

Evaluación *in silico* de las interacciones entre el receptor FMS-tirosina cinasa 3 con la mutación ITD (FLT3-ITD) y los inhibidores de FLT3 usados en el tratamiento de la Leucemia Mieloide Aguda.

Ahtziri Socorro Carranza-Aranda¹, Anne Santerre¹, Luis Felipe Jave-Suárez² y Sara Elisa Herrera-Rodríguez^{3*}.

¹Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara, Camino Ramón Padilla Sánchez 2100, Zapopan, Jalisco, C.P. 45200.

²Centro de Investigación Biomédica de Occidente, Instituto Mexicano del Seguro Social, Sierra Mojada 800. Guadalajara, Jalisco, C.P. 44340.

³Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, Tablaje Catastral 31264 Km 5.5 Carretera Sierra Papacal-Chuburná, Mérida, Yucatán, C.P. 97302.

Fecha de recepción: 16 de noviembre de 2021 - Fecha de aceptación: 6 de julio de 2022

Resumen

La Leucemia Mieloide Aguda es una neoplasia hematopoyética que representa el 80% de los casos de leucemia en el mundo. Su característica principal es la hiperproliferación de células mieloides inmaduras. En células leucémicas la mutación ITD (duplicación interna en tándem) en el receptor FMS-tirosina-cinasa 3 (FLT3) está relacionada con ventajas proliferativas, de supervivencia, y confiere malignidad celular, por lo que FLT3 es considerado un blanco terapéutico. Se han aprobado inhibidores de FLT3 para su uso como monoterapia (Midostaurina, Gilteritinib, Quizartinib) y otro se encuentra en estudios (Sorafenib). Sin embargo, se desconoce el tipo de interacciones moleculares entre estos y los receptores FLT3 silvestre (FLT3-WT) o mutado (FLT3-ITD). En el presente estudio se evaluaron *in silico* las interacciones entre FLT3-WT y FLT3-ITD y sus inhibidores. Los modelos se realizaron por Modelado Homólogo de Proteínas (SWISS MODEL y Modeller). Posteriormente, las estructuras fueron refinadas con 3Drefine y su calidad se validó con ERRAT, VERIFY3D, QMEAN y ProSA. Los valores de calidad fueron: ERRAT:95.6% y Z-score:-7.35 (FLT3-WT) y ERRAT:83.2% y Z-score:-7.6 (FLT3-ITD). Finalmente, se realizó el acoplamiento molecular entre los modelos de FLT3 y sus inhibidores (Autodock-Vina). Las mejores afinidades fueron entre FLT3-WT y Quizartinib (-10.3Kcal/mol) y FLT3-WT y Gilteritinib (-9.5Kcal/mol), comparado con Sorafenib (-8.3Kcal/mol) y Midostaurina (-7.6Kcal/mol). Las afinidades entre FLT3-ITD y Quizartinib (-8.6Kcal/mol) así como FLT3-ITD y Gilteritinib (-7.4Kcal/mol) disminuyeron, pero aumentaron con Midostaurina (-9.3Kcal/mol), mientras que con Sorafenib no hubo cambio aparente (-8.2Kcal/mol). Por lo tanto, la mutación ITD en FLT3 modificó la afinidad e interacciones de los complejos inhibidor-receptor.

Palabras claves: Leucemia Mieloide Aguda, *in silico*, ITD y FLT3.

*sherrera@ciatej.mx

***In silico* evaluation of the interactions between the ITD-mutated-FMS-tyrosine kinase 3 receptor (FLT3-ITD) and inhibitors of FLT3 used in the treatment of Acute Myeloid Leukemia.**

Abstract

Acute myeloid leukemia (AML) is a hematopoietic neoplasm, which represents 80% of leukemia cases worldwide. Its main feature is the hyperproliferation of immature myeloid cells. In leukemic cells, the ITD (internal tandem duplication) mutation in the FMS-tyrosine kinase 3 (FLT3) receptor is associated with proliferative and survival advantages, as well as increased cellular malignancy, therefore, FLT3 is considered a therapeutic target. The use of FLT3 inhibitors such as Midostaurin, Gilteritinib, and Quizartinib has been approved for monotherapy, and other is still under study (Sorafenib). However, little is known on the type of molecular interactions between these inhibitors and the wild type (FLT3-WT) or mutated (FLT3-ITD) FLT3 receptors. In this work we evaluated *in silico* the interactions between FLT3-WT, FLT3-ITD and their inhibitors. The models constructions were performed by Homologous Protein Modeling (SWISS MODEL and Modeller). The structures were then refined and their quality was validated with ERRAT, VERITY3D, QMEAN and ProSA. Quality values were: ERRAT:95.6% and Z-score:-7.35 (FLT3-WT) and ERRAT:83.2% and Z-score:-7.6 (FLT3-ITD). Finally, molecular dockings between the FLT3 structures and their inhibitors were performed (Autodock-Vina). The best affinities were between WT-FLT3 and Quizartinib (-10.3Kcal/mol), and WT-FLT3 and Gilteritinib (-9.5Kcal/mol), compared to Sorafenib (-8.3Kcal/mol), and Midostaurin (-7.6Kcal/mol). Compared to FLT3-WT, the affinities of FLT3-ITD with Quizartinib (-8.6Kcal/mol) and Gilteritinib (-7.4Kcal/mol) decreased, but increased with Midostaurin (-8.2Kcal/mol), while no apparent changes were observed for Sorafenib (-9.3Kcal/mol). Therefore, the ITD mutation in FLT3 modified the affinities and interactions within the inhibitor-receptor complexes.

Keys words: Acute Myeloid Leukemia, *in silico*, ITD and FLT3.

Introducción

La Leucemia Mieloide Aguda (LMA) es la neoplasia hematopoyética más frecuente en adultos; representa casi el 80% de los casos de Leucemia en la población mundial, con una tasa de supervivencia del 10% en personas con edades avanzadas (60 años) (Lagunas-Rangel, 2016).

El mal pronóstico de la enfermedad se ha relacionado con la heterogeneidad celular en el sitio de origen: la médula ósea, donde se

lleva a cabo de manera normal la hematopoyesis (Gurkan y Akkus 2008). Sin embargo, alteraciones en la hematopoyesis de origen genético y epigenético, traen como consecuencia la desregulación de los procesos de proliferación, diferenciación y muerte celular (Duarte et al. 2018). Lo anterior conlleva al crecimiento autónomo desproporcionado y desregulado de formas inmaduras de las células mieloides, insuficiencia de las células precursoras

hematopoyéticas y la predominancia de las células leucémicas respecto a otros tipos celulares del tejido sanguíneo (Ding et al. 2012; Leyto-Cruz 2018).

Se ha reportado que en más del 97% de los casos, la progresión de la LMA se debe a la presencia de mutaciones que promueven la generación de proteínas disfuncionales o con propiedades funcionales diferentes, como es el caso del receptor FMS-tirosina cinasa 3 (FLT3) (Arber et al. 2016; Leyto-Cruz 2018). El receptor FLT3 se localiza en la superficie de células precursoras tempranas de tipo mieloides y linfoides CD34+ (Meshinchi y Apelbaum 2009). Su activación depende de la interacción con su ligando, lo cual desencadena la activación de vías de señalización intracelulares, como JAK/STAT5, MAPK, RAS, MEK, AKT/ERK y PI3K (Kazi y Rönstrand 2019; Larráyoiz et al. 2019).

En pacientes con LMA el receptor FLT3 se encuentra sobreexpresado, además, presenta mutaciones en su estructura que promueven su activación permanente (Staudt et al. 2018). La mutación ITD (duplicación interna en tándem) en el gen *FLT3* se encuentra presente en 25-35% de los casos de LMA (Lagunas-Rangel 2016; Gokhale et al. 2019). Esta mutación es considerada de mal pronóstico, debido a que promueve cambios en la estructura del receptor FLT3, lo que contribuye a la resistencia a los tratamientos convencionales, tanto los de inducción (con antraciclinas, por ejemplo, daunorubicina) como los de consolidación (transplante alogénico de células hematopoyéticas) (Lagunas-Rangel 2016; Bohl et al. 2019).

Lo anterior, además de la alta toxicidad de los fármacos en personas adultas, conlleva a mayor incidencia de la enfermedad y a la disminución de la supervivencia de los pacientes. Por tanto, las terapias contra LMA representan un gran desafío (Lagunas-Rangel 2015; Larráyoiz et al. 2019).

Recientemente, se han aprobado algunos inhibidores de FLT3 los cuales poseen

mayor efectividad contra la LMA en comparación con los tratamientos convencionales (Fernández et al. 2019). Estos inhibidores se clasifican de acuerdo a su especificidad hacia el sitio de unión al ATP (tipo I), crucial para la activación de la actividad tirosina cinasa, o hacia una región adyacente al mismo (tipo II), la cual regula la activación de FLT3. Por otro lado, estos inhibidores también se pueden clasificar en dos grupos, de primera y segunda generación, con base en la afinidad a FLT3 y el tiempo en que fueron desarrollados; Los inhibidores de FLT3 de primera generación son: Sunitinib, Sorafenib y Midostaurina y los de segunda generación son Crenolanib, Quizartinib y Gilteritinib (Sexauer y Tasian et al. 2017; Daver et al. 2019).

Entre estos inhibidores, solo Midostaurina (primera generación) y Gilteritinib (segunda generación) han sido aprobados para su uso como monoterapia por la FDA (Food and Drug Administration) en Estados Unidos y Quizartinib por el Ministerio de Salud, Trabajo y Bienestar de Japón (MHLW Ministry of Health, Labor and Welfare) (Daver et al. 2019, Antar et al. 2019). Se han descrito las interacciones moleculares de ambos fármacos y el receptor FLT3 silvestre (FLT3-WT), así como los residuos de aminoácidos que participan en la formación de los complejos receptor-ligando (Mashkani et al. 2016, Gokhale et al. 2019; Egbuna et al. 2021), sin embargo, se desconoce si la mutación ITD del FLT3 (FLT3-ITD) provoca un cambio en las interacciones entre los fármacos mencionados y el receptor mutado.

Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue evaluar *in silico* las interacciones moleculares de los inhibidores Midostaurina, Gilteritinib, Quizartinib y Sorafenib con los receptores FTL3-WT y FLT3-ITD y comparar la afinidad de los fármacos para estos receptores, así como en los residuos de aminoácidos involucrados en la formación de los complejos ligando-receptor.

Metodología

El modelo *in silico* de las estructuras FLT3-WT y FLT3-ITD se obtuvo por medio de la técnica de Modelado Homologo de Proteínas. Para FLT3-WT se utilizó el servidor SWISS-MODEL (Waterhouse et al. 2018) y la información estructural disponible del dominio juxtamembranal (sitio regulador de la actividad catalítica) y del dominio tirosina cinasa (sitio activador de la señalización intracelular) se obtuvo de la base de datos Protein Data Bank (PDB) con códigos: 1RJB y 6IL3 (Berman et al. 2000; Griffith et al. 2004; Thomas 2018), los cuales corresponden al receptor en sus estados silvestre autoinhibido (1RJB) e inhibido (6IL3). Una vez obtenida la estructura FLT3-WT se continuó con el modelado del receptor FLT3-ITD; en este caso se usó la estructura FLT3-WT previamente modelada como base y se le añadió la secuencia ITD (H(L)VDFREYEYD/LKWE) en la región juxtamembranal (Reiter et al. 2018) usando el programa Modeller 10.1 (Webb y Sali 2016). Además, ambas estructuras se sometieron a un refinamiento molecular con el servidor 3Drefine (Bhattacharya et al. 2016), el cual contribuye a la calidad de las estructuras finales obtenidas.

La validación de los modelos FLT3-WT y FLT3-ITD (generados y refinados), se valoró con los servidores PROCHEK (Laskowski et al. 1993), ERRAT (Colvos y Yeates 1993), VERITY 3D (Eisenberg et al. 1997), QMEAN (Benkert et al. 2011) y ProSA, (Wiederstein y Sippl 2007).

Al contar con los modelos de FLT3-WT y FLT3-ITD óptimos, se evaluaron las interacciones con los inhibidores Midostaurina, Gilteritinib, Quizartinib y Sorafenib por acoplamiento molecular. Las estructuras 3D de estos fármacos se obtuvieron de la base de datos ZINC15 (<http://zinc15.docking.org>) (Irwin y Shoichet 2005). Posteriormente tanto las estructuras proteicas de los FLT3 modelados como de los inhibidores se sometieron a adecuaciones, como la adición de átomos de hidrogeno, remoción de moléculas de agua, eliminación de ligandos extras y determinación de cargas. Para el caso de las estructuras proteicas FLT3-WT y FLT3-ITD, las cargas seleccionadas fueron AM-BCC y para los ligandos, las cargas adicionales fueron las de Gasteiger, esto con los programas Autodock Tools (Morris et al. 2009) y Chimera USFC (Pettersen et al. 2004). Seguido, con base en estas herramientas, se identificó y seleccionó el sitio de interacción ligando-receptor el cual abarcó el sitio de unión al ATP y zonas adyacentes (Tabla 1).

Tabla 1. Parámetros del sitio de unión de los fármacos a los receptores FLT3-WT y FLT3-ITD.

	FLT3-WT		FLT3-ITD	
	Centro	Tamaño (Å)	Centro	Tamaño (Å)
X	74.64	24	25.0	24
Y	50.01	24	27.5	24
Z	24.46	24	26.8	24

FLT3: FMS-tirosina cinasa 3; WT: silvestre; ITD: mutación duplicación interna en tándem.

Finalmente, las interacciones moleculares entre inhibidores y sus receptores se evaluaron por medio del cálculo de la fuerza

de afinidad (Kcal/mol) con Autodock-Vina, y con PyMOL2 se visualizaron los aminoácidos participantes en la formación de los complejos

ligando-receptor (Trott y Olson 2010; Schrödinger y DeLano 2020).

Se consideraron optimas las uniones con menor fuerza de afinidad, es decir que requieren menor fuerza para generar el complejo ligando-proteína, además de considerar las distancias de contacto entre los ligandos y las estructuras de FLT3 menores o iguales a 5 Å (Gallivan y Dougherty, 1999).

Resultados y discusión

El Modelado Homólogo de Proteínas es ampliamente utilizado cuando se carece de las

estructuras cristalográficas de la proteína de interés, y la confiabilidad de las estructuras modeladas alcanza el 90 al 95% (Contreras-Moreira et al. 2002). El modelado por homología nos permitió obtener las estructuras de FLT3-WT y FLT3-ITD, esta última es crucial en la activación constitutiva del receptor en pacientes con LMA (Lagunas-Rangel 2016).

Los resultados de la evaluación de la calidad estructural de los modelos *in silico* de FLT3, indican que FLT3-WT y FLT3-ITD presentan buena calidad estructural (Tabla 2).

Tabla 2. Resultados de la evaluación del modelo *in silico* de FLT3 por ERRAT, VERIFY3D, QMEAN y ProSA.

Receptor	ERRAT	Verify 3D	QMEAN	ProSA
	Factor de calidad general	Puntaje 3D-ID	Puntaje de calidad	Z-score
FLT3-WT	95.61	93.60 %	0.17	-7.35
FLT3-ITD	83.28	92.28 %	-1.56	-7.6

FLT3: FMS-tirosina cinasa 3; WT: silvestre; ITD: mutación duplicación interna en tándem.

De forma específica, el puntaje del factor de calidad general calculado con el servidor ERRAT mostró valores de 95.61 para FLT3-WT y 83.28 para FLT3-ITD. De los parámetros de ERRAT, se conoce que los valores superiores a 80 indican buena calidad estructural, la cual se determina por las interacciones entre los átomos C, N y O de los aminoácidos de las proteínas evaluadas en comparación con estadísticas de estructuras consideradas con alta calidad (Colvos y Yeates 1993). Por otro lado, los puntajes 3D-1D (Verify3D) describen que el 93.60% (FLT3-WT) y el 92.28% (FLT3-ITD) de los residuos de aminoácidos de los modelos tienen una compatibilidad entre modelo atómico (3D) y la secuencia de las estructuras (1D), es decir, que las estructuras proteicas coinciden con sus propias secuencias con puntuaciones altas, superiores a 80% (Eisenberg et al. 1997) (Tabla 2).

Además, el puntaje de calidad QMEAN, fue adecuado para ambas estructuras del modelo FLT3, con valores de 0.17 y -1.56, respectivamente; este parámetro evalúa los aspectos geométricos de las estructuras proteicas (ángulos de torsión entre los residuos de aminoácidos y la compatibilidad atómica), donde un puntaje mayor -4.0 se considera de buena calidad (Benkert et al. 2011) (Tabla 2).

Otro aspecto importante durante la validación de los modelos de FLT3-WT y FLT3-ITD, fue la evaluación de los receptores con base en el puntaje Z con el servidor ProSA, el cual calcula la estabilidad de la estructura con base en la similitud de las estructuras obtenidas por cristalografía o RMN. Los valores obtenidos del modelo FLT3 indican que las estructuras son estables, ya que el puntaje negativo muestra que tanto FLT3-WT (-7.35) como FLT3-ITD (-7.6) presentan errores mínimos o nulos (Wiederstein y Sippl 2007) (Tabla 2).

La evaluación de la estereoquímica de los modelos de las estructuras FLT3-WT y FLT3-ITD se obtuvo de un diagrama de Ramachandran (Procheck), el cual evalúa las regiones permitidas con base en energías favorables de la conformación proteica y la

disposición de los residuos de aminoácidos (Laskowski et al. 1993). Tanto FLT3-WT como FLT3-ITD mostraron valores aceptables, es decir, que la mayoría de los residuos se encontraban en regiones permitidas estructuralmente (Tabla 3 y Fig. 1a y 1b).

Tabla 3. Puntaje de valores del diagrama de Ramachandran del modelo FLT3-WT y FLT3-ITD modelado por homología.

Receptor	Altamente permitido	Permitido	Aceptable	No permitido
FLT3-WT	91.2 %	8.1 %	0.7 %	0.0 %
FLT3-ITD	89.8 %	8.2 %	1.0 %	1.0 %

FLT3: FMS-tirosina cinasa 3; WT: silvestre; ITD: mutación duplicación interna en tándem.

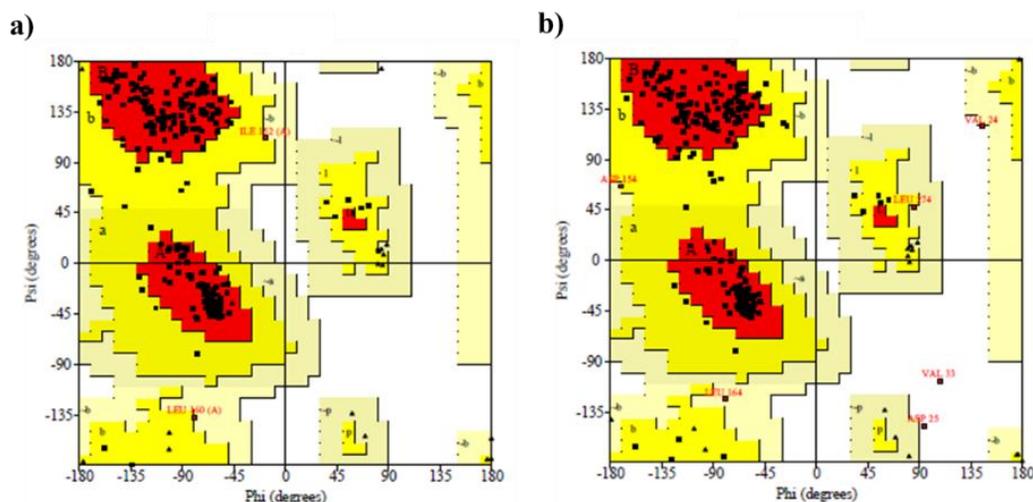


Fig. 1. Gráficos de Ramachandran de las proteínas FLT3 silvestre y mutada modeladas por homología. **a)** FLT3-WT; **b)** FLT3-ITD. Rojo: región centro altamente favorable; amarillo: región permitida; amarillo claro: región aceptable; región blanca: región no permitida.

Por otro lado, los resultados del acoplamiento molecular de los diferentes ligandos de FLT3, muestran que tanto Quizartinib como Gilteritinib presentaron mayor afinidad hacia FLT3-WT con valores de -10.3 Kcal/mol y -9.5 Kcal/mol, respectivamente, en contraste con Sorafenib y Midostaurina (-8.3 Kcal/mol y -7.6 Kcal/mol). Esto puede relacionarse con la naturaleza los residuos de aminoácidos que participan en la formación de los complejos inhibidor-proteína,

donde Gilteritinib muestra mayor interacción con la superficie de FLT3-WT (Tyr 696, Cys 694 y Tyr 693) en comparación con Quizartinib (Arg 704), Midostaurina (Arg 664) y Sorafenib (Leu 618). Estas diferencias de afinidad pueden deberse a que Quizartinib y Gilteritinib (inhibidores de segunda generación) fueron diseñados para interactuar más específicamente con FLT3 en comparación con Sorafenib y Midostaurina (inhibidores multicinasa de primera generación) los cuales

pueden interactuar fácilmente con otras cinasas como VEGFR2, VEGFR-2, KIT y PDGFR- β , lo que puede disminuir su eficiencia y aumentar su toxicidad (Zorn et al. 2015; Antar et al. 2017; Loschi et al. 2021) (Tabla 4 y Fig. 2).

Tabla 4. Interacciones moleculares entre los inhibidores de FLT3 y los modelos FLT3 (WT e ITD).

Inhibidor	Receptor	Afinidad (Kcal/mol)	Uniones polares (H)	Distancia (Å)
Sorafenib	FLT3-WT	-8.3	Leu 618	2.4
			Leu 618	2.3
	FLT3-ITD	-8.2	Leu 646	2.3
			Lys 644	2.5
Midostaurina	FLT3-WT	-7.6	Arg 664	3.5
	FLT3-ITD	-9.3	Arg 764	2.8
Quizartinib	FLT3-WT	-10.3	Arg 704	2.5
			Arg 704	2.6
	FLT3-ITD	-8.6	Arg 704	1.9
			Arg 704	2.2
			Asp 788	2.2
			Cys 694	2.7
Gilteritinib	FLT3-WT	-9.5	Tyr 696	2.5
			Cys 694	2.1
	FLT3-ITD	-7.4	Tyr 693	2.4
			Arg 784	2.3

FLT3: FMS-tirosina cinasa 3, WT: Silvestre; ITD: Duplicación interna en Tándem; H: Hidrogeno; Å: Ångstrom.

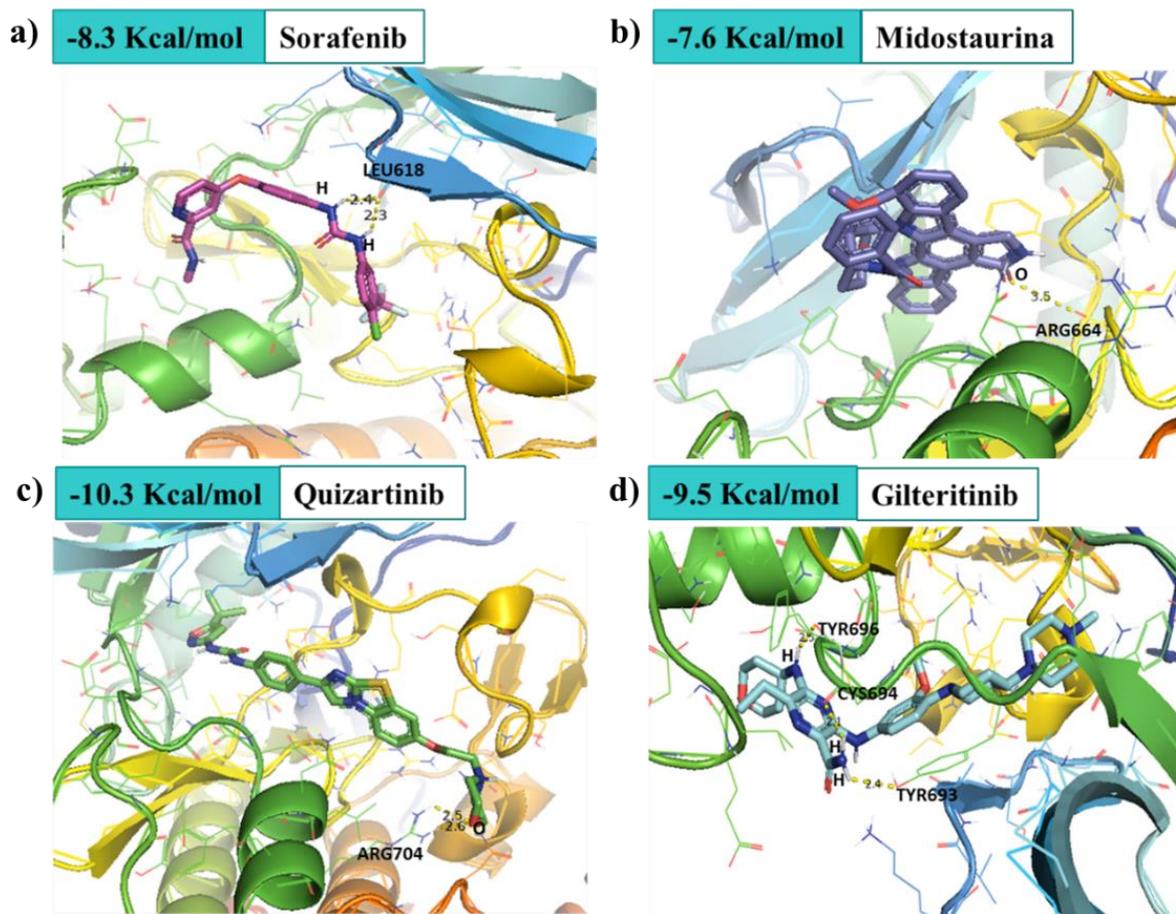


Fig. 2. Interacciones moleculares y afinidad entre ligandos inhibidores de FLT3 y el modelo de FLT3-WT. a) Interacción FLT3-WT/Sorafenib; b) Interacción FLT3-WT/Midostaurina; c) Interacción FLT3-WT/Quizartinib; d) Interacción FLT3-WT/Gilteritinib.

Se observó que la presencia de la mutación ITD en FLT3 promueve cambios en las interacciones inhibidor-proteína, tanto a nivel energético como de residuos de aminoácidos que participan en la formación de los complejos. De forma específica en la Figura 3 se observa que tanto para Quizartinib como para Gilteritinib disminuyó la fuerza de afinidad con el receptor de -10.3 a -8.6Kcal/mol y de -9.5 a -8.2Kcal/mol, respectivamente, además, los residuos de

aminoácidos que forman las uniones del complejo fueron Arg 704, Asp 788 y Cys 694 con Quizartinib y solo Arg 784 con Gilteritinib.

Contrario a lo anterior, Midostaurina incrementó su fuerza de interacción a -9.3Kcal/mol, y Sorafenib se mantuvo estable en -8.2Kcal/mol y los residuos de aminoácidos participantes fueron Arg 764 (Tabla 4 y Fig. 3).

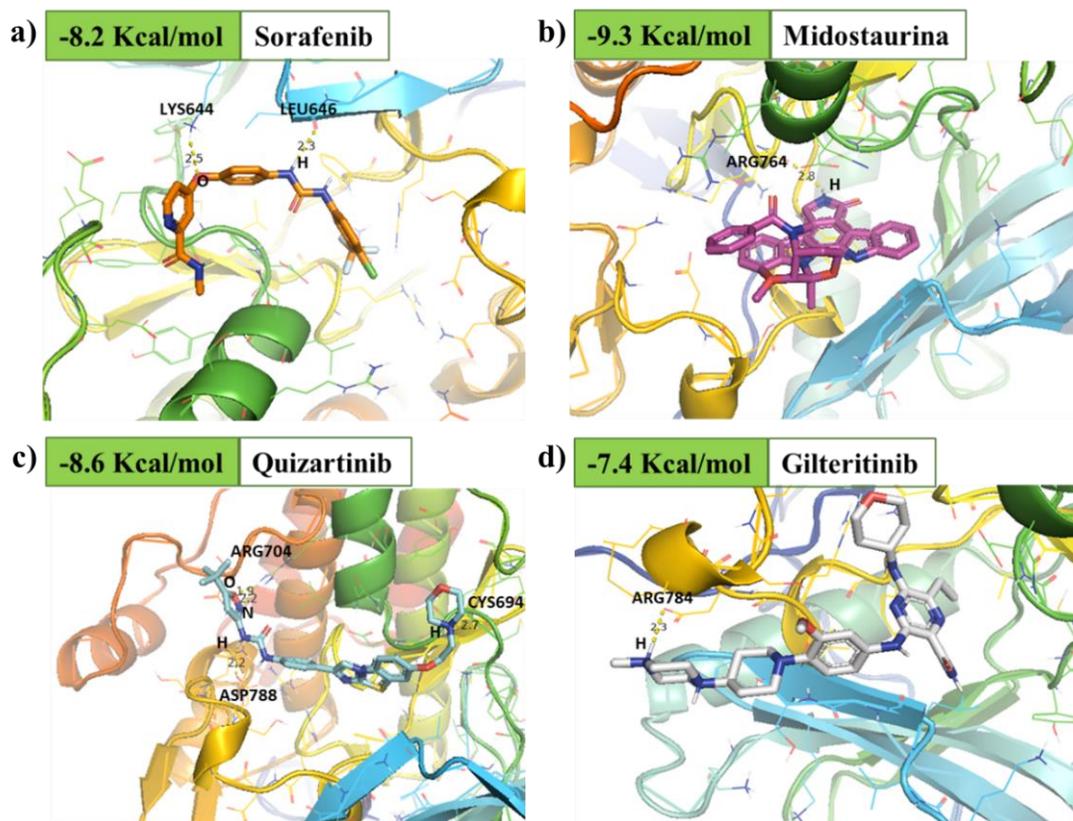


Fig. 3. Interacciones moleculares y afinidad entre ligandos inhibidores de FLT3 y el modelo de FLT3-ITD. a) Interacción FLT3-ITD/Sorafenib; b) Interacción FLT3-ITD/Midostaurina; c) Interacción FLT3-ITD/Quizartinib; d) Interacción FLT3-ITD/Gilteritinib.

Por lo tanto, la presencia de la mutación ITD en FLT3, podría explicar en parte la baja eficiencia de los inhibidores de FLT3 en pacientes con LMA positivos a FLT3-ITD (Zorn et al. 2015; Reiter et al. 2018; Gokhale et al. 2019), por lo que se reitera la necesidad de continuar con la búsqueda de ligandos específicos para este receptor mutado.

Conclusiones

El Modelado Homólogo de FLT3 permitió dilucidar las interacciones moleculares entre los inhibidores comerciales aprobados para el tratamiento de la LMA: Midostaurina, Gilteritinib y Quizartinib con los receptores FLT3-WT y FLT3-ITD, de igual forma describir por primera vez las posibles interacciones entre FLT3-WT y FLT3-ITD con

Sorafenib, fármaco actualmente en estudio contra LMA.

Aunado a lo anterior, los modelos *in silico* de FLT3 (WT y ITD) permitieron observar los cambios en las fuerzas de afinidad necesarias para la formación de los complejos ligando-receptor, así como los residuos de aminoácidos participantes en las uniones polares en el sitio de unión a ATP y adyacente al mismo. Los cambios más relevantes se observaron para Quizartinib y Gilteritinib, considerados específicos contra FLT3 y por ende efectivos para los pacientes LMA que sobreexpresen FLT3. Sin embargo, los análisis *in silico* sugieren que la mutación ITD en FLT3 disminuye la afinidad de estos fármacos por su receptor, al reducir la fuerza de interacción entre ambos.

Por lo tanto, las herramientas bioinformáticas utilizadas en el presente trabajo brindaron aproximaciones útiles para el entendimiento y la evaluación de las interacciones entre fármacos y blancos específicos, además de representar una estrategia eficaz y económica para la urgente búsqueda de nuevas moléculas bioactivas contra el receptor FLT3-ITD asociado con mal pronóstico en pacientes con LMA.

Agradecimientos

A la Dra. María del Rosario Huizar López, Dr. Jesse Haramati y Dra. Susana del Toro Arreola por el asesoramiento y a CONACYT México por la Beca Nacional de Doctorado en Ciencias Biomédicas No. CVU: 842471.

Referencias

- Antar A., Otrock Z., Cheikh J., Kharfan-Dabaja M., Battipaglia G., Mahfouz R., Mohty M. y Bazarbachi A. (2017). Inhibition of FLT3 in AML: a focus on sorafenib. "Bone Marrow Transplantation", 52, 344-351.
- Antar A., Otrock Z., Jabbour E., Mohty M. y Bazarbachi A. (2019). FLT3 inhibitors in acute myeloid leukemia: ten frequently asked questions. "Leukemia", 34(3), 682-696.
- Arber D., Orazi A., Hasserjia R., Thiele J., Borowitz M., Le Beau M., Bloomfield C., Cazzola M. y Vardiman J. (2016). The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. "Blood", 127, 2391-405.
- Benkert P., Biasini M. y Schwede T. (2011). Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. "Bioinformatics", 27, 343-350.
- Berman H., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T, Weissig H., Shindyalov I. y Bourne P.E. (2000). The Protein Data Bank. "Nucleic Acids Research", 28, 235-242.
- Bhattacharya D., Nowotny J., Cao R. y Cheng J. (2016). 3Drefine: an interactive web server for efficient protein structure refinement. "Nucleic Acids Research", 44, W406-9.
- Bohl S., Bullinger L. y Rücker F. (2019). New Targeted Agents in Acute Myeloid Leukemia: New Hope on the Rise. "International Journal of Molecular Science", 20, 1983, 1-19.
- Colvos C. y Yeates T. (1993). Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions. "Protein Science", 2, 1511-1519.
- Contreras-Moreira B., Fitzjohn P. y Bates P. (2002). Comparative modelling: an essential methodology for protein structure prediction in the post-genomic era. "Applied Bioinformatics", 1(4), 177-190.
- Daver N., Schlenk R., Russell N. y Levis M. (2019). Targeting FLT3 mutations in AML: review of current knowledge and evidence. "Leukemia", 33, 299-312.

- Ding L., Ley T., Larson D., Miller C. Koboldt D., Welch J., Ritchey J., Young M., Lamprecht T., McLellan M., McMichael J., Wallis J., Lu C., Shen D., Harris C., Dooling D., Fulton R., Fulton L., Chen K., Schmidt H., y DiPersio, J. (2012). Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. "Nature", 481(7382), 506–510.
- Duarte D., Hawkins E. y Lo Celso C. (2018). The interplay of leukemia cells and the bone marrow microenvironment. "Blood Spothlight", 131(14), 1507-1511.
- Egbuna C., Patrick-Iwuanyanwu K., Onyeike E., Khan J. y Alshehri B. (2021). FMS-like tyrosine kinase-3 (FLT3) inhibitors with better binding affinity and ADMET properties than sorafenib and gilteritinib against acute myeloid leukemia: *in silico* studies. "Journal of Biomolecular Structure and Dynamics", 6, 1-12
- Eisenberg D., Luthy R. y Bowie J. (1997). VERIFY3D: Assessment of protein models with three-dimensional profiles. "Methods Enzymology", 277, 396-404.
- Fernández S., Desplat V., Villacreces A., Guitart A., Milpied N., Rigneux A., Vigo I., Pasquet J. y Dumas P. (2019). Targeting tyrosine kinases in acute myeloid leukemia: Why, who and how? "International Journal of Molecular Sciences", 20(3429), 1-17.
- Gallivan J. P. y Dougherty D. A. (1999). Cation-pi interactions in structural biology. "Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America", 96(17), 9459–9464.
- Gokhale P., Chauhan A., Arora A., Khandekar N., Nayarisseri A. y Singh S. (2019). FLT3 inhibitor design using molecular docking based virtual screening for acute myeloid leukemia. "Bioinformation". 15(2) 104-115.
- Griffith J., Black J., Faerman C., Swenson L., Wynn M., Lu F., Lippke J. y Saxena K. (2004). The Structural Basis for Autoinhibition of FLT3 by the Juxtamembrane Domain. "Molecular Cell", 13(1), 169-178.
- Gurkan U. y Akkus O. (2008). The mechanical environment of bone marrow: A review. "Annals of Biomedical Engineering", 36(12), 1978-1991.
- Irwin J. y Shoichet B. (2005). ZINC- A Free database of commercially available compounds for virtual screening. "Journal of Chemical Information and Modeling", 45(1), 177-182.
- Kazi J. y Rönstrand L. (2019). FMS-like tyrosine kinase 3/FLT3: from basic science to clinical implications. "Physiological Reviews", 99, 1433-1466.
- Lagunas-Rangel F. (2016). Leucemia mieloide aguda: una perspectiva de los mecanismos moleculares del cáncer. "Gaceta Mexicana de Oncología", 15(3), 150-157.

- Lagunas-Rangel F., Pérez-Contreras V. y Cortés-Penagos C. (2015). FLT3, NPMI y C/EBPa como marcadores de pronóstico en pacientes con Leucemia Mieloide Aguda. "Revista de Hematología", 16, 152-167.
- Larráyoz M., Mañu A., Ariceta B., Vázquez I., Aguilera-Díaz A., Fernández-Mercado M. y Calasanz M. (2019). Diagnóstico molecular de alteraciones en el gen FLT3: impacto clínico, retos y propuestas. "Genética Médica y Genómica", 3(3), 31-39.
- Laskowski R., Moss D., y Thornton J. (1993). Main-chain bond length and bond angles in protein structures. "Journal of Molecular Biology", 231, 1049-1067.
- Leyto-Cruz F. (2018). Acute Myeloid Leukemia. "Revista de Hematología", 19(1), 24-40.
- Loschi M., Sammut R., Chiche E. y Cluzeau T. (2021). FLT3 Tyrosine Kinase Inhibitors for the Treatment of Fit and Unfit Patients with FLT3-Mutated AML: A Systematic Review. "International Journal of Molecular Sciences", 22(11), 5873.
- Mashkani B., Hossein M., Saadatmandzadeh M., Ashman L. y Griffith R. (2016). FMS-like tyrosine kinase 3 (FLT3) inhibitors: Molecular docking and experimental studies. "European Journal of Pharmacology". 776, 156-166.
- Meshinchi S. y Appelbaum F. (2009). Structural and functional alterations of FLT3 in acute myeloid leukemia. "Clinical Cancer Research", 15, 4263-4269.
- Morris G., Huey R., Lindstrom W., Sanner M., Belew R., Goodsell D. y Olson A. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. "Journal of computational chemistry", 30(16), 2785-2791.
- Pettersen E., Goddard T., Huang C., Couch G., Greenblatt D., Meng E. y Ferriny T. (2004). "Journal of Computational Chemistry", 25(13), 1605-1612
- Reiter K., Polzer H., Krupka C., Maiser A., Vick B., Rothenberg-Thurley M., Metzeler K., Dörfel D., Salih H., Jung G., Nößner E., Jeremias I., Hiddemann W., Leonhardt H., Spiekermann K., Subklewe M. y Greif P. (2018). Tyrosine kinase inhibition increases the cell surface localization of FLT3-ITD and enhances FLT3-directed immunotherapy of acute myeloid leukemia. "Leukemia", 32(2), 313-322.
- Sexauer A, y Tasian S. (2017). Targeting FLT3 Signaling in Childhood Acute Myeloid Leukemia. "Frontiers in pediatrics", 5, 248.
- Schrödinger L., y DeLano W. (2020). PyMOL. Disponible en: <http://www.pymol.org/pymol>
- Staudt D., Murray H., McLachlan T., Alvaro F., Enjeti A., Verrills N. y Dun M. (2018). Targeting Oncogenic Signaling in Mutant FLT3 Acute Myeloid Leukemia: The Path to Least Resistance. "International Journal of Molecular Sciences", 19, 3198.

- Thomas C. (2018). Crystal structure of the FLT3 kinase bound to a small molecule inhibitor (PDB ID 6IL3) doi: 10.2210/pdb6il3/pdb.
- Trott O. y Olson A. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. "Journal of computational chemistry", 31(2), 455–461.
- Waterhouse A., Bertoni M., Bienert S., Studer G., Tauriello G., Gumienny R., Heer F., de Beer T., Rempfer C., Bordoli L., Lepore R. y Schwede T. (2018). SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. "Nucleic Acids Research", 46, W296-W303.
- Webb B. y Sali A. (2016). Comparative Protein Structure Modeling Using Modeller. "Current Protocols in Bioinformatics" 54, John Wiley & Sons, Inc., 5.6.1-5.6.37.
- Wiederstein M. y Sippl M. (2007). ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. "Nucleic Acids Research", 35, W407–W410.
- Zorn J., Wang Q., Fujimura E., Barros T. y Kuriyan J. (2015). Crystal structure of the FLT3 kinase domain bound to the inhibitor Quizartinib (AC220). "PloS one", 10(4), e0121177.