de métodos de cribado virtual basados en acoplamiento molecular de estabilizadores del cuarteto G

- Maximizar el enriquecimiento de los compuestos activos combinando funciones de puntuación
- Evaluar el rendimiento de cribado virtual empleando diferentes métricas

1.4 Justificación

Los telómeros y la telomerasa son actores clave en la tumorigénesis. Entre las diversas estrategias propuestas para la inhibición de la telomerasa, los estabilizadores de las estructuras teloméricas de G4 resultan muy prometedoras (Serafim et al., 2014). Además, se ha determinado que los ligandos que estabilizan G4 podrían ejercer un efecto supresor sobre los tumores que utilizan la vía de alargamiento alternativo de los telómeros. En consecuencia, el descubrimiento de nuevos compuestos capaces de actuar sobre los telómeros y/ o inhibir la telomerasa, constituye un área importante en la investigación de la química computacional y en el descubrimiento de posibles fármacos anticancerígenos. Con estas estrategias se puede llevar a cabo la selección de manera eficiente de diferentes compuestos que ejerzan la actividad deseada (Dalyan & Chalikian, 2017).

Mediante la aplicación de herramientas como la química computacional, análisis bioinformáticos o secuenciación de próxima generación (NGS) es posible seleccionar miles de compuestos de bases de datos comerciales, obtener secuencias formadoras de G4 en el telómero humano y analizar posibles ligandos a través de un proceso de priorización (Zorzan et al., 2016). Esto implica que los costos asociados tanto para la síntesis como para la evaluación de actividad se reduzcan significativamente (Porru et al., 2017). El avance constante y las actualizaciones de los programas y plataformas para obtener potenciales fármacos, permiten alcanzar resultados de una forma más rápida. Las

simulaciones que se pueden realizar a los compuestos de interés, permiten replicar situaciones en las que es posible predecir la interacción con medicamentos y estructuras atómicas de diferentes proteínas (Scotti et al., 2018).

2. Capítulo II. Marco teórico

2.1. Los telómeros y la telomerasa en el cáncer

2.1.1 Características de los telómeros y su papel en el cáncer

En los mamíferos los extremos de los cromosomas se encuentran cubiertos por estructuras protectoras de ADN y proteínas de unión. A este complejo se le denomina telómero (Ivancich et al., 2017). Los telómeros son estructuras conformadas de nucleoproteínas situadas en el extremo de cada brazo cromosómico. Cumple como principal función el mantenimiento de la estabilidad del genoma, al garantizar que los extremos naturales de los cromosomas no se confundan con sitios de daño en el ADN (Maciejowski & Lange, 2017). Además de presentar un papel fundamental frente a la señalización del daño del ADN, también evitan su reparación errónea. Esta función de activar la respuesta al daño e inhibir su reparación, podría tener una consecuencia importante en el proceso de envejecimiento celular dependiente de la longitud telomérica y la supresión tumoral (Van Ly et al., 2018).

Los telómeros, se forman por secuencias no codificantes de pares de bases en tándem (TTAGGG) altamente conservadas, las cuales terminan con un saliente de 3' creado por la degradación nucleolítica (Griffin et al., 2019). Este saliente monocatenario 3' se ensambla en una estructura de cromatina de orden superior con capacidad de plegarse sobre sí misma denominado T-loop. Este plegamiento que se forma en la región dúplex del telómero se une con un grupo de seis proteínas especializadas (TRF1, TRF2, POT1, TIN2, RAP1 Y TPP1) (Figura 1). Estas proteínas se encargan de regular la estabilidad telomérica, la homeostasis y reprimir la señalización del daño del ADN, al evitar la activación de las quinasas ATM y ATR (Barrett et al., 2012). Si se da la activación de las quinasas ATM y ATR se induce al detenimiento del ciclo celular, ya que su activación representa que se ha dado la ruptura en algún punto de la doble cadena del ADN. Por lo tanto se inician los mecanismos de reparación del ADN (Cleal, Norris, & Baird, 2018). Múltiples estudios sugieren que T-loop es estabilizado por una agrupación de guaninas que permiten al telómero formar una estructura cuádruple. Además, se plantea que esta interacción desempeña un papel crucial para el bloqueo de la enzima telomerasa (Monsen & Trent, 2018).

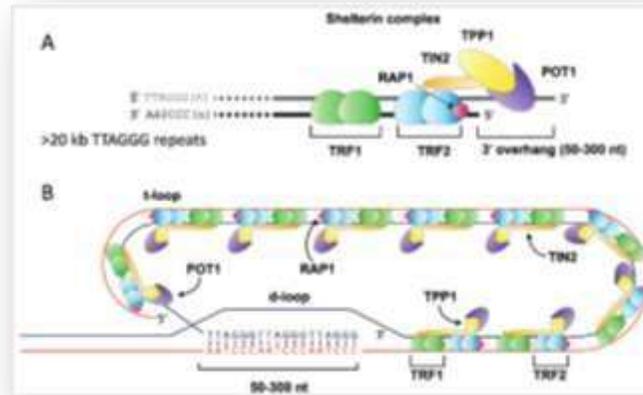


Figura 1. Estructura general del telómero.

Tomado de (Cleal et al., 2018)

Los extremos de los cromosomas (Telómeros) presentan repeticiones (TTAGGG) que finalizan con un saliente 3'

(A) Los componentes proteicos del telómero, se encuentran ensamblados por factores de unión TRF1 y TRF2. Ya que la unión se repite como un homodímero forma un complejo con TIN2, RAP1, TPP1 y POT1

(B). Esta matriz se pliega y forma un Tloop.

Además, como resultado de la poca o nula capacidad de la maquinaria de replicación (ADN polimerasa) para duplicar completamente los extremos del ADN lineal, los telómeros se acortan en ~ 50 pares de bases (bps) durante cada división celular, lo cual equivale a un aproximado de 200 nucleótidos (De Vitis, Berardinelli, & Sgura, 2018). Antes de que los telómeros alcancen una longitud considerada críticamente corta porque comprometa funciones importantes, se detiene el ciclo celular y se activa la senescencia replicativa o apoptosis (Tomita, 2018b). Este tipo de desgaste se puede contrarrestar por la acción de la transcriptasa inversa de la telomerasa, cuya principal función es agregar repeticiones GGTTAG al extremo cromosómico 3'. En un subconjunto de células (madre, germinales y cancerosas)

también se evita el acortamiento de los telómeros activando un mecanismo de mantenimiento (TMM) mediado por la telomerasa y el alargamiento alternativo del telómero (Cleal et al., 2018).

Una característica importante de la tumorigénesis, es que en el cáncer el acortamiento telomérico tiene dos efectos opuestos. Por un lado, tras alcanzar el acortamiento crítico del telómero, se inicia un mecanismo de proliferación inducida al activar las quinasas ATM y ATR sobre los extremos cromosómicos que se encuentren desprotegidos. El siguiente efecto consiste en que, la pérdida de protección de los telómeros trae como consecuencia la inestabilidad genómica, lo cual conduce a la progresión del cáncer (Maciejowski & Lange, 2017). El mecanismo que influye en que la longitud de los telómeros se relacione con un mayor riesgo de cáncer no es del todo claro. Se sabe que si la longitud del telómero es demasiado larga aumenta la vida útil replicativa de la célula, mientras que si la longitud es muy corta aumenta la probabilidad de fusión telomérica. Además, se promueve la progresión del tumor activando la señalización proinflamatoria (Van Ly et al., 2018). La pérdida y ganancia de repeticiones de secuencias en el cromosoma suele ser ocurrir en una fase temprana del desarrollo del cáncer. También se cree que este proceso genera diversidad en los clones premalignos y por tanto, impulsa la transformación del oncogén (Cleal et al., 2018).

2.1.2 Características de la telomerasa y su papel en el cáncer

La telomerasa es un heterodímero de transcriptasa inversa, formada por una subunidad enzimática y subunidad catalítica de molde de ARN no codificante,

para la síntesis de novo de secuencias de ADN no telomérico. Los componentes principales de la telomerasa son la transcriptasa inversa de la telomerasa (TERT) y el componente de ARN de la telomerasa (TERC). El molde de ARN, permite que TERT agregue repeticiones al terminal cromosómico. TERC se caracteriza por expresarse de forma constante, a diferencia de TERT que permanece inactiva en las células somáticas, generando el acortamiento constante en los telómeros (Zheng et al., 2016). La represión de la telomerasa en las células somáticas y el mecanismo de barrera de proliferación de los telómeros, generan una vía supresión que limita el crecimiento de las células tumorales (Maciejowski & Lange, 2017).

Según algunos resultados estadísticos, el 85% de células cancerígenas usan la telomerasa para mantener la longitud del telómero. En tumores que presentan un estado avanzado o metastásico, la actividad de esta ribonucleoproteína se ve incrementada, por lo cual se puede considerar la telomerasa en estado activo como un biomarcador de la enfermedad (Zurek et al., 2016). La telomerasa confiere inmortalidad a las células cancerígenas, adicionando repeticiones en tándem al extremo 3' del telómero, dando como consecuencia un mantenimiento o prolongación sobre la longitud del telómero (Ivancich et al., 2017).

2.2 Definición y características del G4 telomérico

El cáncer es una de las principales causas de mortalidad en la actualidad, y es sin duda una amplia área de estudio a nivel mundial (Tariman et al., 2017). Las terapias para combatir el cáncer son diversas. Algunas se consideran tradicionales como la quimioterapia, mientras otras son más revolucionarias como la inmunoterapia. Sin embargo, estas estrategias para atacar la enfermedad suelen ser muy invasivas para el paciente, ya que se ataca al sistema inmune de forma

indiscriminada (Maciejowski & Lange, 2017). Por este motivo, un tratamiento perfecto sería aquel que se enfoque solo en las células cancerosas, mientras preserva intactas las células normales y sanas. Esto lograría un máximo beneficio terapéutico con una toxicidad mínima (Zorzan et al., 2016).

Bajo este enfoque el ADN se ha convertido en un foco de interés para el desarrollo de agentes anticancerígenos. El descubrimiento de que el ADN puede asumir distintas conformaciones, ha atraído la atención de los científicos. Este hallazgo es considerado como un nuevo blanco terapéutico, pues es posible considerar al ADN como un sitio para probar diferentes protocolos de intervención terapéutica selectiva. Entre estos descubrimientos se ha hecho evidente que el G4 telomérico tiene un alto potencial para cumplir dichos objetivos (Reale et al., 2018). A partir de esto, una de las principales aplicaciones que se le ha dado a G4, ha sido como herramienta molecular ya que tiene la facilidad de unirse a diversos objetivos, confiriéndole la capacidad de estar en interior de diferentes aptámeros y por ende ser usado como agente terapéutico o de diagnóstico para el cáncer (Kwok & Merrick, 2017).

Las estructuras de ácido nucleico helicoidal de cuatro cadenas ricas en guanina reciben el nombre de G- cuádruplex o G4 (Song et al., 2016). Esta estructura es definida como una forma alternativa de ADN o ARN compuesta por varias capas planas de guaninas denominadas tétradas, se forman por lo general por secuencias de tipo 5'-G3+N1-7G3+N1-7G3+N1-7G3+-3', donde N puede representar cualquier base nitrogenada (purinas y pirimidinas). El G4 se forma al ensamblarse las tétradas de guanina, de forma apilada hasta adaptar un bucle con interacciones que se consideren energéticamente favorables (Figura 2 A) (Harkness & Mittermaier, 2017). Estas se unen por enlaces de hidrogeno de tipo Hoogsteen, en donde cada tétrada rota aproximadamente 90° respecto a la

adyacente. Este tipo de rotación es la que confiere la característica helicoidal al G4 (Porru et al., 2017). Para conseguir un buen ensamblaje es necesaria la presencia de cationes, con el fin de que se unan entre cada par de tétradas, coordinadas por los grupos carbonilo. Los cationes que por lo general desempeñan esta función son sodio, potasio, calcio y plomo, siendo los dos primeros los más relevantes por presentarse en altas concentraciones en la célula en comparación con los demás (Figura 2 B). La presencia de los cationes suele ser coordinada por las secuencias que conforman el bucle que brinda la estructura a G4 (Song et al., 2016).

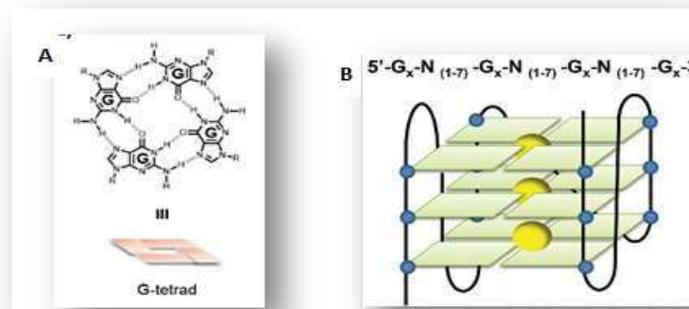


Figura 2. Estructura básica del G4 telomérico humado de ADN

Adaptado de (S. Chen et al., 2015).

(A).Tétrada de G4, con una guanina en cada extremo, unidas por enlaces de hidrogeno de tipo Hoogsteen.

Adaptado de (Song et al., 2016).

(B). La estructura de G4 se apila y los cationes (color amarillo) permiten que la unión entre las guaninas (color azul) se ensamblen. Además las secuencias que se dan entre la estructura forman un bucle que conecta cada tétrada. Estas estructuras pueden adquirir diferentes conformaciones.

Las topologías plegables de G4 son diversas, principalmente porque existen diferentes factores que influyen en esto. Algunos factores son la molecularidad del complejo G4, el número de capas que presenta cada tétrada, la orientación de los bucles intermedios y los cationes que ejercen la función de coordinación (Ngo et al., 2019). Estas, pueden adquirir una topología en una misma dirección o dirección opuesta, es decir, pueden ser de forma paralela o antiparalela (conformación tipo silla), mientras que si se encuentra en una misma topología las formas paralelas y antiparalelas son conocidas como híbridos (Figura 3). Los bucles que conectan cada tétrada en la topología paralela son de doble cadena conformados por pocos nucleótidos, mientras que en las formas antiparalela e híbrida su longitud se extiende con un mayor número de nucleótidos. Las causas para determinar por qué se adquiere algún tipo de tipología no son claras actualmente, pero se conoce que la longitud y composición del bucle influyen el tipo de configuración que se adopta (Harkness & Mittermaier, 2017).

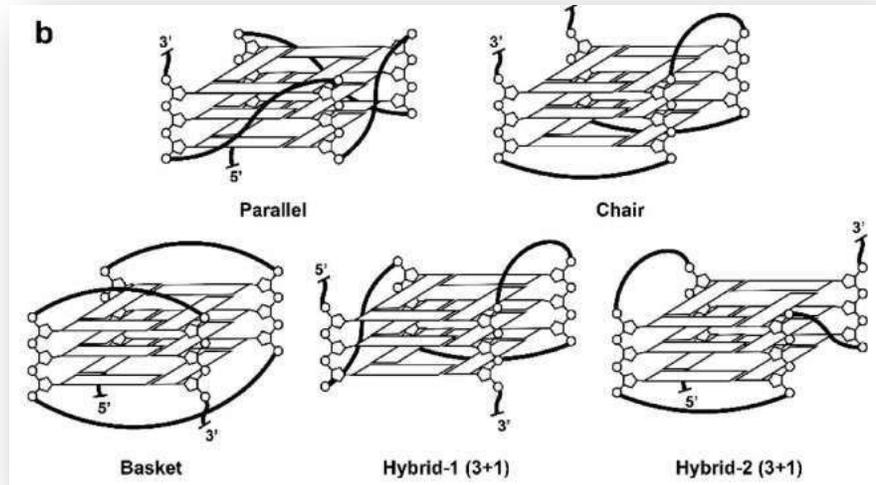


Figura 3. Estructuras intramoleculares de G4 telomérico de tipo paralela, antiparalela e híbrida respectivamente.

Tomado de (Asamitsu, Obata, Yu, Bando, & Sugiyama, 2019)

La caracterización de varios estabilizadores del G4, han reflejado dos características estructurales en común: un conjugado ligando-estructura y una carga neta catiónica. La conjugación en el estabilizador desempeña la función de facilitar la interacción con las capas de G4 y la carga catiónica ayuda a brindar una mayor unión del estabilizador mediante la interacción electrostática que se da principalmente entre las cadenas fosfodiéster de carga negativa. No obstante, la carga catiónica del estabilizador es la causa principal de una baja selectividad por el G4 (Ps & Manderville, 2019).

Hasta el momento se sabe que G4 se encuentra en todo el genoma y el ARNm. Se han identificado como potenciales formadores de G4 los promotores, los telómeros, orígenes de replicación, regiones de ARNm no traducidas (UTR), regiones de empalme pre-ARNm, ARN de tipo telomérico y viral (Mergny & Sen, 2019). Por otra parte, este tipo de estructuras se han visto implicadas en la regulación de la expresión génica, traducción de las proteínas y proteólisis. La actividad de estas estructuras indica que tienen funciones biológicas en la actividad de promotores, inestabilidad del genoma y alteraciones epigenéticas. Estas características han influenciado a que el ADN de G4 se estudie bajo diferentes enfoques y los resultados obtenidos han aumentado su relevancia en áreas como la biotecnología, biofísica y biomedicina (Koeppel, 2015).

El efecto de G4 en el telómero ha demostrado que puede bloquear la actividad de la telomerasa. Además, cuando esta conformación interactúa con moléculas pequeñas o estabilizadores tiene un efecto como terapia antitumoral (Song et al., 2016). El desarrollo de moléculas pequeñas se ha basado en compuestos aromáticos planos policíclicos que posean al menos un sustituyente que termine en un grupo catiónico, por lo general se requieren dos sustituyentes de este tipo.

La razón de esta peculiaridad es que estos se apilan entre los G4 y brinda mayor estabilidad (Griffin, 2019).

2.2.1 Detección virtual de ligandos para G4

Hasta el momento existen más de 1.000 ligandos caracterizados, que ejercen efecto estabilizados sobre G4. Su descubrimiento ha partido de herramientas computacionales como cribado virtual (VS) y cribado tradicional de alto rendimiento (HTS) (Kwok & Merrick, 2017). Estos ligandos se pueden dividir en dos clases químicas: compuestos heteroaromáticos planos y ligandos cíclicos o alicíclicos. Algunas de estas moléculas han sido cristalizadas con G4 y han sido usados para generar nuevos modelos de investigación (Neidle, 2015). Los métodos computacionales para encontrar nuevos estabilizadores son varios. Entre los más usados está el farmacóforo, un modelado basado en características específicas para garantizar las interacciones con un objetivo biológico definido y desencadenar su respuesta biológica. En conclusión este método se basa en unión del ligando a su objetivo (Chen et al., 2015). Otra estrategia consiste en modelamiento basado en formas. Se base en la estructura o geometría del compuesto para que este sea complementario al estar activo. Cuando la estructura de la molécula esta activa sirve como plantilla o molde para la generación de un modelo de forma. Para obtener mejores resultados usando esta estrategia se sugiere que se adicione información química (Kirchmair et al., 2017). La característica común de estas dos estrategias es que filtran una gran cantidad de compuestos de bases de datos, pues es uno de los requisitos de ambos modelos. Por otra parte, las estrategias de acoplamiento o *docking* requieren específicamente datos estructurales del target. La eficiencia del método se estima mediante el cálculo de energía libre (Castillo et al., 2015). La combinación de múltiples métodos mejora el enriquecimiento de las moléculas activas en los

resultados virtuales, además, ayuda a solucionar el problema de selectividad que suelen tener este tipo interacciones (Kirchmair et al., 2017).

2.3 Importancia de las herramientas computaciones en el descubrimiento de fármacos

El descubrimiento de nuevos medicamentos es un proceso que implica una alta inversión tanto a nivel de costos como de tiempo. Se estima que se requiere un capital aproximada de 800 a 1.800 millones de dólares (Joy et al., 2015). Los avances que se han efectuado en la química combinatoria han permitido un aumento en el número de bases de datos que contienen compuestos de alto interés. Lo cual ha generado un crecimiento significativo en el descubrimiento de fármacos. En la actualidad, una tendencia progresiva en la industria farmacéutica, es el uso de herramientas computacionales para acelerar el proceso de desarrollo en la etapa preliminar y reducir costos, además de minimizar la probabilidad de error en la etapa final del proceso (Liu, Shi, Zhou, Liu, & Liu, 2018). El diseño de medicamentos asistidos por computadora, proporciona un nuevo conocimiento sobre el patrón de interacción entre la proteína y su(s) ligandos, además de la afinidad de unión (Merbl et al., 2017).

La optimización en el diseño de ligandos en base a la correlación que se da entre la estructura y el mecanismo de acción, es una necesidad para el desarrollo de fármacos. Por ello, desarrollar métodos reproducibles, de alta eficiencia y económicos es una necesidad palpable (Castillo et al., 2015). Bajo este enfoque la quimioinformática al usar estrategias que priorizan e identifican un sin número de compuestos, con la capacidad de estabilizar estructuras G4 para pruebas experimentales aumenta la probabilidad de éxito de los ensayos. Por lo general se

sigue una dinámica similar a la observada en la figura 4 al usar herramientas computacionales (Crees et al., 2017).

2.3.1 Acoplamiento molecular

2.3.1.1 Definición y características del acoplamiento molecular

El acoplamiento molecular surge tras las necesidades de la biología molecular y el desarrollo de fármacos asistidos por computadora basados en estructura, por encontrar respuestas a diferentes hipótesis. El acoplamiento molecular se basa en comprender y pronosticar el reconocimiento molecular de estructuras, encontrando o prediciendo posibilidades de unión y su afinidad. Por lo general se lleva a cabo entre una molécula pequeña y una macromolécula u objetivo (Figura 4) (Rocca et al., 2016). Existen diferentes métodos de modelamiento. Los métodos basados en estructuras, utilizan la forma tridimensional del objetivo (enzima o receptor) para la generación de posibles ligandos. Por otra parte, los métodos basados en ligando consisten en someter un amplio número de moléculas con diferentes estructuras a modelos predictivos de tipo teóricos (Kontoyianni, 2017).

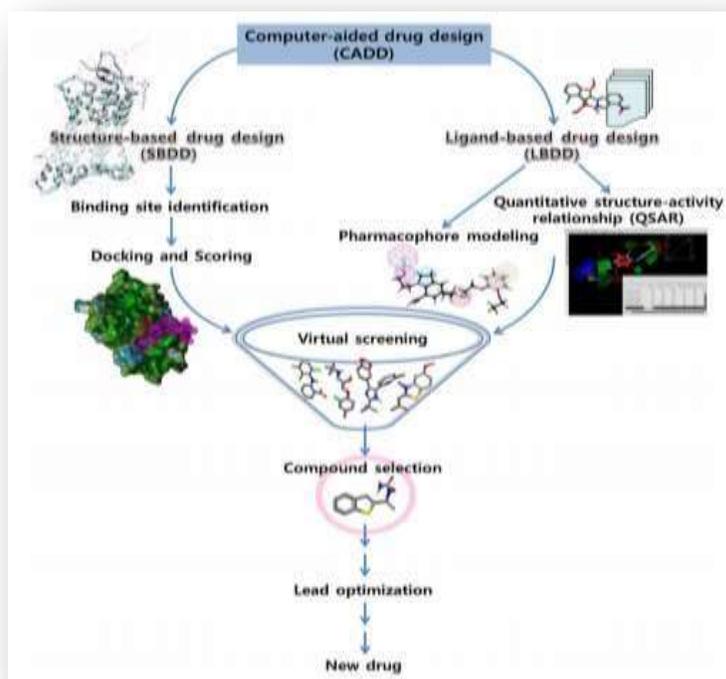


Figura 4. Esquema de trabajo de herramientas computacionales.

Tomado de (Lu et al ., 2017)

Por lo general en el diseño de fármacos asistido por computadora, se pueden seguir dos caminos. Diseño de fármacos basado en la estructura o basado en ligando. Si se aplica la primera opción se debe realizar el acoplamiento y puntuación, mientras que si hace el diseño en base al ligando se realiza el modelado por la estrategia de farmacóforo o en base a la relación cualitativa de estructura- actividad. Sin importar el método se debe hacer la detección virtual, elegir el mejor compuesto para su optimización y finalmente obtener el nuevo fármaco.

Todos los protocolos cumplen con algunas características claves, como el hallar el mejor modo de unión entre el ligando al objetivo de interés que son definidos en base a la unión de su posición, orientación, flexibilidad del ligando y enlaces rotativos (Lohning et al., 2017). Estas variables describen un grado de libertad de

búsqueda multidimensional, mientras que los límites describen el alcance de la búsqueda. Este punto es fundamental para dar una conformación correcta al ligando, pues de no darse las probabilidades de encontrar su forma complementaria se reducen. En el acoplamiento molecular se suele aplicar el mismo flujo de trabajo (figura 5) (Schleinkofer et al., 2006).

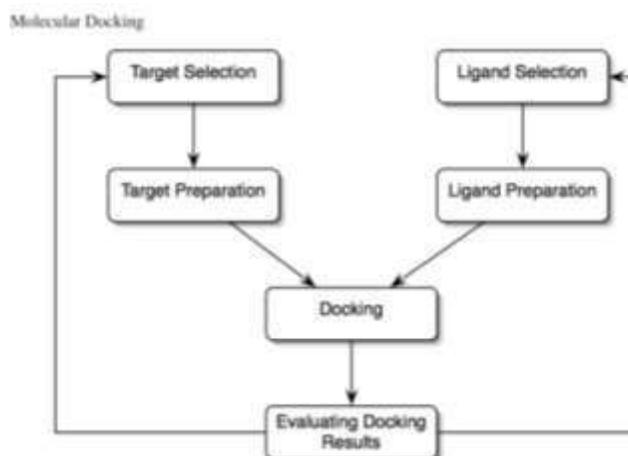


Figura 5. Diagrama de flujo usado en acoplamiento molecular.

Tomado de (Schleinkofer et al., 2006)

las estructuras tanto del ligando como del receptor (objetivo) deben ser elegidos y luego cada una de estas estructuras se preparan según los requerimientos del método de acoplamiento seleccionado, tras realizarse el acoplamiento se efectúa el análisis de los resultados y se seleccionan los que presenten una mejor puntuación.

Hasta el momento existen diferentes softwares que cumplen estos objetivos, pero se recomienda que también se realice VS para tener una hipótesis de como interactúa el ligando con su objetivo de forma tridimensional y de este modo poder clasificar los candidatos y variables (Morris & Lim-wilby, 2015).

2.3.1.2 Evaluación de los resultados de acoplamiento

Los resultados de acoplamiento deben ser analizados contemplando la complementariedad entre el ligando y el receptor. Es decir, se debe considerar parámetros como: interacciones entre el ligando y las cargas, hidrofobicidad en el receptor y ligando, y la capacidad de reproducir la unión entre el ligando-receptor (Chen et al., 2015).

Por otra parte, si la estrategia de acoplamiento usa métodos estocásticos y no sistemáticos, se recomienda realizar su ejecución variando las condiciones iniciales. Además, se debe tomar en cuenta la similitud en la forma de unión predicha, la cual puede ser calculada usando la desviación cuadrática media de las posiciones atómicas (Schleinkofer et al., 2006). Si se obtiene agrupaciones entre acoplamientos es una muestra de que los parámetros fueron suficientes para la convergencia. Mientras que si no se da agrupamiento se deben realizar repeticiones aumentando el número de interacciones (Rocca et al., 2016). Los distintos métodos de acoplamiento suelen basarse en el modo de enlace con la energía de interacción más bajo para el ligando, lo cual indica si existe o no unión por parte del ligando. La mejor estrategia parte de combinar la energía de unión para todas las conformaciones y el número total de agrupaciones encontradas. Se concluye que entre más débil sea la energía media, es menos probable que exista unión o interacción por parte del ligando (Morris & Lim-wilby, 2015).

2.3.2 Cribado virtual (VS)

La detección virtual se ha convertido en uno de los métodos más relevantes en la actualidad. El VS basado en acoplamiento es una técnica computación que implica diversas herramientas disponibles, tanto de acceso gratuito como pagado. Se ha

demostrado que su aplicación proporciona puntos de partida diversos para el descubrimiento de fármacos. Las simulaciones realizadas con esta estrategia ayudan a detectar moléculas con actividad biológica (Lu et al., 2017).

Esta es una herramienta que intenta encontrar combinaciones en las primeras etapas del descubrimiento de fármacos. Luego de seleccionar un objetivo molecular, la meta final es encontrar aspirantes con interés clínico. Vs es considerado un método HTS in-silico, en el cual se usa el acoplamiento virtual de un gran número de compuestos sobre un objetivo biológico, seguido por una evaluación en base a la puntuación de los candidatos. Esta estrategia reduce la cantidad de compuestos a probarse en la fase inicial del desarrollo de medicamentos. Los requisitos básicos para usar Vs son: tener un alto número de compuestos, en base al objetivo de la investigación, conocer la estructura biológica del target y un esquema apropiado de acoplamiento. En cada caso pueden variar algunos de los puntos, según el tipo de investigación realizada (Kontoyianni, 2017).

2.3.3 Puntuación consenso

Esta función es una parte fundamental de la detección virtual. Algunos de los métodos de puntuación se basan en la información estructural de la proteína y el ligando que han sido determinados previamente, sin embargo no es una información que este siempre disponible (Serafim, 2014). Por lo cual, la puntuación aplicada a estrategias de acoplamiento se basa en cálculos de campo de fuerza, funciones de puntuación empírica o fuerza media (Perez et al., 2019). Cualquier método de puntuación debe cumplir dos fines: mientras se ejecute el acoplamiento su función es detectar el límite de conformaciones, una vez terminado el acoplamiento debe estimar la afinidad de unión entre las moléculas.

No obstante, la dificultad implícita para la comprensión de los procesos físicos que se dan durante la unión del receptor al ligando no permite que este método sean considerado altamente preciso (Schleinkofer et al., 2006).

La puntuación consenso, por otra parte, combina diferentes estrategias de puntuación abarcando soluciones a las problemáticas que presenta cada de una de forma individual. Tras el acoplamiento se reevalúa los resultados usando múltiples funciones de puntuación. Los compuestos situados en la parte superior tras cada función de puntuación indican que son candidatos para el siguiente paso, es decir, los bioensayos (Monsen & Trent, 2018).

3. Capítulo III. Metodología

A continuación se detalla la metodología empleada para el cumplimiento de los objetivos planteados.

3.1 Obtención de estructuras cristalográficas

Se realizó una búsqueda bibliográfica exhaustiva de artículos donde se reportaran diferentes estructuras cristalográficas del G4 de tipo paralela, antiparalela e híbrida. También se buscó la estructura interactuando con otros compuestos. Los resultados considerados como más favorables se descargaron del banco de datos de proteínas RCSB PDB en formato PDB (Berman, 2000).

3.2 Acoplamiento primario

3.2.1 Preparación del receptor

A partir de la estructura cristalográfica del G4 telomérico en conformación paralela con la molécula de acridina 3, 6,9 –trisustituida BRACO19 (3CE5) se realizó la preparación del receptor. Para ello, se usó de los paquetes de OEDocking el Software MakeReceptor (OEDOCKING 3.3.1.2: Software científico OpenEye, Santa Fe, NM. <http://www.eyesopen.com>). En el proceso de preparación se eliminaron las moléculas de agua y el ligando. Además se agregaron átomos de hidrogeno y cargas.

3.2.2 Preparación del ligando

Para generar las conformaciones 3D se empleó el software OMEGA. Se aprovecharon las herramientas MakeFraglib para la generación de fragmentos, Omega 2 para construcción 3D de los fragmentos guardando un total de 200 conformaciones (OMEGA 3.1.1.2: OpenEye Scientific Software, Santa Fe, NM. <http://www.eyesopen.com>). Mientras que con el Software Quacpac se aplicó molcharge para adicionaron las cargas a las estructuras 3D (QUACPAC 2.0.1.2: OpenEye Scientific Software, Santa Fe, NM. <http://www.eyesopen.com>).

3.2.3 Acoplamiento

Luego de obtenerse el ligando con un máximo de 200 conformaciones 3D mas las cargas y haber preparado el receptor, se realizó el acoplamiento con el software

FRED (OEDOCKING 3.3.1.2: Software científico OpenEye, Santa Fe, NM. <http://www.eyesopen.com>). Se puntuaron con Chemgauss4 500 moléculas para evaluar la calidad de las poses. Se guardaron aquellas con la puntuación más baja para cada conformación de ligando, dando un máximo de 20 poses.

3.3 Búsqueda de estabilizadores del G4

Se usó la base de datos G4LDB (Q. Li et al., 2013) y se buscaron compuestos en base a la estabilidad de FRET mayor a 10 grados y menor a 10 grados. De la información que se recopiló se filtró considerando las siguientes características:

1. La secuencia del telómero humano
2. Concentraciones experimentales de los compuestos máxima de 20 μM

3.4 Generación de moléculas señuelo

Se usó la herramienta *A Database of useful Decoys: Enhanced* (DUD-E) (Mysinger et al., 2012). En la herramienta se ingresó el código SMILES y luego de una hora se obtuvieron los resultados. Del archivo recibido se extrajo las líneas que contenían los ligandos y se agrupó en un solo documento. A los señuelos fueron separados en grupos de cien y se dejó solo con su código SMILES y su código de identificación.

3.5 Acoplamiento para las moléculas señuelo

3.5.1 Preparación del ligando y receptor

Para la preparación del ligando se usó una metodología similar a la aplicada en el punto 3.2.2 usando los códigos SMILES de cada molécula señuelo y de los ligandos. La única diferencia que se efectuó tras generar los fragmentos, fue que inicialmente se crearon 200 conformaciones y en un siguiente resultado se corrió el mismo programa, pero generando una única conformación. La adición de cargas solo se efectuó sobre los resultados que generaron una única conformación. De igual modo se mantuvo el receptor preparado en el punto 3.2.1.

3.5.2 Acoplamiento

Se usó el software FRED (OEDOCKING 3.3.1.2: Software científico OpenEye, Santa Fe, NM. <http://www.eyesopen.com>). Partiendo de las 200 conformaciones generadas en el punto 3.5.1. Únicamente se guardó una pose. También se efectuó el acoplamiento usando una alta resolución. A los resultados obtenidos se le adicionaron cargas usando del Software Quacpac molcharge (QUACPAC 2.0.1.2: OpenEye Scientific Software, Santa Fe, NM. <http://www.eyesopen.com>).

3.6 Re-puntuación

3.6.1 Preparación del receptor, esferas y caja

Se usó el software Dock 6.9 (Lang et al., 2009) y se mantuvieron los parámetros pre-establecidos por el programa para la obtención del receptor, las esferas y la caja.

3.6.2 puntuaciones

Para realizar la puntuación se usaron las herramientas de DOCK 6.8, OEDOCKING y GOLD. Los parámetros de cada programa se mantuvieron en sus valores por defecto. Además, se calcularon quince funciones de puntuación (tabla 1) para las poses obtenidas durante el acoplamiento molecular.

Tabla 1.

Funciones de puntuación.

Docking Program	Scoring Function
Dock 6.8	Grid
	Contact
	Continuous
	Hawkins
	PBSA
Gold	SASA
	PLP
	GoldScore
	ChemScore
OEdocking	ASP
	Shapegauss
	ChemScore
	ChemGauss 3
	ChemGauss 4
	PLP

Tomado de (Perez-castillo et al., 2019)

3.7 Modelos de cribado virtual

Los modelos de cribado virtual se basaron en la metodología CompScore (Perezcastillo et al., 2019). Los valores de los componentes de las funciones de puntuación energética fueron resumidos en una tabla empleando los códigos disponibles con CompScore.

A continuación se separaron los ligandos de las moléculas señuelo. Se tomó el 80% de cada grupo y se formó un archivo para el entrenamiento de los modelos. El 20% restante de los datos se reservó para la validación del modelo obtenido. Durante el entrenamiento de los modelos se mantuvieron los parámetros preestablecidos para el método CompScore.

3.8 Métricas de enriquecimiento

El rendimiento del modelo se evaluó usando varias métricas: área bajo la curva acumulativa (AUAC), Factor de enriquecimiento (EF) y discriminación de ROC mejorada por Boltzmann (BEDROC) (Truchon et al., 2007). El área bajo la curva acumulativa AUAC sigue la siguiente ecuación:

$$AUAC = 1 - \frac{1}{nN} \sum_{i=1}^n x_i \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde:

N es el número total de compuestos, n la cantidad de compuestos activos

x_i el ranking relativo del compuesto i

La métrica EF calcula el número de veces que se enriquece una fracción con compuestos activos en relación con lo que se espera de una distribución uniforme de activos (Perez-castillo, Morales, & Cordeiro, 2017). La ecuación viene dada por:

$$EF = \frac{\sum_{i=1}^n \delta_i}{xN} \quad \text{cuando } \delta_i = \begin{cases} 1, & r_i \leq xN \\ 0, & r_i > xN \end{cases} \quad (\text{Ecuación 2})$$

r_i es la clasificación relativa de $X_i = r_i/N$ en toda la lista clasificada

x es la fracción de la lista ordenada ponderada entre 0 a 1

Para calcular EF se consideró el 1% del total de moléculas

Para el cálculo de BEDROC se consideró un valor de $\alpha=160,9$. Se usó la siguiente ecuación:

$$BEDROC = \frac{RIE - RIE_{min}}{RIE_{max} - RIE_{min}} \quad (\text{Ecuación 3})$$

$$RIE = \frac{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n e^{\alpha x_i}}{\frac{1}{N} \left(\frac{1 - e^{\alpha}}{\alpha} \right)} \quad (\text{Ecuación 4})$$

$$RIE_{min} = \frac{1 - e^{\alpha R \alpha}}{R \alpha (1 - e^{\alpha})} \quad (\text{Ecuación 5})$$

$$RIE_{max} = \frac{1 - e^{-\alpha R \alpha}}{R \alpha (1 - e^{-\alpha})} \quad (\text{Ecuación 6})$$

R es el número de moléculas activas

4. Capítulo IV. Resultados y discusión

Tras una revisión precisa se encontraron las estructuras cristalográficas de tipo paralela (1kfl), antiparalela (143d) e híbrida (2gku) del banco de datos de proteínas RCSB PDB. Además, se eligió trabajar con la molécula BRACO-19 que se aloja entre la interfaz de dos cuádruplex unidos en paralelo y retenidos en el sitio por redes de moléculas de agua (Campbell et al., 2008). Esta estructura también se encontró en el banco de proteínas con el código 3CE5 (figura 6).

BRACO-19 ha sido usada ampliamente en los últimos años, pues los resultados han mostrado que es un ligando muy efectivo y específico para G4 telomérico. Se ha llegado a afirmar que el uso de esta molécula ayuda a la supresión de la proliferación tumoral y a reducir la actividad de la telomerasa (Zho et al., 2016).

De la base de datos G4LDB se obtuvo un total de 291 estabilizadores iniciales con una actividad de FRET mayor a 10 grados, mientras que se obtuvieron 19 ligandos con actividad menor a 10 grados. De los otros filtros aplicados quedaron un total de 109 estructuras con actividad de FRET mayor a 10 grados, los 19 ligandos con actividad menor a 10 grados se consideraron inactivos.

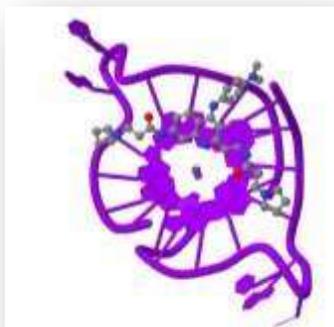


Figura 6. Vista 3D de G4 telomérico paralelo (color morado) con BRACO-19 y dos iones de potasio.

Tomado de (Berman, 2000)

Múltiples autores citan entre sus investigaciones el uso de esta base de datos y sus filtros, dado que esta técnica ayuda a obtener moléculas con mejor capacidad de unión y selectividad para G4 (Mendoza et al., 2016).

Se obtuvo un total de 3728 moléculas de las cuales 3620 eran señuelos y las demás ligandos, debido a que existían 3 pares de duplicados y 2 compuestos organometálicos. Se generaron 37 carpetas de señuelos y una de ligandos, además se agregó las moléculas que tenían actividad de FRET menor a diez grados. Normalmente se esperaría tener un mayor número de compuestos, sin embargo, en este caso algunos de los ligandos eran muy similares entre si y por lo tanto comparten señuelos (Serafim, 2014).

Los receptores, ligandos y señuelos para los cálculos de acoplamiento siguieron la metodología descrita anteriormente. A partir de los resultados para cada grupo tanto de señuelos como de ligandos se sometieron a diferentes estrategias de acoplamiento y puntuación. El usar el algoritmo de CompScore proporciona un valor de enriquecimiento máximo, ya que combina 15 funciones de puntuación lo cual se considera una búsqueda exhaustiva (Perez-castillo et al., 2019).

Los resultados que se obtienen al usar el algoritmo CompScore en comparación con otras funciones de puntuación y sus componentes de puntuación resulta ser superior. El algoritmo genético (GA) ha proporcionado un aumento máximo de enriquecimiento de los resultados, de hasta un 45%. Los datos usados para entrenamiento, que corresponden al 80% de ligandos y 80% de señuelos. Reflejaron métricas más altas usando la metodología CompScore. Se obtuvo un valor de EF de 52,02. Entre las 15 funciones individuales de puntuación, el programa Gold con la función PLP presento el valor más alto de EF = 20,43. Por otra parte entre los componentes de puntuación, el programa CompScore sugiere 15 componentes de puntuación entre las funciones incluidas en el modelo. De estos, se obtuvo un valor de EF= 18,58 para el componente OEPIPNonPola. Evidentemente estos valores resultan inferiores si se comparan con el algoritmo CompScore (figura 7).

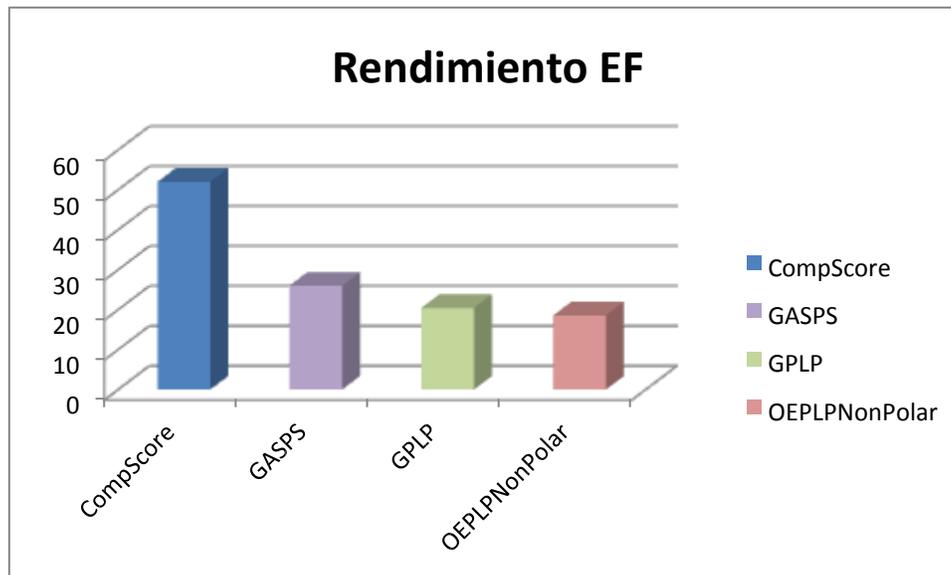


Figura 7. Mejores resultados obtenidos para EF evaluando el 1% de los datos.

Evidentemente el mejor resultado se da usando el algoritmo CompsCore. Seguido del valor de GASPS el cual es reconocido por el algoritmo como la mejor puntuación individual en el 1% de los datos. El resultado de la mejor función puntuación y el mejor componente sugerido por el algoritmo se encuentran a continuación con resultados no muy altos en comparación con el resultado de CompScore.

Está claro que el algoritmo efectivamente combinó los componentes de puntuación para maximizar la métrica de enriquecimiento. Por otra parte, los datos de entrenamiento también maximizan el enriquecimiento de los activos usando BEDROC con un valor de $\alpha=160.9$. En este caso CompScore superó significativamente a las funciones y componentes de puntuación arrojando un valor de BEDROC= 0,875. Siendo este valor más del doble del valor más alto obtenido entre los 15 componentes de puntuación comparados, cuyo valor fue de BEDROC= 0,410. Aunque la función GPLP y los componentes GASPS y OEPLNonpolar presenta valores altos en comparación a las demás (tabla 2). No es relevante si se compara con los resultados de CompScore (figura 8).

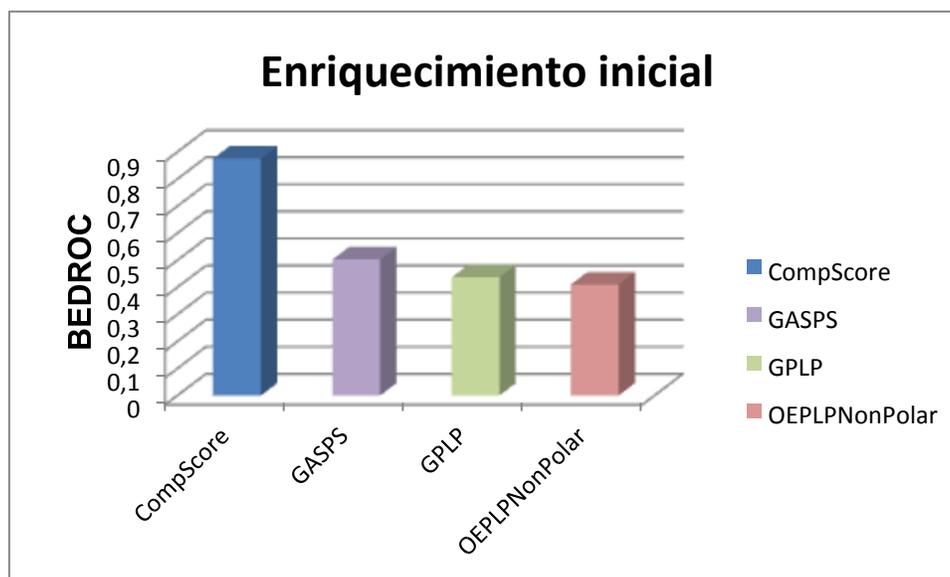


Figura 8. Resultado de la métrica BEDROC.

CompScore es claramente el mejor resultado. Mientras los otros componentes y funciones presentan valores similares entre sí, pero poco relevantes comparados con el resultado de CompScore.

La similitud entre los resultados, que presentan las funciones y componentes de puntuación, sugiere que el componente GASPS puede lograr un rendimiento similar a la mejor función de puntuación completa GPLP. Este tipo de resultados es explicado por la metodología de CompScore. Según su hipótesis los componentes de las funciones de puntuación son de suma importancia e incluso pueden ser más relevantes que las funciones de puntuación completas.

Tabla 2.

Resultados obtenidos de los componentes de las funciones individuales de puntuación sugeridas por el algoritmo.

Para los 15 componentes se presenta el resultado obtenido de AUAC, EF y BEDROC. Además, se incluyen los mismos resultados para el mejor componente según el modelo (GASPS).

Componentes	AUAC	EF	BEDROC
D6HawkinsGB	0,583	0	1,165E-05

D6PbsaPB	0,529	7,432	1,17E-01
D6PbsaSA	0,754	7,432	0,147
D6SASAComOther	0,549	7,432	0,084
D6SASAOther	0,563	7,432	0,091
D6SASAPercOtherExpo	0,549	7,432	0,084
D6SASAPhilic	0,691	1,858	0,042
GASPASP	0,466	0	0,004
GCSLipo	0,462	0	5,205E-07
GPLPDEClash	0,634	1,858	0,042
GPLPDETors	0,734	0	0,017
OECCG3Don	0,427	1,858	0,040
OECCG4ProDesolv	0,503	0	1,135E-06
OEPLPNonPolar	0,850	18,580	0,410
OEShapegauss	0,811	14,864	0,314
GASPS	0,832	26,013	0,502
PROMEDIO	0,621	6,387	0,118

Para las métricas EF y BEDROC el programa Gold presentó los componentes de puntuación con valores más altos pero también contiene el componente con menores valores, tanto para EF (0) como para BEDROC (0,004). Por lo tanto no se considera a los componentes y funciones de puntuación de forma individual como estrategias significativas frente a la metodología de CompScore (tabla 3).

Tabla 3.

Resultados de las 15 funciones de puntuación analizadas por el algoritmo CompScore.

Se presenta los resultados de AUAC, EF y BEDROC

Funciones	AUAC	EF	BEDROC
DContact	0,744	14,864	0,315

DContinuous	0,512	0	0,005
DGrid	0,498	0	0,0006
DHawkins	0,516	1,858	0,024
DPBSA	0,513	0	0,004
DSASA	0,316	0	0,0001
GASP	0,546	1,858	0,034
GChemScore	0,665	11,148	0,235
GGoldScore	0,581	1,858	0,021
GPLP	0,821	20,438	0,436
OEChemGauss 3	0,825	9,290	0,166
OEChemGauss 4	0,772	11,148	0,171
OEChemScore	0,616	5,574	0,100
OEPLP	0,817	14,864	0,332
OEShapegauss	0,811	14,864	0,314
Promedio	0,637	7,184	0,144

Los resultados del AUAC no fueron tan altos en los componentes de puntuación analizados (tabla 2) ni en las funciones de puntuación evaluadas (tabla 3). Sin embargo los valores de GASPS 0,823 GPLP 0,821 y OEPLPNonPolar 0,850 si presentaron resultados significativos, muy cercanos al resultado obtenido por la metodología del GA que presento un valor de 0,937 (figura 9).

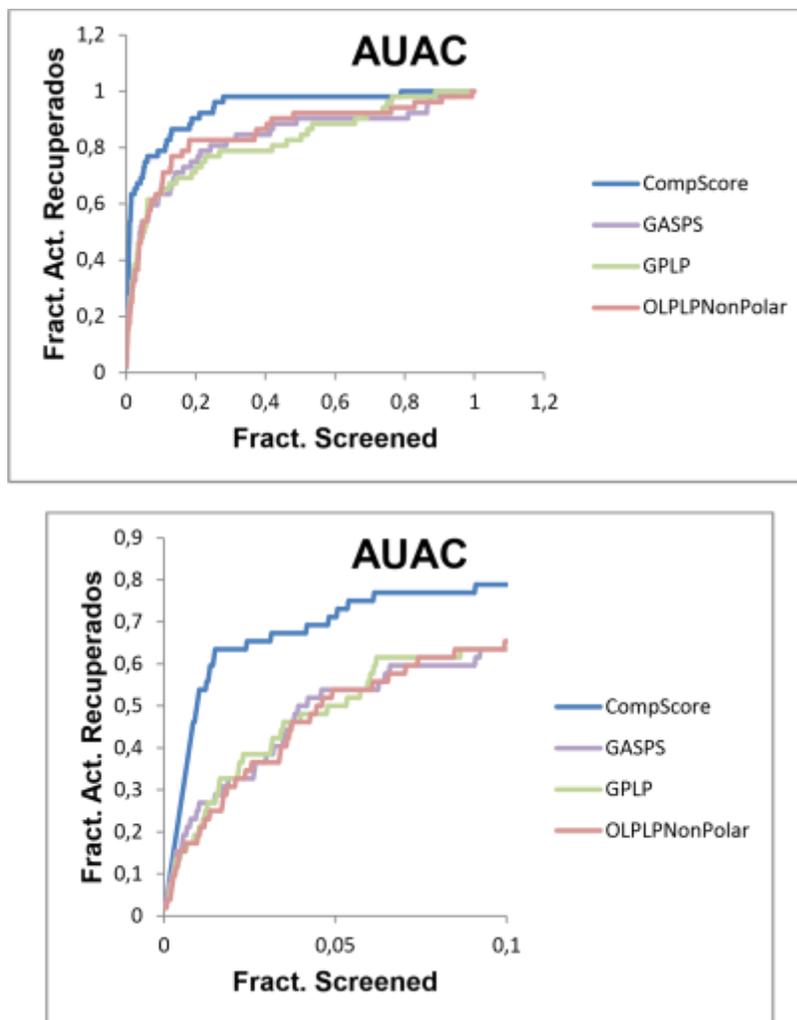


Figura 9. Curvas completas AUAC de la metodología CompScore, de las funciones y componentes de puntuación.

A. Los resultados no presentan grandes diferencias entre sí, pero evidentemente al emplear la metodología CompScore si se obtiene un resultado mejor.

B. curvas para el 10% de los datos

La validación externa se realizó siguiendo la metodología antes descrita con el 20% de ligandos y 20% de señuelos. De los resultados obtenidos anteriormente del algoritmo CompScore se efectuó la recalificación de los datos externos y se midió el enriquecimiento sobre los datos restaurados. Es por tal motivo que

únicamente se analizaron las 15 funciones completas de puntuación y el algoritmo CompScore.

Para los datos de validación la metodología de CompScore presento un resultado para la métrica EF= 40,44 un valor muy alto en comparación con el mejor de los resultados de las funciones de puntuación completa GPL que obtuvo un valor EF= 20,22 (figura 10). Considerando que este mismo valor se obtuvo con la función completa GASP, se podría creer que ambas funciones de forma individual presentan un buen enriquecimiento. Sin embargo el resultado para la métrica de BEDROC y el AUAC es inferior (tabla 4). El único fenómeno que se podría considerar relevante es que la función completa GPLP del programa Gold, presenta resultados relevantes tanto para los datos de entrenamiento como de validación. En promedio las funciones de los programas Gold y OpenEye presentan un valor de EF=13,480 en ambos casos, mientras que las funciones del programa Dock 6.8 fueron inferiores, con un promedio EF=5,616. Por tanto, sería más recomendable usar estos programas para calcular la métrica EF, ya que presentan valores más altos de enriquecimiento para el 1% de los datos.

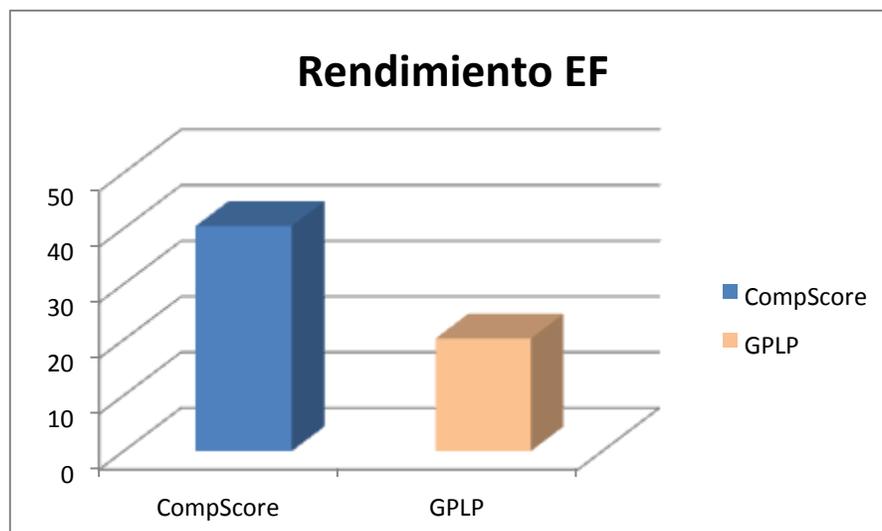


Figura 10. Resultados de EF usando la metodología CompScore en comparación con el mejor resultado de las funciones completa de puntuación GPLP.

Para los resultados de BEDROC el programa Gold presento entre sus funciones completas en promedio un valor de 0,762 siendo este el valor más alto, seguido de las funciones de OpenEye que presento un valor de BEDROC=0,231 y DOCK6.8 con el promedio más bajo 0,105 (tabla 4). Entre estos resultados, el puntaje más alto fue para la función PLP del programa Gold, con un valor de 0,386. Sin embargo, este valor es bajo si se compara con el de la metodología CompScore donde se obtuvo un valor de BEDROC=0,848 (Figura 11).

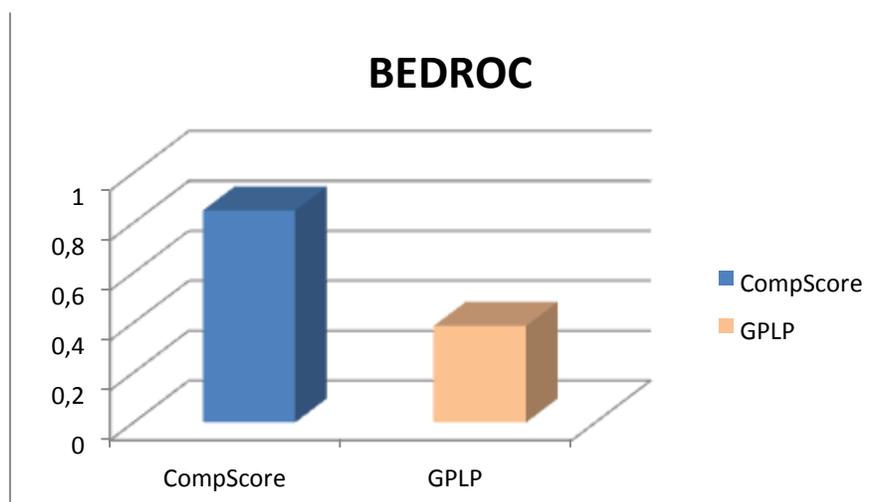


Figura 11. Resultado de BEDROC en la validación externa.

Los resultados de CompScore sobrepasan drásticamente los obtenidos por la función de puntuación individual GPLP.

Finalmente el resultado AUAC para CompScore fue de 0,950 y para GPLP fue de 0,836 (Figura 12). En este como en los otros resultados analizados la metodología CompScore fue la mejor estrategia para el enriquecimiento de las métricas.

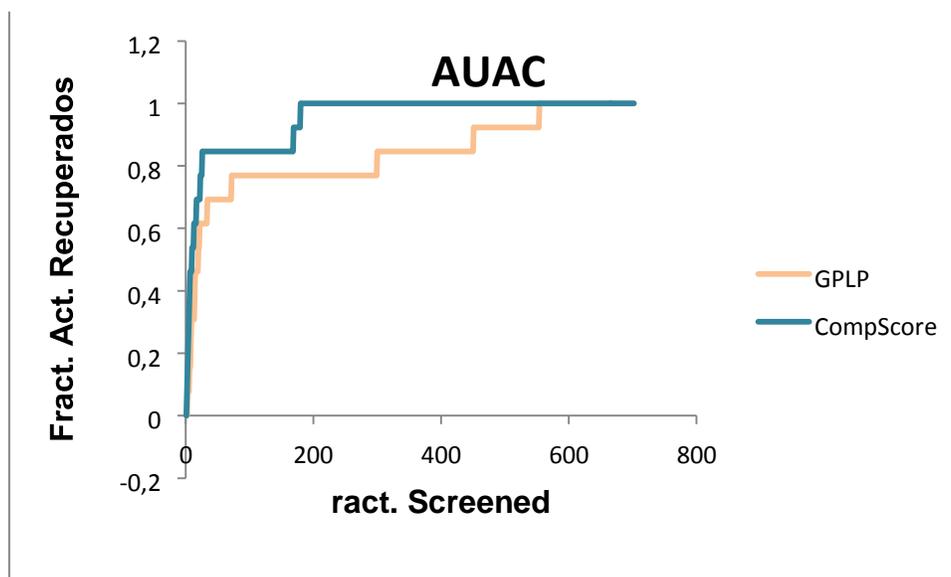


Figura 12. AUAC para los resultados de validación. Se incluyen los resultados de CompScore y GPLP, por ser el mejor resultado de las funciones de puntuación

Tabla 4.

Resultados obtenidos de las funciones individuales de puntuación para los resultados de validación externa.

Para las 15 funciones se presenta el resultado obtenido de AUAC, EF y BEDROC.

Funciones	AUAC	EF	BEDROC
GASP	0,812	20,221	0,234
GChemScore	0,715	13,480	0,207
GGoldScore	0,683	0	0,011
GPLP	0,835	20,221	0,386
DGrid	0,516	0	0,021
DContact	0,845	13,480	0,231
DContinuous	0,538	6,740	0,054
DHawkins	0,541	6,740	0,108
DPBSA	0,534	6,740	0,216
DSASA	0,181	0	3,261E-26

OEShapegauss	0,836	13,480	0,180
OEChemScore	0,682	13,480	0,243
OEChemGauss 3	0,787	13,480	0,209
OEChemGauss 4	0,709	13,480	0,194
OEPLP	0,847	13,480	0,324
Promedio	0,671	10,335	0,175

Por otra parte, aunque la metodología CompScore proporciona un alto enriquecimiento para las métricas EF y BEDROC, no se evidencia una distinción clara entre compuestos con baja o nula estabilización. Esto se comprobó al buscar la posición en la que el algoritmo situó los compuestos de FRET menor a 10 grados. Muchos de ellos se encontraban en posiciones intermedias, mientras dos de ellas se encontraron entre los primeros 100 datos.

Es recomendable que la métrica EF sea enriquecida cuando se quiere evaluar la clasificación de los métodos en el cribado virtual. Dado que su principal propósito es clasificar al principio de una lista ordenada los compuestos activos (ligandos) en una fracción específica. Mientras que BEDROC cumple la función de representar el enriquecimiento temprano. Si se desea maximizar su valor es necesario proporcionar el parámetro α .

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

El uso de moléculas activas e inactivas permite un mejor resultado de acoplamiento para su posterior validación. El uso de las herramientas de CompScore a partir de su algoritmo genético genera un aumento significativo en las métricas de enriquecimiento. El valor EF de 40,44 en los datos de validación es muy superior al obtenido en las funciones de puntuación individuales, lo mismo ocurre en los datos de entrenamiento. Esta característica demuestra que el modelo tiene una calidad superior en comparación a otros. Se ve enriquecidas ambas métricas EF y BEDROC. De forma menos evidente aumenta el valor de AUAC.

La capacidad de enriquecimiento de EF considerando el 1% de las moléculas activas es más acertada que considerar fracciones de 5% 10% o 20% ya que las funciones de puntuación generaron una lista ordenada de compuestos activos en orden ascendente. En conclusión la estrategia de VS mostro características relevantes de enriquecimiento y capacidades adecuadas para el reconocimiento temprano.

5.2 Recomendaciones

Se recomienda aplicar la metodología de CompScore para todas las investigaciones que requieran resultados más exactos y enriquecidos.

REFERENCIAS

- Asamitsu, S., Obata, S., Yu, Z., Bando, T., & Sugiyama, H. (2019). *Recent Progress of Targeted G-Quadruplex-Preferred Ligands Toward Cancer Therapy. Molecules*, 24(3), 429. <https://doi.org/10.3390/molecules24030429>
- Beauvarlet, J., Bensadoun, P., Darbo, E., Labrunie, G., Richard, E., Draskovic, I., ... Djavaheri-mergny, M. (2019). *Modulation of the ATM / autophagy pathway by a G-quadruplex ligand tips the balance between senescence and apoptosis in cancer cells*. 1–18. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz095>
- Berman, H. M. (2000). *The Protein Data Bank. Nucleic Acids Research*, 28(1), 235–242. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>
- Campbell, N. H., Parkinson, G. N., Reszka, A. P., & Neidle, S. (2008). *Structural basis of DNA quadruplex recognition by an acridine drug. Journal of the American Chemical Society*, 130(21), 6722–6724. <https://doi.org/10.1021/ja8016973>
- Castillo-González, D., Mergny, J. L., De Rache, A., Pérez-Machado, G., Cabrera-Pérez, M. A., Nicolotti, O., ... Cruz-Monteagudo, M. (2015). *Harmonization of QSAR Best Practices and Molecular Docking Provides an Efficient Virtual Screening Tool for Discovering New G-Quadruplex Ligands. Journal of Chemical Information and Modeling*, 55(10), 2094–2110. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.5b00415>
- Chen, S., Tan, J., Ou, T., Huang, S., An, L., Luo, H., ... Huang, Z. (2011). *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters Pharmacophore-based discovery of triaryl-substituted imidazole as new telomeric G-quadruplex ligand. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 21(3), 1004–1009. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.12.019>

- Chen, Z., Zheng, K. W., Hao, Y. H., & Tan, Z. (2009). *Reduced or diminished stabilization of the telomere G-quadruplex and inhibition of telomerase by small chemical ligands under molecular crowding condition. Journal of the American Chemical Society, 131(30), 10430–10438.*
<https://doi.org/10.1021/ja9010749>
- Cleal, K., Norris, K., & Baird, D. (2018). *Telomere Length Dynamics and the Evolution of Cancer Genome Architecture.*(1–17.
<https://doi.org/10.3390/ijms19020482>
- Dalyan, Y. B., & Chalikian, T. V. (2017). *Effect of Urea on G-Quadruplex Stability Effect of Urea on G-quadruplex Stability.*
- De Vitis, M., Berardinelli, F., & Sgura, A. (2018). *Telomere length maintenance in cancer: At the crossroad between telomerase and alternative lengthening of telomeres (ALT). International Journal of Molecular Sciences, 19(2).*
<https://doi.org/10.3390/ijms19020606>
- Griffin, D. K. (2019). *TeGriffin, D. K. (2019). Telomere Biology and Human Phenotype. 1–19. https://doi.org/10.3390/cells8010073lomere Biology and Human Phenotype. 1–19. https://doi.org/10.3390/cells8010073*
- Harkness, R. W., & Mittermaier, A. K. (2017). *G-quadruplex dynamics. Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics, 1865(11), 1544–1554.*
<https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2017.06.012>
- Hochnadel, I., Kossatz-boehlert, U., Jedicke, N., Lenzen, H., Manns, M. P., & Yevesa, T. (2017). *Cancer vaccines and immunotherapeutic approaches in hepatobiliary and pancreatic cancers. 13(12), 2931–2952.*
- Ivancich, M., Schrank, Z., Wojdyla, L., Leviskas, B., & Kuckovic, A. (2017). *Treating Cancer by Targeting Telomeres and Telomerase.*
<https://doi.org/10.3390/antiox6010015>

- Joy, S., Vijayakumar, Y. M., & Sunhye, G. (2015). *Role of computer-aided drug design in modern drug discovery*. *Archives of Pharmacal Research*. <https://doi.org/10.1007/s12272-015-0640-5>
- Kearnes, S., & Riley, P. (2016). *Molecular graph convolutions: moving beyond fingerprints*. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 30(8), 595–608. <https://doi.org/10.1007/s10822-016-9938-8>
- Kirchmair, J., Distinto, S., Markt, P., Schuster, D., Spitzer, G. M., Liedl, K. R., & Wolber, G. (2009). *How To Optimize Shape-Based Virtual Screening: Choosing the Right Query and Including Chemical Information*. 678–692.
- Koeppel, F. (2001). *Ethidium derivatives bind to G-quartets, inhibit telomerase and act as fluorescent probes for quadruplexes*. *Nucleic Acids Research*, 29(5), 1087–1096. <https://doi.org/10.1093/nar/29.5.1087>
- Kwok, C. K., & Merrick, C. J. (2017). *G-Quadruplexes: Prediction, Characterization, and Biological Application*. *Trends in Biotechnology*, 35(10), 997–1013. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.06.012>
- Lang, P. T., Brozell, S. R., Mukherjee, S., Pettersen, E. F., Meng, E. C., Thomas, V., ... Kuntz, I. D. (2009). *DOCK 6: Combining techniques to model RNA – small molecule complexes*. 1219–1230. <https://doi.org/10.1261/rna.1563609.HIV>
- Li, Q., Xiang, J.-F., Yang, Q.-F., Sun, H.-X., Guan, A.-J., & Tang, Y.-L. (2013). *G4LDB: a database for discovering and studying G-quadruplex ligands*. *Nucleic Acids Research*, 41(Database issue), D1115-23. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1101>
- Li, Y., Liu, Z., Li, J., Han, L., Liu, J., Zhao, Z., & Wang, R. (2014). *Comparative assessment of scoring functions on an updated benchmark: 1. compilation of*

the test set. Journal of Chemical Information and Modeling, 54(6), 1700–1716.
<https://doi.org/10.1021/ci500080q>

Liu, X., Shi, D., Zhou, S., Liu, H., & Liu, H. (2018). *Expert Opinion on Drug Discovery Molecular dynamics simulations and novel drug discovery. Expert Opinion on Drug Discovery*, 00(00), 1–15.
<https://doi.org/10.1080/17460441.2018.1403419>

Lu, J., Kong, X., Liang, Z., Luo, C., & Jiang, H. (2012). *Computational drug discovery. Acta Pharmacologica Sinica*, 33(9), 1131–1140.
<https://doi.org/10.1038/aps.2012.109>

Maciejowski, J., & Lange, T. De. (2017). *Telomeres in cancer: tumour. Nature Publishing Group*. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.171>

Meier, M., Moya-torres, A., Krahn, N. J., Mcdougall, M. D., Orriss, L., Mcrae, E. K. S., ... Patel, T. R. (2018). *Structure and hydrodynamics of a DNA Gquadruplex with a cytosine bulge. (May)*, 1–13.
<https://doi.org/10.1093/nar/gky307>

Mendoza, O., Bourdoncle, A., Boulé, J. B., Brosh, R. M., & Mergny, J. L. (2016). *Gquadruplexes and helicases. Nucleic Acids Research*, 44(5), 1989–2006.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkw079>

Mergny, J., & Sen, D. (2019). *DNA Quadruple Helices in Nanotechnology [Reviewarticle]. Chemical Reviews*, 119, 6290–6325.
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00629>

Monsen, R. C., & Trent, J. O. (2018). *Biochimie G-quadruplex virtual drug screening: A review. Biochimie*, 152, 134–148.
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.06.024>

- Mysinger, M. M., Carchia, M., Irwin, J. J., & Shoichet, B. K. (2012). *Directory of useful decoys, enhanced (DUD-E): Better ligands and decoys for better benchmarking*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 55(14), 6582–6594. <https://doi.org/10.1021/jm300687e>
- Neidle, S. (2010). *Human telomeric G-quadruplex: The current status of telomeric G-quadruplexes as therapeutic targets in human cancer*. 277, 1118–1125. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07463.x>
- Ngo, K. H., Yang, R., Das, P., Nguyen, G. K. T., Lim, K. W., Tam, J. P., ... Tu, A. (2019). *stability and G-quadruplex binding affinity*. <https://doi.org/10.1039/c9cc06748e>
- Nicoludis, J. M., Barrett, S. P., Mergny, J., & Yatsunyk, L. A. (2012). *Interaction of human telomeric DNA with N-methyl mesoporphyrin IX*. 40(12), 5432–5447. <https://doi.org/10.1093/nar/gks152>
- Perez-castillo, Y., Morales, A., & Cordeiro, M. N. D. S. (2017). *Fusing Docking Scoring Functions Improves the Virtual Screening Performance for Discovering Parkinson's Disease Dual Target Ligands*. 1107–1116. <https://doi.org/10.2174/1570159X15666170109143757>
- Perez-castillo, Y., Sotomayor-burneo, S., Jimenes-vargas, K., & Gonzalez-, M. (2019). *CompScore: boosting structure-based virtual screening performance by incorporating docking scoring functions components into consensus scoring*.
- Porru, M., Zizza, P., Franceschin, M., Leonetti, C., & Biroccio, A. (2017). *EMICORON: A multi-targeting G4 ligand with a promising preclinical profile*. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1861(5), 1362–1370. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.11.010>

- Profiling-functional, P. M., Eisenberg-lerner, A., Regev, I., & Merbl, Y. (2017). *Proteomics for Drug Discovery*. *Proteomics for Drug Discovery*, 1647, 139–152. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7201-2>
- Ps, M., & Manderville, R. A. (2019). *for K + detection*. <https://doi.org/10.1039/c9an02122a>
- Rocca, R., Costa, G., Artese, A., Parrotta, L., Ortuso, F., Maccioni, E., ... Moraca, F. (2016). *Hit Identification of a Novel Dual Binder for h-telo/c-myc GQuadruplex by a Combination of Pharmacophore Structure-Based Virtual Screening and Docking Refinement*. *ChemMedChem*, 1721–1733. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201600053>
- Schleinkofer, K., Wang, T., & Wade, R. C. (2006). *Molecular Docking*. *Encyclopedic Reference of Genomics and Proteomics in Molecular Medicine*, 443, 1149–1153. https://doi.org/10.1007/3-540-29623-9_3820
- Scotti, L., Ishiki, H. M., Duarte, M. C., Oliveira, T. B., & Scotti, M. T. (2018). *Chapter 16 Computational Approaches in Multitarget Drug Discovery*.
- Serafim, T. L. (2014). *Medicinal Chemistry*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 6, 1499–1513.
- Song, J., Perreault, J.-P., Topisirovic, I., & Richard, S. (2016). *RNA Gquadruplexes and their potential regulatory roles in translation*. *Translation*, 4(2), e1244031. <https://doi.org/10.1080/21690731.2016.1244031>
- Tariman, J. D. (2017). *Changes in Cancer Treatment*. *Nursing Clinics of NA*, 52(1), 65–81. <https://doi.org/10.1016/j.cnur.2016.10.004>
- Tomita, K. (2018a). *How long does telomerase extend telomeres? Regulation of telomerase release and telomere length homeostasis*. *Current Genetics*, 64(6), 1177–1181. <https://doi.org/10.1007/s00294-018-0836-6>

- Tomita, K. (2018b). *How long does telomerase extend telomeres? Regulation of telomerase release and telomere length homeostasis. Current Genetics*, 64(6), 1177–1181. <https://doi.org/10.1007/s00294-018-0836-6>
- Torres, P. H. M., Sodero, A. C. R., & Jofily, P. (2019). *Key Topics in Molecular Docking for Drug Design*. 1–29.
- Truchon, J. &, & Bayly, C. I. (2007). *Evaluating Virtual Screening Methods: Good and Bad Metrics for the “ Early Recognition ” Problem*. 488–508. <https://doi.org/10.1021/ci600426e>
- Van Ly, D., Low, R. R. J., Frölich, S., Bartolec, T. K., Kafer, G. R., Pickett, H. A., ... Cesare, A. J. (2018). *Telomere Loop Dynamics in Chromosome End Protection. Molecular Cell*, 71(4), 510-525.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.06.025>
- Z. Crees, J. Girard, Z. Rios, G. Botting, K. Harrington, C. Shearrow, L. W. (2014). *Oligonucleotides and G-quadruplex stabilizers: targeting telomeres and telomerase in cancer therapy*. <https://doi.org/10.2174/1381612820666140630100702>
- Z. Wang, H. S., & C. Shen, X. Hu, J. Gao, D. Li, D. C. and T. H. (2020). *Combined Strategies in Structure-based Virtual Screening*. 19. <https://doi.org/10.1039/C9CP06303J>
- Zhou, G., Liu, X., Li, Y., Xu, S., & Ma, C. (2016). *Telomere targeting with a novel G-quadruplex-interactive ligand BRACO-19 induces T-loop disassembly and telomerase displacement in human glioblastoma cells*. 7(12).
- Zorzan, E., Da Ros, S., Musetti, C., Shahidian, L. Z., Coelho, N. F. R.,

Bonsembiante, F., ... Dacasto, M. (2016). *Screening of candidate Gquadruplex ligands for the human c-KIT promotorial region and their effects in multiple in-vitro models.* *Oncotarget*, 7(16).
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.7808>

Zurek, M., Altschmied, J., Kohlgrüber, S., Ale-agma, N., & Haendeler, J. (2016). *Role of Telomerase in the Cardiovascular System.* (Cvd), 1–11.
<https://doi.org/10.3390/genes7060029>

