

Identificación de potenciales blancos moleculares e inhibidores para el tratamiento de infecciones fúngicas con base en similitudes estructurales con proteínas del farmacoloma humano

Tesis para optar por el título de:

Doctor en Ciencias en Modelación y Computación Científica

Autor:

Johann Evelio Bedoya Cardona

Directores de Tesis:

Ernesto Moreno Frías, PhD

Marcela Rubio Carrasquilla, PhD



UNIVERSIDAD DE MEDELLÍN

FACULTAD DE INGENIERÍAS

MEDELLÍN, 2025

Tabla de contenido

Capítulo 1	3
Introducción	3
Objetivo General	11
Objetivos Específicos	11
Manuscritos incluidos en el presente trabajo de tesis	12
Capítulo 2	13
Identifying Potential Molecular Targets in Fungi Based on (Dis)Similarities in Binding Site Architecture with Proteins of the Human Pharmacolome	13
Capítulo 3	31
Structure-guided drug repurposing identifies molecules with antifungal activity on <i>Histoplasma capsulatum</i>	31
Capítulo 4	42
Identificación de compuestos con efecto antifúngico mediante cribado virtual dirigido a proteínas en <i>Histoplasma capsulatum</i> y <i>Fusarium oxysporum</i> con sitios activos similares al de MEK1 humana.	44
Capítulo 5	66
Discusión general y conclusiones	66
Referencias	68
Anexos	73

Capítulo 1

Introducción

Infecciones fúngicas

En el ámbito clínico, las infecciones fúngicas, también llamadas micosis, son enfermedades causadas por hongos. Su severidad varía según factores como la extensión de la infección y la inmunocompetencia del paciente, y se clasifican en función de estos y otros criterios (Caceres et al., 2022).

Dependiendo de los tejidos comprometidos estas infecciones se clasifican en tres categorías: cuando el tejido afectado es la piel, las uñas o el cabello, se clasifican como micosis superficiales/cutáneas; cuando el hongo se aloja en capas más profundas del tejido, generalmente a través de heridas o traumatismos en la superficie cutánea, se clasifican como micosis subcutáneas; y finalmente, cuando la infección involucra múltiples tejidos u órganos de un paciente, las micosis se clasifican como diseminadas, también denominadas sistémicas (Vanzolini & Magnani, 2024).

Los hongos causantes de micosis también se pueden clasificar según su virulencia. Cuando el hongo es un patógeno exógeno que puede infectar pacientes inmunocompetentes, las micosis se clasifican como primarias, como en el caso de infecciones por hongos dimórficos de géneros *Histoplasma* y *Paracoccidioides*. En contraste, las micosis oportunistas corresponden a infecciones provocadas por hongos de patogenicidad baja en condiciones normales, pero que proliferan en individuos inmunocomprometidos, como ocurre en pacientes con VIH/SIDA, pacientes con enfermedades autoinmunes o receptores de trasplante de órganos. Varios de estos hongos son de los géneros *Mucor*, *Aspergillus*, y *Candida* (Walsh & Dixon, 1996).

En el ámbito clínico, las infecciones más problemáticas son las infecciones fúngicas invasivas (IFI), que corresponden a micosis sistémicas particularmente graves que pueden afectar tanto a pacientes inmunocompetentes como inmunocomprometidos, y que a su vez pueden ser de origen primario u oportunista. Entre las IFI más frecuentes y de mayor riesgo se encuentran las candidiasis, criptococosis, aspergilosis, y las mucormicosis. En estos casos, la infección compromete activamente múltiples tejidos u órganos, lo que las convierte en entidades clínicamente complejas y asociadas a tasas de mortalidad elevadas (Alvarez-Moreno et al., 2018; Fang et al., 2023; Seagle et al., 2021).

Panorama global y nacional

El impacto global de las micosis es, en muchos casos, impreciso. Esto se debe a múltiples factores que abarcan la falta de seguimiento, problemáticas socioeconómicas, y la percepción de urgencia en estas, pues para infecciones leves los pacientes inmunocompetentes se recuperan sin llegar a un registro clínico. Aun así, se estima que en el año 2021 hubo más de 1,700 millones de casos de micosis cutáneas (Greener, 2022; Li et al., 2025).

Este panorama es más severo en el caso de las IFI, que han sido objeto de un registro un tanto más sistemático, si bien limitado a las últimas décadas. Estimaciones recientes sugieren que la mortalidad atribuible a estas infecciones es superior a 2.5 millones de personas al año (Denning, 2024).

Respecto a la percepción de urgencia y a los esfuerzos de investigación de las micosis, según datos del Observatorio Global de Investigación y Desarrollo en Salud (Global Observatory on Health R&D), en particular su informe de flujos de financiación por enfermedades desatendidas entre 2007 y 2023, para 2023 el presupuesto destinado al estudio de micosis solo representó el 0.09% del presupuesto reportado, significativamente menor que el 30% de presupuesto destinado a investigación para VIH/SIDA, y enfermedades como malaria (16.53%), y tuberculosis (19.30%). Esta tendencia es proporcionalmente similar desde el año 2020, que se registran datos sobre micosis. Si bien estos datos no son absolutos, permiten hacer una comparación de la prioridad percibida para tratamientos de las micosis respecto a otras enfermedades desatendidas (World Health Organization, 2025b).

Una tendencia similar se puede observar al analizar palabras clave en bases de datos indexadas como Web of Science¹. Para el término “Mycoses” en el año 2024 se relacionaron 1,077 documentos, en comparación con “Malaria”, que presentó 5,024 y “AIDS” con 59,481. Así mismo, el término “Histoplasmosis” mostró 278 resultados, menos que los 1,064 resultados para “Candidiasis”, y este mismo comportamiento se conserva en años previos. Si bien esta observación no representa el panorama de investigación global completo, sirve como referencia adicional para resaltar las tendencias investigativas.

Afortunadamente, las micosis no han sido completamente ignoradas y se ha empezado a comprender la magnitud del problema subyacente. Así, desde el año 2014 el Grupo de Acción Global contra las Infecciones Fúngicas (GAFFI, gaffi.org) presenta informes anuales acerca del impacto e incidencia de diferentes hongos en la salud global, y en el año 2022 la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó una lista de patógenos fúngicos prioritarios clínicamente, como una manera de orientar los esfuerzos en la investigación sobre las micosis de mayor impacto clínico a nivel global (World Health Organization, 2022).

En dicha clasificación seleccionaron grupos de hongos según su impacto en la salud global, asignando niveles de prioridad según un grupo de criterios establecidos, estos niveles son:

Hongos de prioridad crítica: *Cryptococcus neoformans*, *Candida auris*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*.

Hongos de prioridad alta: *Nakaseomyces glabrata* (*Candida glabrata*), *Histoplasma* spp., agentes causantes de Eumycetoma, Mucorales, *Fusarium* spp., *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*.

¹Clarivate™ (Web of Science™). © Clarivate 2025. All rights reserved, Accedido 11/09/2025

Hongos de prioridad media: *Scedosporium spp.*, *Lamentospora prolificans*, *Coccidioides spp.*, *Pichia kudriavzevii* (*Candida cruzei*), *Cryptococcus gattii*, *Talaromyces marneffei*, *Pneumocystis jirovecii*, *Paracoccidioides spp.*

Los hongos de prioridad crítica se consideran causantes de las IFIs más frecuentes y que poseen la mayor importancia percibida en salud pública (candidiasis, aspergilosis, criptococosis) y pueden presentar tasas de mortalidad superiores al 50 % (World Health Organization, 2022). Entre los hongos de prioridad alta se encuentra *Fusarium oxysporum*, uno de los agentes causales de fusariosis que representa la segunda causa de infecciones por mohos en humanos y cuya incidencia ha aumentado significativamente en los últimos años (Nucci et al., 2015; Tupaki-Sreepurna & Kindo, 2018). Otro patógeno de prioridad alta es *Histoplasma capsulatum*, causante de la histoplasmosis, que posee una alta endemicidad en América Latina y África, y presenta un rango de mortalidad entre el 21% y 53 % en pacientes con VIH/SIDA (World Health Organization, 2022; Dao et al., 2024).

El caso colombiano refleja una situación similar al global: el registro sistemático de infecciones fúngicas es limitado, aunque los estudios disponibles permiten inferir tendencias preliminares sobre su impacto. Las candidiasis abarcan el mayor porcentaje de infecciones fúngicas reportadas y tratadas, y existen precedentes de estudios sobre histoplasmosis y otras micosis de alto riesgo, como la asociada a *Candida auris* (Alvarez-Moreno et al., 2018; Armstrong et al., 2019; Giusiano, 2025; Mejía-Arango et al., 2013; Ordóñez et al., 1997; Ramos-Ospina et al., 2024; Rios-Fabra et al., 1994; Valencia et al., 2020). La mayoría de los casos estudiados corresponden a pacientes con VIH/SIDA y otras condiciones preexistentes.

Antifúngicos tradicionales

El tratamiento de las infecciones fúngicas ha dependido de tres grupos principales de compuestos: los polienos, los azoles y las equinocandinas.

Los polienos fueron los primeros en ser descubiertos, específicamente la nistatina, identificada en 1951 (Hazen & Brown, 1951), sin embargo, su poca absorción en el organismo limita su uso principalmente a formulaciones tópicas. De este grupo de moléculas la anfotericina B es el polieno más reconocido. Es usado ampliamente en el tratamiento de diferentes tipos de micosis, sin embargo, posee limitaciones en cuanto a su absorción. En cuanto a su mecanismo de acción, esta molécula se une al ergosterol, lo que ocasiona que se generen poros en la membrana celular de los hongos, que resultan en su desestabilización (Laniado-Laborín & Cabrales-Vargas, 2009).

Los azoles son una familia de moléculas que inhiben la proteína 14 α -desmetilasa (CYP51A1), la cual es indispensable en el proceso de biosíntesis de ergosterol, vital en la membrana celular del hongo, produciendo un efecto de desestabilización. Existen diferentes tipos de azoles en función de la cantidad de nitrógenos en su anillo de 5 miembros. Entre los

azoles más conocidos están el clotrimazol, itraconazol, fluconazol, voriconazol, etc. (Branda et al., 2025; Maertens, 2004).

Las equinocandinas, por su parte, son lipopéptidos que se unen a la proteína β -(1,3)-D-glucano sintasa, importante también para la formación de la pared celular. De este grupo se usan clínicamente tres equinocandinas: caspofungina, micafungina y anidulafungina, las cuales actúan de manera similar y se usan principalmente contra levaduras y otras especies de hongos, siendo su aplicación directamente intravenosa (Denning, 2002)

Otro compuesto usado es la 5-fluorocitosina, que es un análogo de citosina que se metaboliza como 5-fluoruridina trifosfato y se incorpora al ARN fúngico, inhibiendo la síntesis de proteínas. Normalmente se usa en combinación con otros antifúngicos (Campoy & Adrio, 2017; Gintjee et al., 2020; Sigerá & Denning, 2023)

Limitaciones de los antifúngicos actuales y nuevos desarrollos

Todos los tratamientos disponibles contra infecciones fúngicas presentan limitaciones clínicas, entre ellas efectos secundarios como nefrotoxicidad asociada a los azoles y a la flucitosina, baja tasa de absorción sistémica; y la limitación más crítica: el surgimiento de resistencia antifúngica. Esta última reduce la eficacia terapéutica, prolonga los tiempos de tratamiento, intensifica los efectos adversos y restringe las opciones disponibles, especialmente en pacientes con comorbilidades o inmunosupresión (Albataineh et al., 2016; Kadariswantiningsih et al., 2025).

Debido a lo anterior, se han desarrollado estrategias como la vehiculización liposomal, destacando el caso de la anfotericina B liposomal, que mejora la absorción y reduce la toxicidad, y es considerada el estándar terapéutico para la histoplasmosis diseminada. También se ha explorado la coadministración de anfotericina B liposomal con azoles, y otros tipos de terapias similares como estrategia combinada para aumentar la eficacia y reducir la resistencia (Man et al., 2023).

Otras estrategias de investigación que se han implementado en las últimas décadas incluyen el reposicionamiento de fármacos, estrategias basadas en nanotecnología, péptidos, terapias combinadas, e inmunoterapia (Souza et al., 2025). Gracias a estas aproximaciones, en la última década se han incorporado nuevos compuestos al repertorio de antifúngicos disponibles, entre ellos fosmanogepix, un compuesto huérfano que inhibe la enzima Gwt1, implicada en la ruta de biosíntesis del glicosilfosfatidilinositol (GPI). El bloqueo de esta enzima compromete la integridad de la pared celular del hongo (Kapoor et al., 2020). Otro compuesto relevante es olorofim, también considerado como compuesto huérfano, que interfiere con la síntesis de pirimidinas mediante la inhibición de la enzima dihidroorotato deshidrogenasa (DHODH) (Branda et al., 2025; Souza et al., 2025).

Según datos de la OMS, hasta septiembre de 2024 se reportaron 43 productos terapéuticos antifúngicos en desarrollo preclínico o clínico (World Health Organization, 2025a). De estos

productos, 21 están en fase clínica (9 nuevos - entre ellos el olorofim y fosmanogepix-, 8 extensiones de uso y 4 por reposicionamiento), y 22 en fase preclínica. Siete de los nuevos compuestos en fase clínica apuntan a patógenos críticos.

Aún con estos avances, es evidente que el repertorio de compuestos antifúngicos es limitado, considerando además la cantidad de blancos a los que apuntan los compuestos actuales, lo que hace necesario ampliar el repertorio tanto en número de fármacos como en el espectro de los blancos a los que pueden afectar, y de esta manera diversificar las opciones de tratamiento y reducir la incidencia de resistencia a los antifúngicos convencionales.

Reposicionamiento de fármacos a partir del “farmacolom humano”

Una estrategia promisoriosa para abordar tanto la identificación de nuevos blancos moleculares como de inhibidores, es el reposicionamiento de fármacos. Usar compuestos conocidos con un fin distinto a su disposición terapéutica inicial puede aportar grandes ventajas en el desarrollo de tratamientos clínicos, pues permite reducir los tiempos y costos de investigación, lo cual es primordial en un panorama donde son más frecuentes los casos de resistencia a antifúngicos (Ashburn & Thor, 2004; J. H. Kim et al., 2020; Pushpakom et al., 2018). Este tipo de estrategias ya han sido implementadas en la búsqueda de compuestos antifúngicos, si bien la mayoría de los esfuerzos se han enfocado en patógenos de prioridad crítica como *Candida albicans* (Chavez-Dozal et al., 2014; K. Kim et al., 2015; Nasr Esfahani et al., 2019; Wall et al., 2018).

Dado que en el reposicionamiento se conocen los blancos de fármacos previamente aprobados, resulta útil tomar como fuente el llamado “farmacoloma”, definido como “**el conjunto de productos génicos (blancos) modulados por los fármacos actuales**” (Santos et al., 2016), y compilado a partir de una revisión sistemática de los fármacos aprobados por la FDA hasta 2015. Hasta esa fecha, el farmacoloma constaba de 1,578 fármacos aprobados, cuyos blancos constituyen un conjunto de 893 biomoléculas, tanto humanas como de diferentes organismos patogénicos.

El impacto de dicho estudio radica en diversos aspectos: se muestra que existen familias de proteínas privilegiadas como blancos (con mayor número de fármacos dirigidos ellas). Por ejemplo, los receptores acoplados a proteínas G de tipo rodopsina, los canales iónicos, las quinasas y los receptores nucleares de hormonas representan el 44 % de todos los blancos proteicos humanos. En contraste, los blancos, y fármacos asociados a infecciones fúngicas son limitados.

El trabajo de Santos y colaboradores resalta además la existencia de ortólogos entre blancos terapéuticos humanos y proteínas de otros organismos, es decir, la presencia de proteínas homólogas a las del farmacoloma en otras especies, lo cual es más frecuente en eucariotas, incluidos los hongos, lo cual representa un punto de partida importante para estudios de

reposicionamiento de fármacos. Estos autores sugieren que tomando como núcleo la parte humana del farmacoloma, es decir el “farmacoloma humano”, “se pueden compilar listas de ortólogos en organismos modelo, estos genes se pueden mapear a sus respectivos blancos proteicos, los blancos a los fármacos, y los fármacos a su indicación terapéutica” (Santos et al., 2016).

Descripción resumida de la investigación presentada en la tesis

En este trabajo se desarrolló una estrategia de bioinformática estructural para identificar posibles blancos terapéuticos en hongos, evaluarlos *in vitro* utilizando fármacos e inhibidores conocidos, y en los casos donde sea posible estructuralmente, avanzar hacia el diseño de nuevos inhibidores específicos para hongos. El núcleo de este enfoque consiste en identificar proteínas fúngicas cuyos sitios activos sean estructuralmente similares, pero preferiblemente no idénticos, a los sitios de unión de proteínas del farmacoloma humano. Por un lado, una alta similitud estructural con la contraparte humana permite validar el blanco fúngico mediante inhibidores que actúan sobre la proteína humana (lo que podría facilitar el reposicionamiento de fármacos). Por otro lado, pequeñas diferencias en los aminoácidos del bolsillo de unión generan cambios topológicos y químicos locales que pueden aprovecharse para identificar o diseñar inhibidores específicos del blanco fúngico.

Nos centramos en las proteínas del farmacoloma humano para las cuales hay disponibles estructuras cristalográficas en complejo con al menos un ligando. La presencia de ligandos para cada proteína, nos permitió identificar el conjunto de aminoácidos que forman su sitio de unión, y a partir de este conjunto, la región de la secuencia de la proteína que los incluye.

Las regiones de secuencia identificadas se compararon contra proteomas completos de diferentes hongos de prioridad crítica y alta, entre los que se encuentra *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Histoplasma capsulatum* y *Fusarium oxysporum*, entre otros patógenos prioritarios definidos por la OMS. Se identificaron múltiples proteínas con potencial como blancos terapéuticos, basados en identidad de secuencia y porcentaje de conservación de sus sitios de bolsillo, lo cual se detalla en el **capítulo 2**. Debido a la ausencia de estructuras cristalográficas de las proteínas fúngicas identificadas, se crearon modelos computacionales de varias de estas, con el fin de evaluar la posible unión de los inhibidores conocidos de la proteína humana a su ortóloga en el hongo, y seleccionar aquellas que ofrecieran un espacio estructural diferencial para la búsqueda de inhibidores específicos.

A partir de esta identificación de blancos terapéuticos, se realizó una evaluación de múltiples fármacos aprobados por la FDA mediante ensayos *in vitro*. Para ello, se seleccionó como modelo *Histoplasma capsulatum*, patógeno de prioridad alta y agente causal de la histoplasmosis, con alta endemicidad en América y Colombia (Ordóñez et al., 1997; Ramos-Ospina et al., 2024; Scully & Baddley, 2018). Los resultados de esta evaluación se presentan en el **capítulo 3**.

Desde el enfoque de identificación de nuevos blancos terapéuticos, se seleccionó la proteína MEK1 humana como modelo de análisis. Partiendo de los resultados preliminares descritos en el capítulo 2, se realizaron análisis estructurales, seguidos del modelado de los sitios

activos de sus ortólogos fúngicos. En este caso, se analizaron proteínas de *H. capsulatum* y *F. oxysporum*, ambos patógenos de prioridad alta.

Finalmente, se realizó una evaluación *in vitro* en cepas de *H. capsulatum* y *F. oxysporum* de un grupo de compuestos seleccionados mediante cribado virtual. Se determinaron las concentraciones inhibitorias (IC₅₀) y se evaluó la especificidad de los compuestos en dos líneas celulares humanas. Estos resultados se presentan en el **capítulo 4**, y constituyen la base para futuras etapas de optimización y diseño racional de inhibidores antifúngicos.

Objetivo General

Identificar potenciales blancos terapéuticos en hongos patogénicos a partir de la similitud estructural de sus sitios activos con proteínas del farmacoloma humano, e identificar y evaluar *in vitro* posibles inhibidores de estos blancos.

Objetivos Específicos

1. Desarrollar una estrategia bioinformática para identificar sitios de unión en proteínas de hongos, con base en similitudes estructurales con sitios activos de proteínas del farmacoloma humano.
2. Identificar proteínas en los hongos *Histoplasma capsulatum* y *Fusarium oxysporum*, con bolsillos de unión similares a sitios activos de proteínas del farmacoloma humano, aplicando la estrategia desarrollada.
3. Identificar y evaluar *in vitro* el efecto de inhibición del crecimiento de *Histoplasma capsulatum* y *Fusarium oxysporum*, de inhibidores de proteínas humanas ortólogas a las proteínas fúngicas identificadas.
4. Identificar en bases de datos, y evaluar *in vitro* potenciales inhibidores específicos de los blancos fúngicos identificados.

Manuscritos incluidos en el presente trabajo de tesis

Los capítulos 2 al 4 de la presente tesis están compuestos por manuscritos independientes, de los cuales el capítulo 2 ya está publicado y corresponde al siguiente artículo:

1. **Bedoya-Cardona JE**, Rubio-Carrasquilla M, Ramírez-Velásquez IM, Valdés-Tresanco MS, Moreno E. Identifying Potential Molecular Targets in Fungi Based on (Dis)Similarities in Binding Site Architecture with Proteins of the Human Pharmacolome. *Molecules*. 2023 Jan 10;28(2):692. doi: 10.3390/molecules28020692. PMID: 36677748; PMCID: PMC9860719.

Los capítulos 3 y 4 corresponden a manuscritos no publicados (uno sometido) los cuales llevan por título:




2. Rubio-Carrasquilla M, **Bedoya-Cardona JE**, Moreno E. Structure-guided drug repurposing identifies molecules with antifungal activity on *Histoplasma capsulatum*.
3. **Bedoya-Cardona JE**, Rubio-Carrasquilla M, Valdés-Tresanco MS, Moreno E. Identificación de compuestos con efecto antifúngico mediante cribado virtual dirigido a proteínas en *Histoplasma capsulatum* y *Fusarium oxysporum* con sitios activos similares al de MEK1 humana.

Capítulo 2

**Identifying Potential Molecular Targets in Fungi Based on
(Dis)Similarities in Binding Site Architecture with Proteins of
the Human Pharmacolome**

Article

Identifying Potential Molecular Targets in Fungi Based on (Dis)Similarities in Binding Site Architecture with Proteins of the Human Pharmacolome

Johann E. Bedoya-Cardona ¹, Marcela Rubio-Carrasquilla ^{1,2}, Iliana M. Ramírez-Velásquez ^{1,3} ,
Mario S. Valdés-Tresanco ¹  and Ernesto Moreno ^{1,*} 

¹ Facultad de Ciencias Básicas, Universidad de Medellín, Medellín 050026, Colombia

² Corporación para Investigaciones Biológicas, Medellín 050034, Colombia

³ Instituto Tecnológico Metropolitano, Medellín 050034, Colombia

* Correspondence: emoreno@udemedellin.edu.co

Abstract: Invasive fungal infections represent a public health problem that worsens over the years with the increasing resistance to current antimycotic agents. Therefore, there is a compelling medical need of widening the antifungal drug repertoire, following different methods such as drug repositioning, identification and validation of new molecular targets and developing new inhibitors against these targets. In this work we developed a structure-based strategy for drug repositioning and new drug design, which can be applied to infectious fungi and other pathogens. Instead of applying the commonly accepted off-target criterion to discard fungal proteins with close homologues in humans, the core of our approach consists in identifying fungal proteins with active sites that are structurally similar, but preferably not identical to binding sites of proteins from the so-called “human pharmacolome”. Using structural information from thousands of human protein target-inhibitor complexes, we identified dozens of proteins in fungal species of the genera *Histoplasma*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* and *Fusarium*, which might be exploited for drug repositioning and, more importantly, also for the design of new fungus-specific inhibitors. As a case study, we present the in vitro experiments performed with a set of selected inhibitors of the human mitogen-activated protein kinases 1/2 (MEK1/2), several of which showed a marked cytotoxic activity in different fungal species.

Keywords: fungal pathogens; drug repurposing; drug development; new therapeutic targets; structural bioinformatics; MEK inhibitors



Citation: Bedoya-Cardona, J.E.; Rubio-Carrasquilla, M.; Ramírez-Velásquez, I.M.; Valdés-Tresanco, M.S.; Moreno, E. Identifying Potential Molecular Targets in Fungi Based on (Dis)Similarities in Binding Site Architecture with Proteins of the Human Pharmacolome. *Molecules* **2023**, *28*, 692. <https://doi.org/10.3390/molecules28020692>

Academic Editors: Jahir Orozco Holguín and Wei Li

Received: 11 November 2022

Revised: 23 December 2022

Accepted: 4 January 2023

Published: 10 January 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Invasive fungal infections (IFIs), caused by yeasts and filamentous fungi, are opportunistic infections that occur mostly in immunodepressed patients and in patients in critical conditions, causing a high morbidity and mortality [1]. IFIs may manifest with different intensities, from simple and mild infections, as is the case of external mycoses, to severe systemic and disseminated mycoses that can cause death [2]. The epidemiological landscape of invasive mycoses is in continuous change, driven by etiological variations among hospitals, countries and the influence of multiple local variables, patient risk factors and medical and surgical praxis [3].

The current repertoire of antifungal drugs includes different classes of molecules: pyrimidines, polyenes, echinocandins and azoles [4–6]. These antifungal drugs, however, present several important drawbacks, such as their adverse side effects, the increasing resistance developed by many fungal pathogens and long treatment times [7]. Therefore, there is a compelling medical need for broadening the therapeutic alternatives to treat these infections. Two main alternatives in this route are drug repositioning and the development

of new drugs directed to new molecular targets in fungi. In either case, a favorable balance between clinical benefits and adverse effects is a relevant issue to take into account.

Commonly, the identification of new targets in pathogens focuses on unique proteins, not present in humans, or with low sequence similarity with human proteins. This approach intends to minimize possible cross-reactions leading to adverse secondary effects. For example, Sosa et al. (2018) developed a database (Target-Pathogen) and a search system that integrates multiple sources of information for the identification of possible targets in pathogens [8]. Among the filters applied in this search system is the so-called “off-target criterion”, which discards proteins with close homologues in humans. Similarly, in more recent works, Mukherjee and coworkers applied a “subtractive genomics” approach to filter out homologous proteins in the search for targets in *Candida* species [9], while Palumbo and coworkers applied the same off-target criterion in a search for potential targets in *Listeria monocytogenes*, following a multilayer omics strategy [10].

Drug repositioning, also referred to as drug repurposing, is a different strategy consisting in finding new medical uses for approved drugs or compounds that have shown an acceptable safety profile in clinical trials, including those that have failed in later stages during the development. This strategy implies shorter development times, lower costs and fewer risks [11,12]. Successful drug repurposing cases have been reported in various therapeutic areas, prompting pharmaceutical companies to open up collaborations with biotech firms and academic communities to synergize research in this area [12–14].

The emergence of various genomic, drug and disease knowledge databases has promoted the rapid development of a variety of computational approaches to guide drug repositioning and new drug development projects. Thus, the so-called network-based methods combine and exploit various kinds of information from multiple data sources, e.g., transcriptomics, drug-induced expression profiling, disease–disease associations, drug–drug interactions, among others [13,15]. Structure-based methods, on the other hand, rely on techniques such as protein–ligand docking, molecular dynamics simulations, virtual screening and quantitative structure–activity relationship (QSAR). Additionally, in recent years, the use of artificial intelligence methods in drug development is gaining a big momentum [15,16].

Drug repurposing approaches have been applied as well to fungal infections [17]. For example, finasteride, a drug generally used for the treatment of benign prostatic hyperplasia, showed efficacy in the prevention of biofilm formation by *Candida albicans*, when used alone and in combination with fluconazole, and showed an effect also in the treatment of preformed biofilms [18]. Another example is atorvastatin, a drug used as a plasma cholesterol reducer, which showed antifungal activity by inhibiting the production of ergosterol from the cell wall in five *Candida* strains (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. kefyr*, *C. stellatoidea* and *C. krusei*) [19]. Furthermore, several drug libraries have been screened against different pathogenic fungi in the search of drugs with previously unknown antifungal effects [20–26].

Currently, the more than one and a half thousand FDA-approved drugs and several thousand compounds in clinical trials, together with their molecular targets, constitute a rich repertoire for drug repurposing and new drug development. According to a study published by Santos et al. (2017), by the year 2015 the Food and Drug Administration (FDA) in the United States had approved a total of 1578 drugs, targeting 893 different human and pathogen-derived biomolecules. This set of targets is defined in the article as the “pharmacolome”, which is spread across the fourteen groups of the anatomical therapeutic chemical (ATC) classification system. A quick survey over the compiled pharmacolome shows the limited availability of approved drugs to treat invasive fungal infections [27].

In this work we developed a structural bioinformatics strategy to identify potential therapeutic targets in fungi, test them in vitro using known drugs and inhibitors and, in suitable cases, intend to develop new fungus-specific inhibitors. The core of this approach consists in identifying fungal proteins with active sites that are structurally similar, but preferably not identical to binding sites of proteins from the human pharmacolome. On the one hand, a high structural similarity with a human counterpart allows validation of the

fungal target using cross-reactive inhibitors of the human protein (possibly leading to drug repurposing). On the other hand, a few amino acid differences in the binding pocket would produce local topological and chemical changes that might be exploited for the design of new specific inhibitors of the fungal target.

Using structural information, we have identified dozens of proteins in several fungal species of the genera *Histoplasma*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* and *Fusarium*, which might be exploited for drug repurposing and for the design of new antifungal agents. As case study we analyze a few fungal proteins showing binding sites similar to the non-ATP competitive binding site of the human mitogen-activated protein kinases 1 and 2 (MEK1/2), and present the in vitro experiments performed with a set of selected (MEK1/2) inhibitors, several of which showed marked cytotoxic activity in various fungal species. Importantly, the binding sites of the MEK analogs in several fungal species show mutations that create opportunities for the design of fungus-specific inhibitors.

2. Results and Discussion

2.1. Selected Set of Human Protein Targets and Binding Site Definition

The primary data source for this work was the list compiled by Santos and coworkers (2017), which included 549 protein targets of small drugs approved by the FDA up to 2015 [27]. We complemented these data by including the small drugs (and their protein targets) approved between 2016 and 2020, which added another 90 small drugs, resulting in a total of 639 human protein targets. From this set, 433 proteins included in their UniProt records cross-referenced to PDB structures, which amounted to more than 8500 PDB entries. The automated and subsequent manual analysis of all these structures, as described in Section 3, yielded 264 different protein targets in complex with one or more ligands.

Figure 1 shows the distribution of the number of PDB complexes per protein target. Most of the targets are represented in the PDB by more than a single protein–ligand complex, which allows a more comprehensive definition of the binding site. An extreme case is the estrogen receptor (UniProt ID: P03372), with more than 500 protein–ligand structures. In spite of this disparity in the numbers of complexes per target, we found consistent binding pocket definitions for most of the proteins. For example, for the estrogen receptor the only found binding site region, located between sequence positions 342 and 544, corresponds to the estradiol binding site.

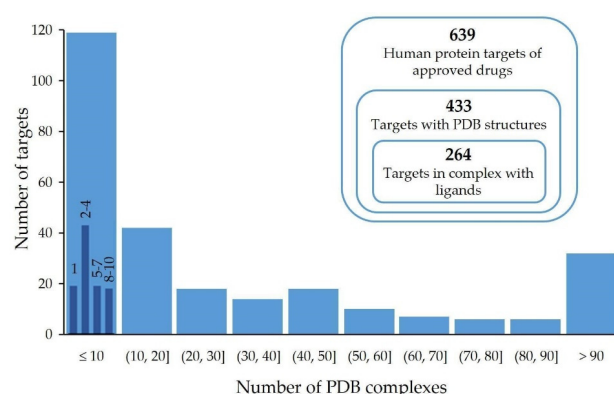


Figure 1. Distribution of the number of human targets per number of PDB protein–ligand complexes in the analyzed set of 264 proteins from the pharmacolome. For the first gross interval [1, 10), a distribution in smaller intervals (1, 2–4, 5–7 and 8–10) is shown in dark blue bars.

The obtained set of PDB entries included 86 ligands corresponding to FDA-approved small drugs (Table S1), which were distributed across > 400 complexes. The large majority of these drugs have >60% of their surface area buried in the protein upon complexation (Figure 2A), while the few cases showing a lower percent of buried area (for example, for cholic acid) corresponds to extra copies of the ligand lying on external areas of the protein surface. We

decided to use this value of 60% of buried ligand surface, covering most of the complexes, as cutoff for further analysis of the binding sites. Likewise, we applied a molecular weight cutoff, allowing a maximum of 80 heavy atoms (corresponding roughly to 1.1 kDa), to discard large ligands, which were mostly peptides and oligonucleotides (see Figure 2B).

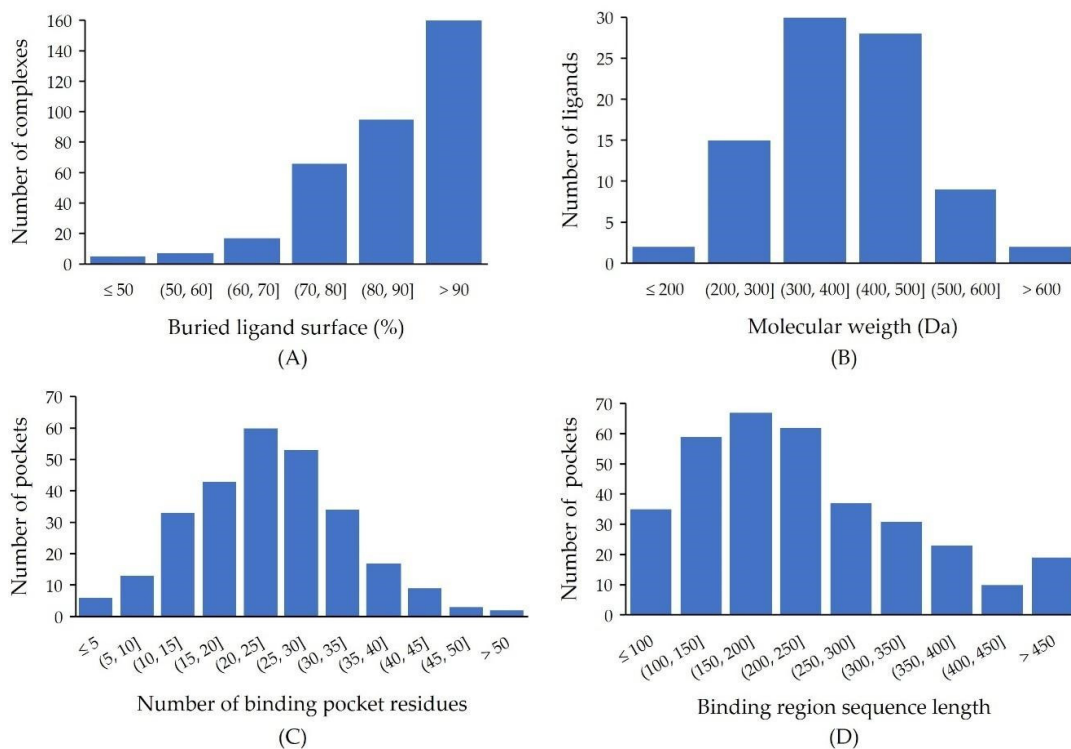


Figure 2. Statistics from the protein–ligand complexes of targets from the human pharmacolome. (A) Histogram of the buried ligand area upon complexation for FDA-approved drugs (data for cholic acid were omitted). (B) Distribution of ligand molecular weights for FDA-approved drugs. (C) Distribution of the number of residues per binding pocket for the 264 selected human targets. (D) Distribution of binding region sequence lengths for the 264 human targets.

The analysis performed to delimit the binding regions within the protein sequences yielded around 1200 clusters of sequence regions, corresponding to 272 protein targets. By manually reviewing these clusters, we selected 343 binding regions in a total of 264 proteins from the human pharmacolome. About 30% of these proteins contained more than one pocket region.

Figure 2C shows the distribution of the number of amino acid residues per binding pocket, as defined here following a contact distance criterion. This means that each amino acid belonging to a binding pocket has at least one atom within a contact distance (4.5 Å) from a ligand in at least one PDB complex. These contacts include mostly amino acid side chains, but also residues that interact only through their backbone atoms. The numbers of pocket amino acids across different targets span a wide range, having a maximum at around 20–30 residues. These residues are distributed along sequence regions of different lengths, mostly within a range of 100–250 residues (Figure 2D). The largest regions correspond to transmembrane proteins, such as the alpha units of the sodium channel proteins 2, 9 and 4 (Q99250, Q15858, P35499) and the Voltage-dependent T-type calcium channel subunit alpha-1G (O43497), where the protein chain crosses the cell membrane several times, with large sequence stretches separating the ligand-binding segments.

2.2. Searching a Fungal Proteome for Binding Sites—Case Study: *Histoplasma capsulatum*

Here we present the results obtained for the *Histoplasma capsulatum* proteome as example of the application of the developed strategy. Figure 3A shows the significant

differences between the results obtained using the full human protein sequences for BLAST and those obtained using the defined 343 binding site regions, even though the restrictions imposed for the second type of search were stronger: $\geq 80\%$ sequence coverage vs. $\geq 40\%$ for the full sequences (for most of the proteins, the binding region covers around 40–50% of the full sequence). As shown in Figure 3A, BLAST with binding regions yielded a significantly higher number of hits.

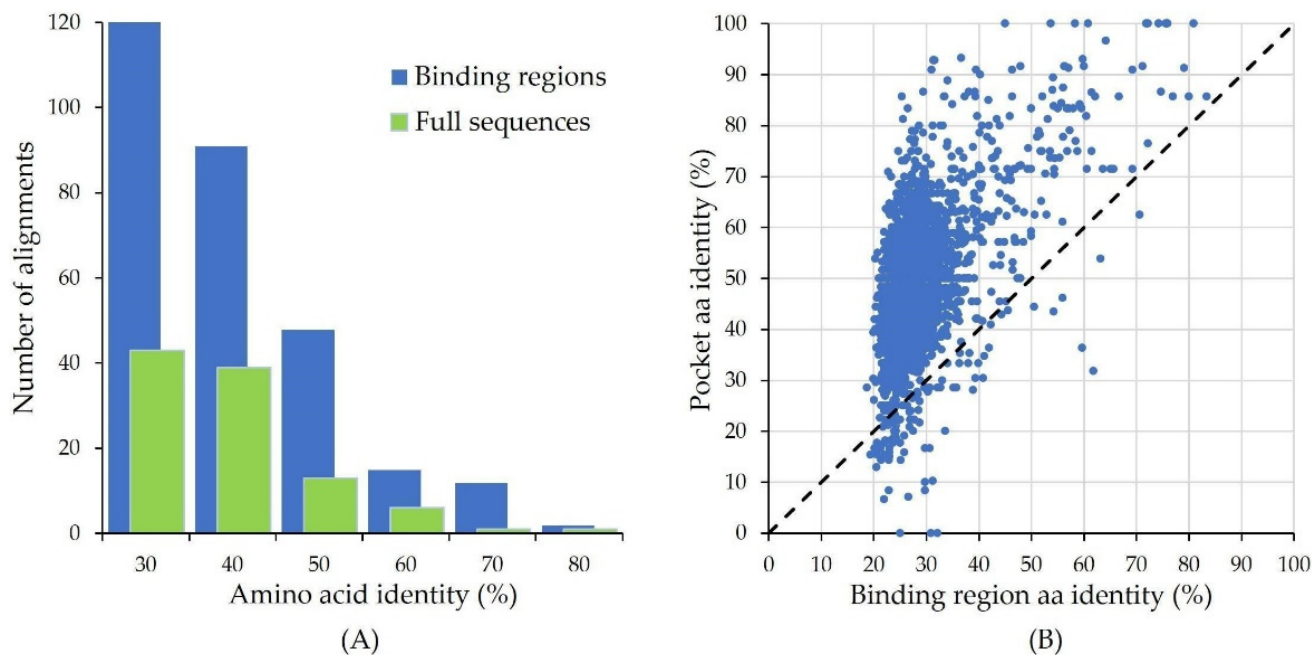


Figure 3. (A) Distribution of aa identity percent in the BLAST sequence alignments obtained for the *Histoplasma capsulatum* proteome, using as input either the full sequences (green bars) or the binding region sequences (blue bars) for the selected 264 proteins from the human pharmacome. (B) Scatter plot showing the higher similarity between human and fungal binding pockets, as compared with the similarity between the binding region sequences that encompass the binding pocket amino acids.

The similarity further increases when comparing only the sets of amino acids forming the binding pockets (Figure 3B), which for the fungal proteins were defined from their alignments with the human binding region sequences, as explained in Methods (Section 3). Even for proteins with low similarity ($< 30\%$ aa identity) in their binding region sequences, the identity between the binding pocket amino acids may be considerably high. For example, the alignment for the aromatic-L-amino-acid decarboxylase (P20711, sequence region 147–303) yields a 33% aa identity with a sequence segment of a fungal protein (UniProt identifier C0NW51; annotated as a glutamate decarboxylase-like protein), while the identity of the corresponding binding pocket residues reaches 85%. Not surprisingly, highly similar binding pockets belong to proteins with conserved roles in the cell, as is the case of polymerases and other enzymes. Several of these binding pockets correspond to binding sites for ATP and different cofactors.

2.3. Expanding the Search to Other Fungal Proteomes

The above analysis carried out for *Histoplasma capsulatum* was extended to other five fungal proteomes of microorganisms of medical relevance: *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Cryptococcus neoformans* and *Fusarium oxysporum*. The main results from these analyses are summarized in Table 1, while the full list of hits is presented in Table S1. The fungal proteins listed in Table 1 contain binding pockets showing $\geq 70\%$ aa identity with their human counterparts. Interestingly, four of the human targets have orthologs with 100% conserved binding sites in all or most of the investigated fungal species.

Table 1. Cont.

Human Protein Target	UniProt Code	Fungal Species *											
		<i>Histoplasma capsulatum</i>	%	<i>Aspergillus fumigatus</i>	%	<i>Candida albicans</i>	%	<i>Candida parapsilosis</i>	%	<i>Cryptococcus neoformans</i>	%	<i>Fusarium oxysporum</i>	%
DHOdehase	Q02127					Q874I4	84	G8BA68	84	Q5KK62	74		
Tyrosine kinase CSK	P41240					A0A1D8PR87	80	G8BKZ2	80				
ROCK-1	Q13464					Q6FP74	71			Q5KEJ1	70		
BCNG-2	Q9UL51					Q59V20	70,6						
Proto-oncogene c-Src	P12931					Q9Y7W4	70						
NTK38	P51813											A0A0C4DJR2	73
CFTR	P13569											A0A0D2XXA6	71
ALDH class 2	P05091											A0A0D2YFW3	70

* For each human target and each proteome, only the fungal protein with the highest aa identity percent is shown. The color code goes from dark to light gray following the decreasing percent of pocket aa identity (from 100% to 70%).

nonetheless, the obtained results lead straightforwardly to the use of known inhibitors of the human targets to test their effects in fungi. Such chemical probing of the predicted targets may be accomplished either by following a comprehensive in vitro testing of a large number of inhibitors (when available), or by following a computational modeling approach to define a more limited set of molecules to be tested, as we illustrate below with the in silico predictions and in vitro assays performed with inhibitors of the human MEK1/2 proteins.

2.4. Several MEK1/2 (MEK) Inhibitors Have Strong Inhibitory Effects in Various Pathogenic Fungi

In humans, the dual specificity mitogen-activated protein kinases 1 and 2 (MEK1 and MEK2, also known as MAP2K1 and MAP2K2), are essential components of the mitogen activated protein (MAP) kinase signal transduction pathway. Both MEK1 and MEK2 have a unique inhibitor-binding pocket adjacent to the Mg/ATP-binding site [33]. Currently, four MEK inhibitors have been approved by the FDA for cancer treatment: trametinib, binimetinib, selumetinib and cobimetinib [34] while others are in clinical trials. The web platform of Selleck Chemicals (Houston, TX, USA), for example, currently lists 33 commercially available MEK inhibitors.

In general, inhibitors of the PI3K/AKT/mTOR, RAS/RAF/MEK/ERK pathway, which are used in the treatment of malignancies and immune-mediated diseases, may predispose to fungal infections by suppressing important components of the adaptive and innate immune response [35], therefore, they would not likely be used as antifungal agents. Nonetheless, there are a few reports where MEK inhibitors have been tested in plant pathogenic fungi. For example, the MEK1/2 inhibitor U0126 was found to decrease germination and hyphae growth in *Aspergillus fumigatus* [36] and to inhibit the conidial germination and pathogenicity of *Setosphaeria turcica*, a plant pathogen [37].

The binding region sequence encompassing the non-ATP binding pocket in MEK1/2 goes from residue 78 to 219 (ca. 200 aa). In this region we identified 23 amino acids (identical in the two proteins) shaping the binding pocket inner surface. Running BLAST using the MEK1/2 binding region sequences yielded three proteins in each of the six analyzed proteomes, showing 62–77% of aa identity between their binding pocket residues and those of MEK (Figure 4).

The alignment in Figure 4 reveals a high degree of binding pocket conservation, with 10 out of 23 residues fully conserved across the human and all the fungal variants. Furthermore, in most cases the amino acid substitutions are conservative, as in positions 78, 99, 127, 141, 143, 212, 215 y 216. At positions 79 and 118, drastic substitutions (G/Y; L/G or L/A, respectively) appear in a few proteins in several fungal species. As discussed below, some of these substitutions represent interesting opportunities for the design of fungus-specific inhibitors.

We decided to test our predictions by assaying in vitro a set of reported MEK inhibitors on the six fungal species analyzed in silico. Docking simulations on the constructed models for proteins F0UAN5 and A0D2XNJ1 from *Histoplasma capsulatum* and *Fusarium oxysporum*, respectively, were performed for 25 inhibitors found in complex with MEK1 in the Protein Data Bank. As result, we selected seven inhibitors: cobimetinib [38], myricetin [39], refametinib [40], trametinib [41], GDC0623 [42], AZD6244 [43] and TAK-733 [44] for the in vitro assays.

Table 2 shows the results of the growth inhibition experiments performed for the six fungal species. The most susceptible microorganism was *Histoplasma capsulatum*, with four inhibitors (cobimetinib, GDC-0623, myricetin and refametinib) showing IC₅₀ values in the low micromolar range. Similarly, *Aspergillus fumigatus* was strongly affected by three inhibitors (cobimetinib, GDC-0623 and TAK-733), while only one inhibitor (cobimetinib) showed a marked effect on *Fusarium oxysporum*. No inhibitor had effects on all the fungal species. The two tested *Candida* species were affected by two inhibitors each, but only at a high micromolar range (>100 µM). The use of a very low concentration of the SDS

surfactant (0.002%), which most likely increases inhibitor solubility, improved the observed inhibitory effects in most cases. This concentration of SDS alone, or in combination with DMSO or ethanol, had only minor effects in fungal viability.

Table 2. Result of the in vitro susceptibility assays (IC₅₀ values, (μM)).

Inhibitor	Fungal Species											
	<i>Histoplasma capsulatum</i>		<i>Cryptococcus neoformans</i>		<i>Candida albicans</i>		<i>Candida parapsilosis</i>		<i>Fusarium oxysporum</i>		<i>Aspergillus fumigatus</i>	
	Solvent *	+SDS **	Solvent	+SDS	Solvent	+SDS	Solvent	+SDS	Solvent	+SDS	Solvent	+SDS
cobimetinib	53	<12.5	>188	>188	>188	>188	>188	158	~100	65	>100	82
GDC-0623	114	63	194	83	>219	>219	>219	>219	>100	~100	8	7
myricetin	>251	36	>251	>251	>251	>251	>251	>251	>251	>251	>251	>251
TAK-733	>198	198	>198	198	>198	198	>198	>198	>100	>100	>100	54
AZD-6244	>328	>328	>328	>328	>328	>328	>328	>328	>328	>328	>328	>328
refametinib	25	<17.5	81	54	175	114	>175	175	ND	ND	ND	ND
trametinib	>49	>49	>49	>49	>49	>49	>49	>49	>49	>49	>49	>49

IC₅₀ values < 100 μM are marked in bold and shadowed in gray. The “<” and “>” signs are used when the IC₅₀ value is lower/greater than the minimum/maximum tested concentration. * Compounds were dissolved in DMSO or ethanol, and added to culture medium. ** Same as above, with the addition of 0.002% SDS.

Since for each of the investigated fungal species we found three proteins with binding sites similar to that of the human MEKs, it is not possible to attribute the observed cytotoxic effects to a particular protein. Furthermore, and although less probable, the actual target might be a different, so far unidentified fungal protein. Reliable target validation would require complementary experiments, e.g., genetic manipulations to affect protein expression. In addition, as discussed below, target validation could be supported with growth inhibition assays involving compounds predicted to be specific for a particular fungal protein.

2.5. Opportunities for the Design of Fungus-Specific Inhibitors

Several of the fungal proteins in Figure 4 show amino acid substitutions in their binding pockets, as compared with the human MEKs, that cause small local topological changes, in particular mutations L118G (*A. fumigatus*, *H. capsulatum*) and L118A in the two *Candida* species. As illustrated in Figure 5 for the *Histoplasma capsulatum* protein F0UAN5, mutation L118G creates a void space within the binding site, previously occupied by the bulky Leu sidechain. This additional small cavity could be filled up by compounds with suitable chemical structures, which, on the other hand, would not bind to human MEK1/2 because of the steric hindrances caused by the leucine sidechain. As discussed above, the actual antifungal effect of these fungus-specific inhibitors would depend on the relevance of their targets for cell vitality.

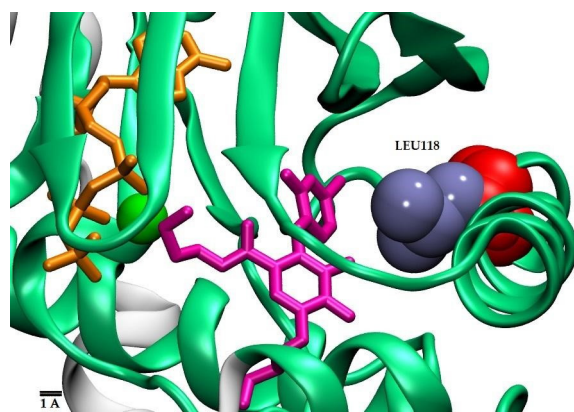


Figure 5. Structure of the MEK1/2 binding site showing the Leu 118 side chain (in blue spheres). Mutation of this residue by Glycine (in red spheres) creates a void space that can be occupied by atoms of fitting compounds.

Performing this kind of analysis on the different pairs of human and fungal proteins having similar binding pockets, as found in this study, may disclose many potential fungal targets with binding site mutations that open up a design space for fungus-specific inhibitors. The zone between 60–75% binding pocket aa identity (Figure 3B), which includes dozens of fungal proteins, looks particularly interesting in this regard.

3. Computational and Experimental Methods

3.1. Computational Strategy to Identify Potential Targets in Fungi and Other Pathogens

Our approach consists in identifying fungal proteins with active sites (meaning the set of residues lining the binding pocket) that are similar to active sites of proteins from the human pharmacolome. As mentioned in the Introduction, a high structural similarity with the binding site of a human counterpart facilitates a chemical validation of the fungal target using known inhibitors of the human protein and, ultimately, may lead to a drug repurposing strategy. We, however, are more focused on exploiting one or a few relevant amino acid differences in the binding pocket that would create a “design space” for new specific inhibitors of the fungal target.

Briefly, we employed a structural approach to identify binding site similarities, taking advantage of the thousands of available crystal structures for proteins of the human pharmacolome, many of them in complex with inhibitors. As explained in detail in the following sections, we used these bound inhibitors as anchors to define the binding site amino acids for each human target, followed by local sequence searches and analyses against the proteomes of several fungal species. The workflow is represented in Figure 6.

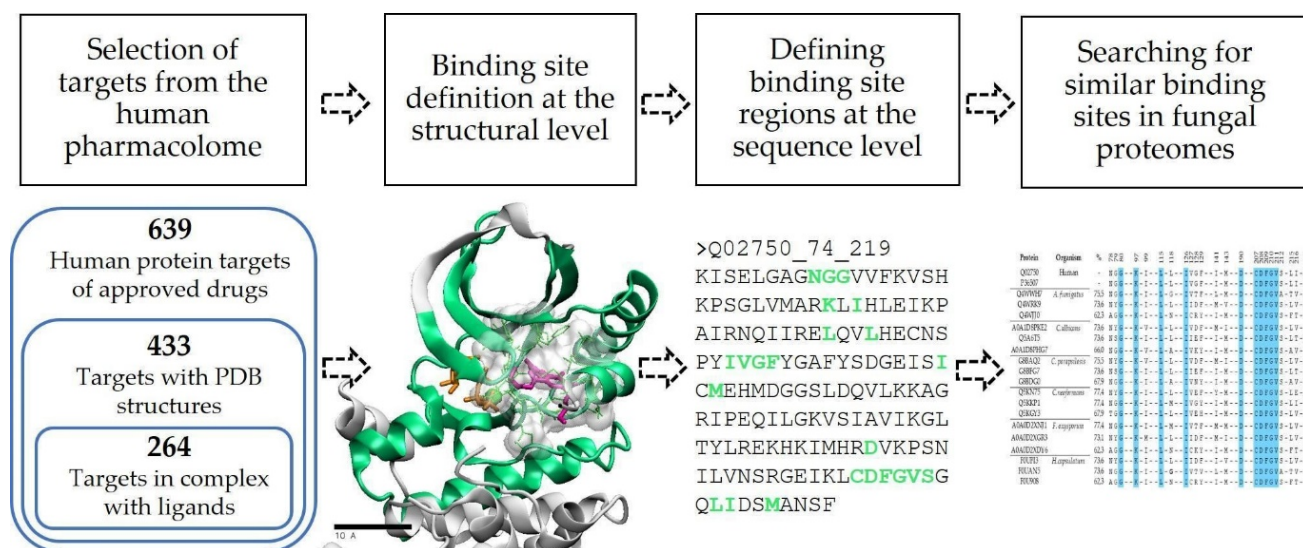


Figure 6. Computational strategy to search for fungal proteins with similar binding sites, taking as reference a selected set of proteins from the human pharmacolome.

3.1.1. Selection of the Human Protein Targets to Be Used for Fungal Proteome Searches

The list of FDA-approved small drugs and their protein targets, up to 2015 as compiled by Santos et al. (2017), was the main primary source for our work. We updated this list up to 2020 by including the small drugs approved by the FDA between 2016 and 2020, taken from the “Compilation of CDER NME and New Biologic Approvals 1985–2020” (www.fda.gov, accessed on 15 November 2021) and mapping their protein targets using the DrugBank database [45]. The compiled data included the generic drug names, their molecular weights, as well as the UniProt identifier [46] of their protein targets, which were used to retrieve the amino acid sequences and the available crystal structures that are associated with many of these proteins.

3.1.2. Binding Site Definition at the Structural Level in the Human Targets

Binding site determination for a human target relied on the existence of at least one protein–ligand complex in the Protein Data Bank (PDB) [47]. Therefore, the next step was to determine which of the thousands of PDB structures associated with hundreds of human clinical protein targets contain bound inhibitors. For this purpose, we used our own program ‘complex_info’ [48], which identifies bound small ligands and carries out a detailed geometric analysis of the protein–ligand interactions, providing information on ligand size (number of heavy atoms), percent of buried ligand surface area, contacting protein atoms and amino acids, among other useful data. We used a filter of 10 heavy atoms as minimum to identify bound ligands, including small peptides and small nucleic acid chains.

Next, we focused the analysis on protein–ligand complexes containing FDA-approved drugs to gather statistics on the number of heavy atoms, surface area buried in the protein upon complexation and the number of contacting protein residues. We then used these data to adjust our search parameters and define more precisely the binding pockets in the human protein targets. In this process we excluded crystallographic molecules such as buffers and polyethylene glycols, heme groups and large peptides and nucleic acid ligands. Finally, for each obtained protein–ligand complex we defined the pocket region as the set of amino acid residues found within 4.5 Å from the ligand, using the VMD program [49]. For each of the identified complexes we tabulated the protein UniProt identifier, the PDB ligand ID, the number of ligand heavy atoms and the PDB sequence number of each binding pocket residue.

3.1.3. Defining Binding Site Regions at the Sequence Level for the Human Targets

We reasoned that using the functionally conserved binding site regions of the human targets for a BLAST search would increase the chances of finding similar regions in fungal proteins. Therefore, the next step was to delimit, for each selected protein target, a continuous sequence region containing the binding site pocket, based on the list of individual binding site amino acids identified in the previous step. Commonly, these binding site residues were scattered along a large sequence segment of a few hundred amino acids. In many cases, more than one protein–ligand complex was available in the PDB for the same target, yielding slightly different binding site lists depending on the size and geometry of each ligand. In addition, the sequence numbering for the same protein may differ between PDB entries, which created an additional difficulty for mapping the binding site residues to the reference Uniprot sequence. To solve this problem, we used pentamer sequence segments, each containing at least one of the binding site amino acids, to find its position in the reference sequence by simple string search. From this mapping procedure we could define a continuous sequence region containing all the binding site residues.

For those human target proteins having several binding site lists (originated from different protein–ligand complexes), we clustered and aligned the obtained sequence regions and manually revised each cluster. From this analysis we defined a unique consensus binding region sequence for each target protein.

3.1.4. Searching for Similar Binding Sites in Fungal Proteomes

The binding region sequences for the obtained set of human targets, as defined in the previous step, were used as query sequences for BLAST searches [50] in fungal proteomes, aiming to focus the search into regions that are more likely to be conserved among evolutionary distant organisms, such as humans and fungi. For comparison purposes, we performed BLAST searches using also the full sequences of the human targets.

For the subsequent analyses, we considered as hits only those alignments covering > 80% of the query sequence (i.e., the binding region sequence). The obtained alignments were then used to establish functional relationships between the binding pocket residues of the human targets and the corresponding amino acids in the fungal sequences. This way, the fungal binding sites became also defined at the amino acid level, as illustrated in Figure 7.

The similarity (percent of amino acid identity) between a human binding site and its corresponding fungal binding pocket was evaluated taking into account only the binding pocket residues. Lastly, we analyzed the alignments showing > 70% identity for the set of binding pocket residues. From the DrugBank we retrieved the list of approved drugs for a small set of these human targets, using also web services such as Drugs.com (“Drugs.Com | Prescription Drug Information, Interactions & Side Effects,” 2021, last accessed on 10 April 2022).

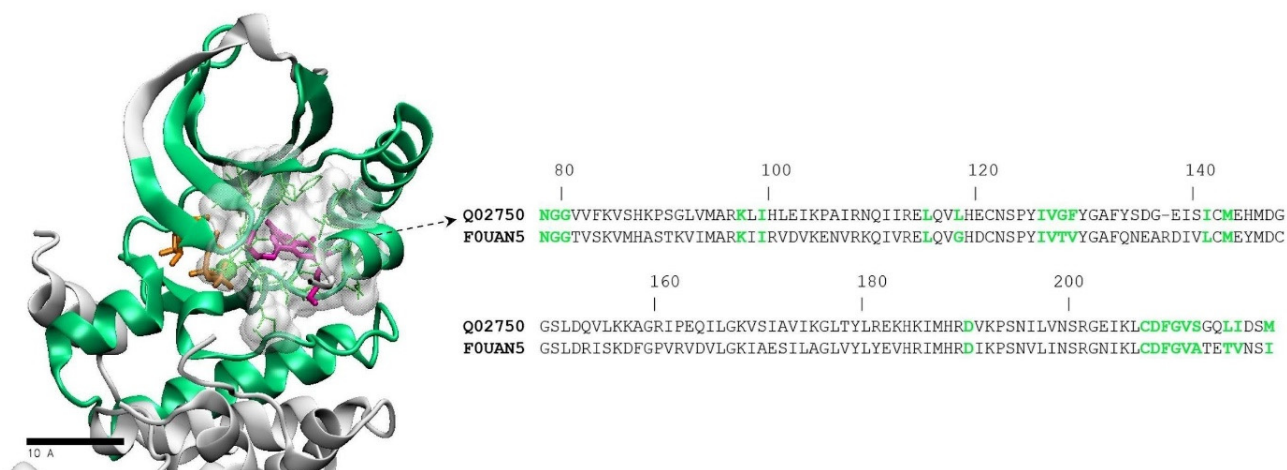


Figure 7. Definition of the binding site pocket and binding region sequence for the human MEK1 target and a fungal protein from *Histoplasma capsulatum* having a highly similar region. The continuous binding region sequence is represented as a green ribbon in the structure (PDB code 3dv3) and shown in full in one-letter code. Binding pocket amino acids are shown with their side chains (green, thin sticks) enclosed in a whitish volume, and are highlighted in green bold letters in the sequence. The MEK1 inhibitor in the 3dv3 structure is shown in thick sticks, colored in magenta. The ATP ligand is shown in orange sticks.

3.2. Fungal Proteomes Included in the Study

We analyzed the proteomes of six fungal species: *Aspergillus fumigatus* (UP000002530), *Candida albicans* (UP000000559), *Candida parapsilosis* (UP000005221), *Cryptococcus neoformans* (UP000002149), *Fusarium oxysporum* (UP000009097) and *Histoplasma capsulatum* (UP000008142), retrieved from the UniProt database.

3.3. Homology Modeling and Molecular Docking

For homology modeling of fungal proteins, we used the SwissModel server [51]. Structural models of the *Histoplasma capsulatum* protein with UniProt identifier FOUAN5 and the *Fusarium oxysporum* protein A0D2XNJ1 were constructed using as template the crystal structure of human MEK1 in complex with an inhibitor (PDB code 3dv3) [52]. AutoDock Tools [53] was employed to prepare molecules for docking simulations, which were carried out with AutoDock Vina [54] using default parameters and a box enclosing the non-ATP competitive binding site.

3.4. In Vitro Assays of MEK Inhibitors

The in vitro tests to assess the susceptibility to MEK inhibitors were carried out in 96-well microplates, seeding 300,000 cells/well for yeasts (*Histoplasma capsulatum*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans* and *Candida parapsilosis*) and 40,000 conidia/well for *Fusarium oxysporum* and *Aspergillus fumigatus*. *Histoplasma capsulatum* was cultured for 6 days in HAMF12 medium supplemented with cysteine and glutamine. The other yeasts were cultured in RPMI 1640 supplemented with 2% glucose for 24 h (for the two *Candidas*) or 72 h (*Cryptococcus*), all of them at 37 °C and stirring at 150 rpm.

MEK inhibitors were purchased from Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI, USA). For each compound, the maximum tested concentration was determined by the solubility data reported by the manufacturer. Each inhibitor was dissolved either in DMSO or ethanol according to manufacturer's instructions. The stock solution for each compound was used at 1% as maximum, so that the DMSO concentration in the culture medium (kept at 1%) would not have toxic effects on the fungi. The compounds were tested also with the addition of 0.002% SDS, which most likely increased their solubility. Controls with 1% DMSO or ethanol, alone or combined with 0.002% SDS, were included in each microplate. To determine the half maximal inhibitory concentration (IC₅₀), a 2-fold dilution series of 4 or 5 inhibitor concentrations was used. Fungal viability was determined using the XTT colorimetric assay.

4. Concluding Remarks

We have developed a strategy for a rational, structure-based approach to drug repositioning and new drug design, which can be applied not only to infectious fungi, but also to other pathogens. Following this methodology, we have identified fungal proteins having high binding site similarities with human targets of drugs that have shown inhibitory effects in fungi. These results not only support the developed strategy, but also contribute to identify the fungal targets responsible for these effects. Importantly, they also expose new routes to explore many drugs and inhibitors not yet tested in fungi.

Not all the identified fungal proteins, even if they are essential for the microorganism, are suitable for drug repositioning to treat fungal infections, especially in cases where the treatment produces severe side effects (as for many cancer drugs) or when it has immunosuppressive effects, which opens a door to opportunistic mycotic and bacterial infections. For a number of human targets, however, the available drugs may have only mild secondary effects, so they might be used to treat fungal infections if they show strong cytotoxic effects on these pathogens. Last but not least, the small structural differences in binding pocket architecture between some pairs of human and fungal proteins can be exploited to design specific antifungal drugs.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/molecules28020692/s1>, Table S1: PDB entries of complexes including FDA-approved small drugs; Table S2: Full list of proteins with similar binding pockets.

Author Contributions: Conceptualization, E.M.; Methodology, J.E.B.-C., M.R.-C., M.S.V.-T. and E.M.; investigation, J.E.B.-C., M.R.-C., I.M.R.-V., M.S.V.-T. and E.M.; writing—original draft preparation, J.E.B.-C., M.R.-C., I.M.R.-V. and E.M.; writing—review and editing, J.E.B.-C. and E.M.; supervision, project administration and funding acquisition, E.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the University of Medellin and Minciencias, Colombia (grant 795-2018).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are contained in the article tables and Supplementary Materials.

Acknowledgments: E.M. and M.R.-C. are grateful to Luz Elena Cano for her support in the early stages of the project.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Sample Availability: All the compounds used in the experiments were purchased from Cayman Chemicals.

References

1. Zeng, H.; Wu, Z.; Yu, B.; Wang, B.; Wu, C.; Wu, J.; Lai, J.; Gao, X.; Chen, J. Network Meta-Analysis of Triazole, Polyene, and Echinocandin Antifungal Agents in Invasive Fungal Infection Prophylaxis in Patients with Hematological Malignancies. *BMC Cancer* **2021**, *21*, 404. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Vallabhaneni, S.; Mody, R.K.; Walker, T.; Chiller, T. The Global Burden of Fungal Diseases. *Infect. Dis. Clin. N. Am.* **2016**, *30*, 1–11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Seagle, E.E.; Williams, S.L.; Chiller, T.M. Recent Trends in the Epidemiology of Fungal Infections. *Infect. Dis. Clin. N. Am.* **2021**, *35*, 237–260. [[CrossRef](#)]
4. Campoy, S.; Adrio, J.L. Antifungals. *Biochem. Pharmacol.* **2017**, *133*, 86–96. [[CrossRef](#)]
5. Houšť, J.; Spížek, J.; Havlíček, V. Antifungal Drugs. *Metabolites* **2020**, *10*, 106. [[CrossRef](#)]
6. Nami, S.; Aghebati-Maleki, A.; Morovati, H.; Aghebati-Maleki, L. Current Antifungal Drugs and Immunotherapeutic Approaches as Promising Strategies to Treatment of Fungal Diseases. *Biomed. Pharmacother.* **2019**, *110*, 857–868. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Wheat, L.J.; Azar, M.M.; Bahr, N.C.; Spec, A.; Relich, R.F.; Hage, C. Histoplasmosis. *Infect. Dis. Clin. N. Am.* **2016**, *30*, 207–227. [[CrossRef](#)]
8. Sosa, E.J.; Burguener, G.; Lanzarotti, E.; Defelipe, L.; Radusky, L.; Pardo, A.M.; Marti, M.; Turjanski, A.G.; Fernández Do Porto, D. Target-Pathogen: A Structural Bioinformatic Approach to Prioritize Drug Targets in Pathogens. *Nucl. Acids Res.* **2018**, *46*, D413–D418. [[CrossRef](#)]
9. Mukherjee, S.; Kundu, I.; Askari, M.; Barai, R.S.; Venkatesh, K.V.; Idicula-Thomas, S. Exploring the Druggable Proteome of Candida Species through Comprehensive Computational Analysis. *Genomics* **2021**, *113*, 728–739. [[CrossRef](#)]
10. Palumbo, M.; Sosa, E.; Castello, F.; Schottlender, G.; Serral, F.; Turjanski, A.; Palomino, M.M.; do Porto, D.F. Integrating Diverse Layers of Omic Data to Identify Novel Drug Targets in *Listeria Monocytogenes*. *Front. Drug Discov.* **2022**, *2*, 969415. [[CrossRef](#)]
11. Ashburn, T.T.; Thor, K.B. Drug Repositioning: Identifying and Developing New Uses for Existing Drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3*, 673–683. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Pushpakom, S.; Iorio, F.; Eyers, P.A.; Escott, K.J.; Hopper, S.; Wells, A.; Doig, A.; Guilliams, T.; Latimer, J.; McNamee, C.; et al. Drug Repurposing: Progress, Challenges and Recommendations. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2018**, *18*, 41–58. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Xue, H.; Li, J.; Xie, H.; Wang, Y. Review of Drug Repositioning Approaches and Resources. *Int. J. Biol. Sci.* **2018**, *14*, 1232–1244. [[CrossRef](#)]
14. Jourdan, J.P.; Bureau, R.; Rochais, C.; Dallemagne, P. Drug Repositioning: A Brief Overview. *J. Pharm. Pharmacol.* **2020**, *72*, 1145–1151. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Vanhaelen, Q. *Computational Methods for Drug Repurposing*; Humana: New York, NY, USA, 2019; Volume 1903, ISBN 978-1-4939-8954-6.
16. Paul, D.; Sanap, G.; Shenoy, S.; Kalyane, D.; Kalia, K.; Tekade, R.K. Artificial Intelligence in Drug Discovery and Development. *Drug Discov. Today* **2021**, *26*, 80–93. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Peyclit, L.; Yousfi, H.; Rolain, J.M.; Bittar, F. Drug Repurposing in Medical Mycology: Identification of Compounds as Potential Antifungals to Overcome the Emergence of Multidrug-Resistant Fungi. *Pharmaceuticals* **2021**, *14*, 488. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Chavez-Dozal, A.A.; Lown, L.; Jahng, M.; Walraven, C.J.; Lee, S.A. In Vitro Analysis of Finasteride Activity against Candida Albicans Urinary Biofilm Formation and Filamentation. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, *58*, 5855–5862. [[CrossRef](#)]
19. Nasr Esfahani, A.; Golestannejad, Z.; Khozimeh, F.; Dehghan, P.; Maheronnaghsh, M.; Zarei, Z. Antifungal Effect of Atorvastatin against Candida Species in Comparison to Fluconazole and Nystatin. *Med. Pharm. Rep.* **2019**, *98*, 368–373. [[CrossRef](#)]
20. Didone, L.; Scrimale, T.; Baxter, B.K.; Krysan, D.J. A High-Throughput Assay of Yeast Cell Lysis for Drug Discovery and Genetic Analysis. *Nat. Protoc.* **2010**, *5*, 1107–1114. [[CrossRef](#)]
21. Butts, A.; DiDone, L.; Koselny, K.; Baxter, B.K.; Chabrier-Rosello, Y.; Wellington, M.; Krysan, D.J. A Repurposing Approach Identifies Off-Patent Drugs with Fungicidal Cryptococcal Activity, a Common Structural Chemotype, and Pharmacological Properties Relevant to the Treatment of Cryptococcosis. *Eukaryot. Cell* **2013**, *12*, 278–287. [[CrossRef](#)]
22. Kim, K.; Zilbermintz, L.; Martchenko, M. Repurposing FDA Approved Drugs against the Human Fungal Pathogen, Candida Albicans. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* **2015**, *14*, 32. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Wall, G.; Chaturvedi, A.K.; Wormley, F.L.; Wiederhold, N.P.; Patterson, H.P.; Patterson, T.F.; Lopez-Ribot, J.L. Screening a Repurposing Library for Inhibitors of Multidrug-Resistant Candida Auris Identifies Ebselen as a Repositionable Candidate for Antifungal Drug Development. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2018**, *62*, e01084-18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Miró-Canturri, A.; Ayerbe-Algaba, R.; Smani, Y. Drug Repurposing for the Treatment of Bacterial and Fungal Infections. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 41. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Pereira de Mello, T.; Nunes Silva, L.; de Souza Ramos, L.; Freire Frota, H.; Branquinha, M.H.; Sousa dos Santos, A.L. Drug Repurposing Strategy against Fungal Biofilms. *Curr. Top. Med. Chem.* **2020**, *20*, 509–516. [[CrossRef](#)]
26. Wall, G.; Lopez-Ribot, J.L. Screening Repurposing Libraries for Identification of Drugs with Novel Antifungal Activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2020**, *64*, e00924-20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Santos, R.; Ursu, O.; Gaulton, A.; Bento, A.P.; Donadi, R.S.; Bologa, C.G.; Karlsson, A.; Al-Lazikani, B.; Hersey, A.; Oprea, T.I.; et al. A Comprehensive Map of Molecular Drug Targets. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2016**, *16*, 19–34. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Berkes, C.; Franco, J.; Lawson, M.; Brann, K.; Mermelstein, J.; Laverty, D.; Connors, A. Kinase Inhibitor Library Screening Identifies the Cancer Therapeutic Sorafenib and Structurally Similar Compounds as Strong Inhibitors of the Fungal Pathogen *Histoplasma Capsulatum*. *Antibiotics* **2021**, *10*, 1223. [[CrossRef](#)]

29. Macreadie, I.G.; Johnson, G.; Schlosser, T.; Macreadie, P.I. Growth Inhibition of *Candida* Species and *Aspergillus Fumigatus* by Statins. *FEMS Microbiol. Lett.* **2006**, *262*, 9–13. [[CrossRef](#)]
30. Hao, W.; Qiao, D.; Han, Y.; Du, N.; Li, X.; Fan, Y.; Ge, X.; Zhang, H. Identification of Disulfiram as a Potential Antifungal Drug by Screening Small Molecular Libraries. *J. Infect. Chemother.* **2021**, *27*, 696–701. [[CrossRef](#)]
31. Antypenko, L.; Sadykova, Z.; Meyer, F.; Garbe, L.A.; Steffens, K. Tacrolimus as Antifungal Agent. *Acta Chim. Slov.* **2019**, *66*, 784–791. [[CrossRef](#)]
32. Tu, B.; Yin, G.; Li, H. Synergistic Effects of Vorinostat (SAHA) and Azoles against *Aspergillus* Species and Their Biofilms. *BMC Microbiol.* **2020**, *20*, 28. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Ohren, J.F.; Chen, H.; Pavlovsky, A.; Whitehead, C.; Zhang, E.; Kuffa, P.; Yan, C.; McConnell, P.; Spessard, C.; Banotai, C.; et al. Structures of Human MAP Kinase Kinase 1 (MEK1) and MEK2 Describe Novel Noncompetitive Kinase Inhibition. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2004**, *11*, 1192–1197. [[CrossRef](#)]
34. Han, J.; Liu, Y.; Yang, S.; Wu, X.; Li, H.; Wang, Q. MEK Inhibitors for the Treatment of Non-Small Cell Lung Cancer. *J. Hematol. Oncol.* **2021**, *14*, 1. [[CrossRef](#)]
35. Bechman, K.; Galloway, J.B.; Winthrop, K.L. Small-Molecule Protein Kinases Inhibitors and the Risk of Fungal Infections. *Curr. Fungal Infect. Rep.* **2019**, *13*, 229–243. [[CrossRef](#)]
36. Dong-mei, M.A.; Ya-juan, J.I.; Fang, Y.; Wei, L.I.U.; Zhe, W.A.N.; Ruo-yu, L.I. Effects of U0126 on Growth and Activation of Mitogen-Activated Protein Kinases in *Aspergillus Fumigatus*. *Chin. Med. J.* **2013**, *126*, 220–225. [[CrossRef](#)]
37. FAN, Y.; GU, S.; DONG, J.; DONG, B. Effects of MEK-Specific Inhibitor U0126 on the Conidial Germination, Appressorium Production, and Pathogenicity of *Setosphaeria Turcica*. *Agric. Sci. China* **2007**, *6*, 78–85. [[CrossRef](#)]
38. Singh, A.; Ruan, Y.; Tippett, T.; Narendran, A. Targeted Inhibition of MEK1 by Cobimetinib Leads to Differentiation and Apoptosis in Neuroblastoma Cells. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2015**, *34*, 104. [[CrossRef](#)]
39. Lee, K.W.; Kang, N.J.; Rogozin, E.A.; Kim, H.G.; Cho, Y.Y.; Bode, A.M.; Lee, H.J.; Surh, Y.J.; Bowden, G.T.; Dong, Z. Myricetin Is a Novel Natural Inhibitor of Neoplastic Cell Transformation and MEK1. *Carcinogenesis* **2007**, *28*, 1918–1927. [[CrossRef](#)]
40. Iverson, C.; Larson, G.; Lai, C.; Yeh, L.T.; Dadson, C.; Weingarten, P.; Appleby, T.; Vo, T.; Maderna, A.; Vernier, J.M.; et al. RDEA119/BAY 869766: A Potent, Selective, Allosteric Inhibitor of MEK1/2 for the Treatment of Cancer. *Cancer Res.* **2009**, *69*, 6839–6847. [[CrossRef](#)]
41. Salama, A.K.S.; Kim, K.B. Trametinib (GSK1120212) in the Treatment of Melanoma. *Expert Opin. Pharmacother.* **2013**, *14*, 619–627. [[CrossRef](#)]
42. Hatzivassiliou, G.; Haling, J.R.; Chen, H.; Song, K.; Price, S.; Heald, R.; Hewitt, J.F.M.; Zak, M.; Peck, A.; Orr, C.; et al. Mechanism of MEK Inhibition Determines Efficacy in Mutant KRAS- versus BRAF-Driven Cancers. *Nature* **2013**, *501*, 232–236. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Yeh, T.C.; Marsh, V.; Bernat, B.A.; Ballard, J.; Colwell, H.; Evans, R.J.; Parry, J.; Smith, D.; Brandhuber, B.J.; Gross, S.; et al. Biological Characterization of ARRY-142886 (AZD6244), a Potent, Highly Selective Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 1/2 Inhibitor. *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13*, 1576–1583. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Dong, Q.; Dougan, D.R.; Gong, X.; Halkowycz, P.; Jin, B.; Kanouni, T.; O’Connell, S.M.; Scorch, N.; Shi, L.; Wallace, M.B.; et al. Discovery of TAK-733, a Potent and Selective MEK Allosteric Site Inhibitor for the Treatment of Cancer. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 1315–1319. [[CrossRef](#)]
45. Wishart, D.S.; Knox, C.; Guo, A.C.; Shrivastava, S.; Hassanali, M.; Stothard, P.; Chang, Z.; Woolsey, J. DrugBank: A Comprehensive Resource for in Silico Drug Discovery and Exploration. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, D668–D672. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Bateman, A.; Martin, M.J.; Orchard, S.; Magrane, M.; Agivetova, R.; Ahmad, S.; Alpi, E.; Bowler-Barnett, E.H.; Britto, R.; Bursteinas, B.; et al. UniProt: The Universal Protein Knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Res.* **2021**, *49*, D480–D489. [[CrossRef](#)]
47. Bernstein, F.C.; Koetzle, T.F.; Williams, G.J.B.; Meyer, E.F.; Brice, M.D.; Rodgers, J.R.; Kennard, O.; Shimanouchi, T.; Tasumi, M. The Protein Data Bank: A Computer-Based Archival File for Macromolecular Structures. *J. Mol. Biol.* **1977**, *112*, 535–542. [[CrossRef](#)]
48. Moreno, E.; León, K. Geometric and Chemical Patterns of Interaction in Protein-Ligand Complexes and Their Application in Docking. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **2002**, *47*, 1–13. [[CrossRef](#)]
49. Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K. VMD: Visual Molecular Dynamics. *J. Mol. Graph.* **1996**, *14*, 33–38. [[CrossRef](#)]
50. Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W.; Lipman, D.J. Basic Local Alignment Search Tool. *J. Mol. Biol.* **1990**, *215*, 403–410. [[CrossRef](#)]
51. Waterhouse, A.; Bertoni, M.; Bienert, S.; Studer, G.; Tauriello, G.; Gumienny, R.; Heer, F.T.; de Beer, T.A.P.; Rempfer, C.; Bordoli, L.; et al. SWISS-MODEL: Homology Modelling of Protein Structures and Complexes. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, W296–W303. [[CrossRef](#)]
52. Tecle, H.; Shao, J.; Li, Y.; Kothe, M.; Kazmirski, S.; Penzotti, J.; Ding, Y.H.; Ohren, J.; Moshinsky, D.; Coli, R.; et al. Beyond the MEK-Pocket: Can Current MEK Kinase Inhibitors Be Utilized to Synthesize Novel Type III NCKIs? Does the MEK-Pocket Exist in Kinases Other than MEK? *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 226–229. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

53. Morris, G.M.; Ruth, H.; Lindstrom, W.; Sanner, M.F.; Belew, R.K.; Goodsell, D.S.; Olson, A.J. Software News and Updates AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. *J. Comput. Chem.* **2009**, *30*, 2785–2791. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Trott, O.; Olson, A.J. AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading. *J. Comput. Chem.* **2009**, *31*, 455–461. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Capítulo 3

Structure-guided drug repurposing identifies molecules with antifungal activity on *Histoplasma capsulatum*

Brief Report

**Structure-guided drug repurposing identifies molecules with antifungal activity on
*Histoplasma capsulatum***

Marcela Rubio-Carrasquilla, PhD (ORCID 0000-0001-7541-8370)^{1,2}

Johann E. Bedoya-Cardona, MSc (ORCID 0009-0008-1375-8925)¹

Mario S. Valdés-Tresanco, PhD (ORCID 0000-0002-1291-1587)¹

Yunier Serrano-Rivero, PhD (ORCID 0000-0003-1575-9530)¹

Ernesto Moreno, PhD (ORCID 0000-0002-2309-4826)^{1,*}

¹ Facultad de Ingenierías, Instituto de Ciencias Básicas, Universidad de Medellín, Medellín,
Colombia

² Universidad Nacional de Colombia, Sede Caribe, San Andrés Islas, Colombia

* Corresponding author: emoreno@udemedellin.edu.co

Abstract

Histoplasma capsulatum causes histoplasmosis, a potentially severe disease especially in immunocompromised patients. Current treatment options face limitations and increasing resistance. In this study we applied our previously developed structure-based strategy for protein target identification and drug repurposing to select 44 drugs targeting 37 different human proteins with active sites sharing over 60% amino acid identity with binding sites of one or more *H. capsulatum* proteins. None of the selected drugs had previous reports against this fungus. Fifteen compounds inhibited fungal growth with IC₅₀ values in the low micromolar range. Ten of these molecules were known to affect other fungi, while five inhibitory compounds—dronedarone, nintedanib, entrectinib, enasidenib, leflunomide—had no previous antifungal reports. These findings underscore the effectiveness of our structure-based approach for identifying novel potential therapeutic targets and repurposable compounds against fungi and other pathogens.

Keywords: *Histoplasma capsulatum*, new target prediction, drug repurposing, antifungal agents

Introduction

Histoplasma capsulatum is a globally distributed fungal pathogen that causes histoplasmosis, primarily affecting immunocompromised individuals [1,2]. Standard antifungal treatments, such as fluconazole and amphotericin B, are limited by toxicity, poor absorption, and rising resistance [3,4]. Drug repurposing offers a promising alternative; however, most efforts have focused on clinically significant genera like *Candida* and *Aspergillus* [5,6]. Only a limited number of studies have explored this approach for *H. capsulatum*, with examples including the use of kinase inhibitors such as sorafenib [7] and the immunosuppressant everolimus [8].

In a recent study, we introduced a computational, structure-based approach for drug repurposing and new drug development targeting infectious fungi and other eukaryotic pathogens. This approach is based on the assumption that a drug inhibiting a human protein is also likely to inhibit pathogen proteins carrying a structurally similar binding site, even if these proteins are not orthologs [9].

In this study, building on our previous findings, we selected 44 inhibitors of 37 human targets of FDA-approved drugs that share over 60% binding site amino acid identity with one or more *H. capsulatum* proteins and tested them in growth inhibition assays.

Materials and Methods

Following our previously developed strategy of protein target identification for drug repurposing [9], we selected human therapeutic targets whose active sites share over 60% amino acid identity with the binding sites of one or more *Histoplasma capsulatum* proteins. Because our approach is structure-based, all selected human targets have crystallographic structures in complex with one or more inhibitors in the Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org>). The DrugBank database was used to identify drugs and inhibitors targeting these human proteins. Structural models of the corresponding fungal proteins were generated using the SWISS-MODEL server (<https://swissmodel.expasy.org>). For each human-fungal protein pair, the corresponding structures were superimposed to compare their binding site topologies. Modeling analyses assessing the fit of various inhibitors within fungal binding sites were performed using the program VMD.

Growth inhibition assays were carried out on the wild-type *H. capsulatum* Panama strain G186A (ATCC 26029), as described in our previous work [9]. The maximum concentrations assayed were limited by the solubility of the compounds in dimethyl sulfoxide (DMSO) as specified by the manufacturer. half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) values were calculated by interpolation. Itraconazole was used as positive control.

Results and Discussion

Table 1 lists the selected compounds and summarizes the results of the growth inhibition assays. The tested compounds are grouped into four sets (see last column), based on their growth inhibition activity on *H. capsulatum* and a literature review of previously reported antifungal effects. Supplementary Table S1 contains additional information on the tested compounds and the identified human-*H. capsulatum* protein pairs, including the alignments

(structural equivalences) between binding site residues, and references to previous reports on antifungal activity for other fungi.

Table 1. *In vitro* results (IC₅₀ values) of the growth inhibition assays in *Histoplasma capsulatum*.

No .	Drug	Identified human target(s)	UniProt code	Predicted fungal target(s) (UniProt code)	Binding site identity (%)	IC ₅₀ (µM)	Set
1	dronedarone	Brain cyclic nucleotide-gated channel 1/2 (BCNG-1)/ BCNG-2	O60741/ Q9UL51	F0UKN4	80	3,9	1
2	nintedanib	Fibroblast growth factor receptor 3	P22607	F0UGV1, F0UUJ8	79	<9	
3	entrectinib	Neurotrophic receptor tyrosine kinase1 (NTRK1)	P04629	F0UL15	66	11	
		Neurotrophic receptor tyrosine kinase2 (NTRK2)	Q16620	F0USL5, F0UUJ8, F0U6B1	67		
		Janus kinase 2 (JAK-2)	O60674	FOUR08, F0UAT6, F0UP18	70		
	Tyrosine-protein kinase ROS1	P08922	F0UW59	67			
4	enasidenib	Mitochondrial isocitrate dehydrogenase (IDH2)	P48735	F0UJM9	54	20	
5	leflunomide	Dihydroorotate dehydrogenase	Q02127	F0UDX1	50	<23	
		Protein-tyrosine kinase 2-beta	Q14289	F0U6P0	76		
6	atovaquone	Dihydroorotate dehydrogenase	Q02127	F0UDX1	50	0,23	2
7	fluvastatin	HMG-CoA reductase	P04035	F0UKH1	97	0,3	
8	atorvastatin					<0,4	
9	mycophenolic acid	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2	P12268	F0UKI1	93	2,8	
10	vorinostat	Histone deacetylase 2 /Histone deacetylase 6	Q92769 / Q9UBN7	F0UKC3, F0UKK7, F0UVW7	100/ 87	7	
11	refametinib	Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 1 / 2 (MEK1/2)	Q02750 / P36507	F0UFI3, F0UAN5, F0U908	74	< 0,3	
12	cobimetinib					< 3,2	
13	myricetin					16	
14	GDC0623					47	
15	disulfiram	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	P05091	F0UNE9, F0U4T1, F0URE3	87	31	
16	pemetrexed	Thymidylate synthase	P04818	F0URV8	84	131	3
17	dexrazoxane	DNA topoisomerase 2-beta / DNA topoisomerase 2-alpha	Q02880 / P11388	F0UWA9	88	>373	
18	risedronate	Farnesyl pyrophosphate synthase	P14324	F0UP55	91	>262	
19	cholic acid	Ferrochelatase, mitochondrial	P22830	F0UF14	83	>245	
20	ribavirin	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2	P12268	F0UKI1	93	>410	

21	eflornithine	Ornithine decarboxylase	P11926	F0U9K9	100	>338	4
22	aliskiren	Renin	P00797	F0U899	64	>164	
23	carbidopa	Aromatic-L-amino-acid decarboxylase	P20711	F0UAU0, F0UHL5	86	>164	
24	larotrectinib	Neurotrophic receptor tyrosine kinase1 (NTRK1)	P04629	F0UL15	66	>233	
		Neurotrophic receptor tyrosine kinase2 (NTRK2)	Q16620	F0USL5, F0UUJ8, F0U6B1	67		
24	ivabradine	Brain cyclic nucleotide-gated channel 1/2 (BCNG-1)/ BCNG-2	O60741/ Q9UL51	F0UKN4	80	>198	
26	entacapone	Catechol O-methyltransferase	P21964	F0UET8	62	>655	
27	cilastatin	Dipeptidase 1	P16444	F0UPY1	75	>279	
28	podophyllotoxyn	DNA topoisomerase 2-alpha	P11388	F0UWA9	89	>241	
29	lenvatinib	Fibroblast growth factor receptor 3	P22607	F0UGV1, F0UUJ8	79	>234	
30	L-glutathione	Glutathione reductase	P00390	F0UFI2	100	>122	
31	bufexamac	Histone deacetylase 6	Q9UBN7	F0UKK7, F0UVW7	81	184	
32	azathioprine	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2	P12268	F0UKI1	93	>180	
33	baricitinib	Janus kinase 1 (JAK-1)	P23458	F0UW57, F0UR08, F0USL5	61	198	
33		Janus Kinase 2 (JAK-2)	O60674	F0UR08, F0UAT6, F0UP18	70		
33		Protein-tyrosine kinase 2-beta	Q14289	F0U6P0	76		
34	filgotinib	Janus kinase 1 (JAK-1)	P23458	F0UW57, F0UR08, F0USL5	64	>235	
35	tofacitinib	Janus kinase 1 (JAK-1)	P23458	F0UW57, F0UR08, F0USL5	64	>198	
35		Janus kinase 2 (JAK-2)	O60674	F0UR08, F0UAT6, F0UP18	70		
36	upadacitinib	Janus kinase 1 (JAK-1)	P23458	F0UW57, F0UR08, F0USL5	64	>263	
37	miglitol	Maltase-glucoamylase	O43451	F0UFH1	70	>386	
38	sacubitril	Neprilysin	P08473	F0UAA0	72	>232	
39	olaparib	Poly [ADP-ribose] polymerase 1	P09874	F0UEN3	86	>184	
40	rucaparib	Poly [ADP-ribose] polymerase 2	Q9UGN5	F0UEN3	83	233	
41	ellagic acid	Protein Kinase C alpha type	P17252	F0UE28, F0UP18, F0U6P0, F0U745, F0UBW5	84	>83	
42	paclitaxel	Tubulin beta-3 chain	Q13509	F0UCQ9, F0UQK5, F0U6N3, F0USZ5	100	>59	
43	dasatinib	Tyrosine-protein kinase Fyn	P06241	F0UAN5, F0UR08, F0UT49	79	>205	
44	febuxostat	Xanthine dehydrogenase/oxidase	P47989	F0UCF6	77	>253	

The first set consists of five molecules—dronedarone, nintedanib, entrectinib, enasidenib and leflunomide—that, to our knowledge, have not been previously reported to have antifungal activity but showed strong inhibitory effects against *H. capsulatum*, with IC₅₀ values in a low micromolecular range (IC₅₀ < 100 μM).

Dronedarone ($IC_{50} = 3.9 \mu M$) is an anti-arrhythmic drug that affects multiple ion channels, so its actual target(s) in *H. capsulatum* may differ from the one listed in Table 1. Notably, dronedarone should not be coadministered with antifungals like ketoconazole, which are strong inhibitors of cytochrome CYP3A4 [10]. Nintedanib ($IC_{50} < 9 \mu M$), used to treat non-small cell lung cancer and idiopathic pulmonary fibrosis, also binds to multiple proteins, including kinase domains of several growth factors. Similar to dronedarone, coadministration with ketoconazole increases nintedanib exposure [11].

Entrectinib ($IC_{50} = 11 \mu M$) is an inhibitor of the tyrosine-protein kinase ROS1 as well as proteins of the NTRK, ALK and JAK families. It is approved for the treatment of ROS1-, NTRK-, and ALK-positive solid tumors. In our analysis, we identified *H. capsulatum* proteins with binding sites similar to those of human NTRK1/2, JAK2, and ROS1. However, inhibitors of JAK2 (baricitinib and tofacitinib) and of NTRK1/2 (larotrectinib) showed no effect in our assays, suggesting that the fungal protein F0UW59 (unreviewed in the UniProt database), which shares 67% binding site amino acid identity with human ROS1, may be a target of entrectinib in *H. capsulatum*. This is further supported by our modeling studies (Figure 1).

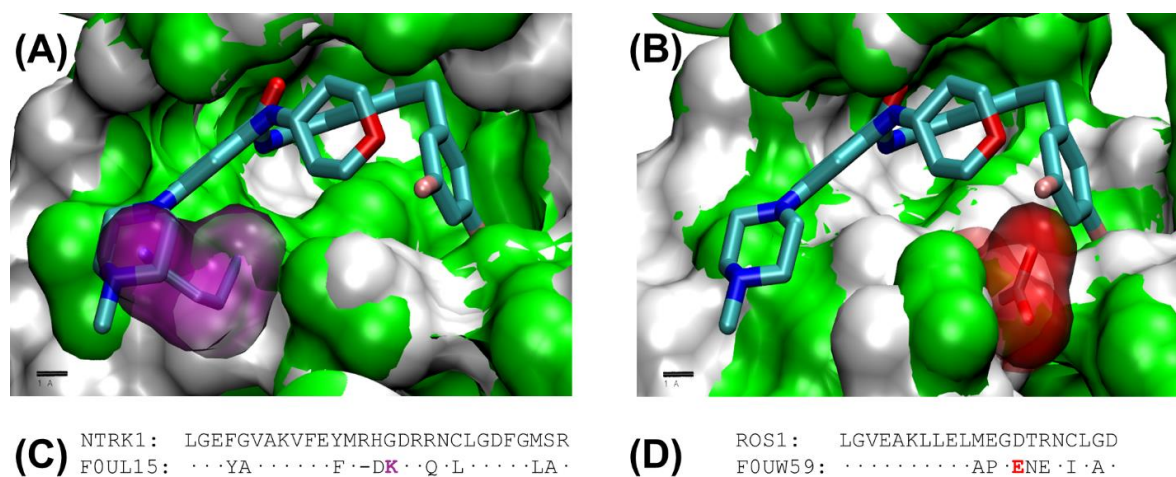


Figure 1. Structural analyses aimed to discern among possible targets of entrectinib in *Histoplasma capsulatum*. (A) Binding of entrectinib to the fungal protein F0UL15, the predicted counterpart of human NTRK1, is unlikely. Superposition of the crystal structure of NTRK1 bound to entrectinib (PDB entry: 5KVT; protein surface in white, inhibitor shown as thick sticks) with the modeled *H. capsulatum* protein F0UL15 (surface in green) reveals a similar binding pocket topology. However, a key substitution of glycine 595 with a bulky lysine residue in F0UL15 (highlighted in purple) causes significant steric hindrance, likely preventing ligand binding. (B) Possible binding of entrectinib to the fungal protein F0UW59, the predicted counterpart of the human proto-oncogene tyrosine-protein kinase ROS1. Superposition of the crystal structure of ROS1 (PDB: 4UXL; surface in white) with the modeled F0UW59 (surface in green) shows good overlap of most binding pocket residues. The conservative substitution of aspartic acid 2033 with glutamic acid in F0UW59 (highlighted in red) is unlikely to prevent entrectinib binding to the fungal protein. (C)

Alignment of binding pocket residues between human NTRK1 and fungal F0UL15, showing 66% amino acid identity. Identical residues are indicated by dots. (D) Alignment of binding site residues between ROS1 and F0UW59.

Enasidenib (IC₅₀ = 20 μM), used to treat acute myeloid leukemia, inhibits mitochondrial isocitrate dehydrogenase 2 (IDH2). Our analysis identified a single protein in the *H. capsulatum* proteome, F0UJM9, also annotated as isocitrate dehydrogenase. Although this result is due to identical NADPH cofactor binding sites, the enasidenib binding site in the human protein is located at a dimer interface and shares 54% amino acid identity with the corresponding site in the fungal protein.

Leflunomide (IC₅₀ < 23 μM) is an anti-inflammatory drug that primarily inhibits mitochondrial dihydroorotate dehydrogenase (DHODH), whose binding site aligns with that of the *H. capsulatum* protein F0UDX1 (see Table 1). Leflunomide and atovaquone bind to the same site in the human protein, which shares 50% amino acid identity with the corresponding site in the fungal protein. Leflunomide is also a tyrosine kinase inhibitor that binds to protein-tyrosine kinase 2-beta (Q14289) [12], whose binding site is highly similar to those of several *H. capsulatum* proteins, such as F0U6P0 (Table 1, 76% conservation).

The second set in Table 1 comprises 10 compounds with documented antifungal effects in other fungi (see Table S1) that also demonstrated marked activity (IC₅₀ < 100 μM) against *H. capsulatum*. This set includes atorvastatin and fluvastatin [13], mycophenolic acid [14], disulfiram [15], atovaquone [16], and vorinostat, which has been reported to act synergistically with azoles against *Aspergillus* [17]. In addition, we retested myricetin, cobimetinib, GDC0623, and refametinib, which were evaluated in our previous study [9].

The third set includes seven compounds previously reported to inhibit other fungi (data in Table S1) but that showed weak or no inhibitory effect on *H. capsulatum* in this study: pemetrexed [18]; ribavirin, which inhibits several *Candida* species [19]; aliskiren [20] and cholic acid [21], which inhibit *Candida albicans*; dexrazoxane, which affects *Nematocida parisii* [22]; eflornithine, which inhibits *Aspergillus fumigatus* [23]; and risedronate, which has antifungal effects on *Cryptococcus* strains [24].

Finally, the fourth set (22 compounds) comprises molecules with no previously reported antifungal effects that either showed no activity against *H. capsulatum* at the highest tested concentration or had effect only at a high concentration, such as baricitinib, bufexamac, and rucaparib, which exhibited inhibitory effects only at concentrations above 180 μM.

Data in Table 1 show that antifungal activity does not correlate with binding site amino acid identity between human targets and their predicted fungal counterparts. In some cases, a single mutation in the fungal protein binding site may prevent inhibitor binding, while multiple conservative mutations may have little impact. It is also possible that some of these drugs exert their effects by binding to proteins other than those predicted in our study.

For several compounds in sets three and four—such as risedronate, ribavirin, eflornithine, L-glutathione, and podophyllotoxin—that showed no growth inhibition in *H. capsulatum*,

binding site conservation is very high (90–100%) with few, mostly conservative or absent differences, suggesting that inhibitor binding to the fungal protein is likely. However, chemical inhibition of a fungal protein's function may not be sufficient to cause cytotoxicity due to redundant metabolic pathways and other resistance mechanisms [25].

Overall, 15 of the 44 tested drugs (34%) inhibited the growth of *H. capsulatum*, with IC50 values in the low micromolar range. Five of these compounds (11%) had not previously been tested for antifungal activity, while 10 of the 17 drugs shown to affect other fungi also inhibited *H. capsulatum* growth. These results underscore the value of our structure-based approach for identifying potential new therapeutic targets in fungi and other pathogens. Such target predictions can guide the selection of approved drugs and compounds in various stages of clinical and preclinical development for drug repurposing. Ultimately, they may also facilitate the discovery of new, more specific inhibitors against pathogen targets.

Funding

This study was supported by the University of Medellín, Medellín, Colombia

Transparency declarations

The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Dao A, Kim HY, Halliday CL, Oladele R, Rickerts V, Govender MMed NP, et al. Histoplasmosis: A systematic review to inform the World Health Organization of a fungal priority pathogens list. *Med Mycol* [Internet]. Oxford Academic; 2024; 62. <https://doi.org/10.1093/MMY/MYAE039>
2. Wheat LJ, Azar MM, Bahr NC, Spec A, Relich RF, Hage C. Histoplasmosis. *Infect Dis Clin North Am*. W.B. Saunders; 2016. p. 207–27. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2015.10.009>
3. Man MA, Todea DA, Motoc N Ștefania, Rajnovceanu R-M. Histoplasmosis: An Overview Treatment of Histoplasmosis. In: Dantes E, Dumea E, editors. *Histoplasmosis* [Internet]. Rijeka: IntechOpen; 2023. p. Ch. 6. <https://doi.org/10.5772/intechopen.110365>
4. Wheat LJ, Freifeld AG, Kleiman MB, Baddley JW, McKinsey DS, Loyd JE, et al. Clinical practice guidelines for the management of patients with histoplasmosis: 2007 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*. 2007. p. 807–25. <https://doi.org/10.1086/521259>
5. Zhang Q, Liu F, Zeng M, Mao Y, Song Z. Drug repurposing strategies in the development of potential antifungal agents. *Appl Microbiol Biotechnol*. Applied Microbiology and Biotechnology; 2021;105:5259–79. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11407-7>
6. Gintjee TJ, Donnelley MA, Thompson GR. Aspiring Antifungals: Review of Current Antifungal Pipeline Developments. *Journal of Fungi*. 2020;6:28. <https://doi.org/10.3390/jof6010028>

7. Berkes C, Franco J, Lawson M, Brann K, Mermelstein J, Lavery D, et al. Kinase inhibitor library screening identifies the cancer therapeutic sorafenib and structurally similar compounds as strong inhibitors of the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. *Antibiotics*. MDPI; 2021;10. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10101223>
8. Santos AS, Borges dos Anjos LR, Costa VAF, Freitas VAQ, Zara AL de SA, Costa CR, et al. In silico-chemogenomic repurposing of new chemical scaffolds for histoplasmosis treatment. *Journal of Medical Mycology*. Elsevier Masson s.r.l.; 2023;33. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2023.101363>
9. Bedoya-Cardona JE, Rubio-Carrasquilla M, Ramírez-Velásquez IM, Valdés-Tresanco MS, Moreno E. Identifying Potential Molecular Targets in Fungi Based on (Dis)Similarities in Binding Site Architecture with Proteins of the Human Pharmacolome. *Molecules* [Internet]. 2023;28:692. <https://doi.org/10.3390/molecules28020692>
10. Patel C, Yan G-X, Kowey PR. Dronedarone. 2009; <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.858027>
11. Wind S, Schmid U, Freiwald M, Marzin K, Lotz R, Ebner T, et al. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Nintedanib. *Clin Pharmacokinet* [Internet]. 2019 [cited 2025 Sep 9];58:1131–47. <https://doi.org/10.1007/s40262-019-00766-0>
12. Fukushima R, Kanamori S, Hirashiba M, Hishikawa A, Muranaka R ich, Kaneto M, et al. Teratogenicity study of the dihydroorotate-dehydrogenase inhibitor and protein tyrosine kinase inhibitor Leflunomide in mice. *Reproductive Toxicology*. 2007;24:310–6. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2007.05.006>
13. Lima WG, Alves-Nascimento LA, Andrade JT, Vieira L, de Azambuja Ribeiro RIM, Thomé RG, et al. Are the Statins promising antifungal agents against invasive candidiasis? *Biomedicine and Pharmacotherapy*. Elsevier Masson SAS; 2019;111:270–81. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.12.076>
14. NOTO T, SAWADA M, ANDO K, KOYAMA K. SOME BIOLOGICAL PROPERTIES OF MYCOPHENOLIC ACID. *J Antibiot (Tokyo)* [Internet]. 1969;22:165–9. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.22.165>
15. Hao W, Qiao D, Han Y, Du N, Li X, Fan Y, et al. Identification of disulfiram as a potential antifungal drug by screening small molecular libraries. *Journal of Infection and Chemotherapy*. Elsevier B.V.; 2021;27:696–701. <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2020.12.012>
16. Clark HL, Minns MS, Sun Y, de Jesus T, Ghannoum MG, Pearlman E. Atovaquone Impairs Growth of *Aspergillus* and *Fusarium* Keratitis Isolates by Modulating Mitochondrial Function and Zinc Homeostasis. *Immunology and Microbiology* [Internet]. 2018; <https://doi.org/10.1167/iavs.17-22585>
17. Tu B, Yin G, Li H. Synergistic effects of vorinostat (SAHA) and azoles against *Aspergillus* species and their biofilms. *BMC Microbiol*. 2020;20:28. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-1718-x>

18. DeJarnette C, Luna-Tapia A, Estredge LR, Palmer GE. Dihydrofolate Reductase Is a Valid Target for Antifungal Development in the Human Pathogen *Candida albicans* . mSphere. American Society for Microbiology; 2020;5. <https://doi.org/10.1128/msphere.00374-20>
19. Yousfi H, Cassagne C, Ranque S, Rolain JM, Bittar F. Repurposing of ribavirin as an adjunct therapy against invasive *Candida strains* in an *in vitro* study. Antimicrob Agents Chemother. American Society for Microbiology; 2019;63. <https://doi.org/10.1128/AAC.00263-19>
20. Kathwate GH, Karuppayil SM. Antifungal properties of the anti-hypertensive drug: Aliskiren. Arch Oral Biol. Elsevier Ltd; 2013;58:1109–15. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2013.02.006>
21. Kong W, Wang J, Xing X, Xiao X, Zhao Y, Zang Q, et al. Antifungal evaluation of cholic acid and its derivatives on *Candida albicans* by microcalorimetry and chemometrics. Anal Chim Acta. 2011;689:250–6. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.01.050>
22. Murareanu BM, Antao N V., Zhao W, Dubuffet A, El Alaoui H, Knox J, et al. High-throughput small molecule screen identifies inhibitors of microsporidia invasion and proliferation in *C. elegans*. Nat Commun. Nature Research; 2022;13. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-33400-y>
23. Pfister J, Petrik M, Bendova K, Matuszczak B, Binder U, Misslinger M, et al. Antifungal Siderophore Conjugates for Theranostic Applications in Invasive Pulmonary Aspergillosis Using Low-Molecular TAFC Scaffolds. J Fungi [Internet]. 2021;7:558. <https://doi.org/10.3390/jof7070558>
24. Kane A, Campbell L, Ky D, Hibbs D, Carter D. The antifungal and synergistic effect of bisphosphonates in cryptococcus. Antimicrob Agents Chemother [Internet]. American Society for Microbiology; 2021 [cited 2025 Mar 19];65. <https://doi.org/10.1128/AAC.01753-20/FORMAT/EPUB>
25. Peyclit L, Yousfi H, Rolain JM, Bittar F. Drug repurposing in medical mycology: Identification of compounds as potential antifungals to overcome the emergence of multidrug-resistant fungi. Pharmaceuticals. 2021;14. <https://doi.org/10.3390/ph14050488>

Capítulo 4

Identificación de compuestos con efecto antifúngico mediante cribado virtual dirigido a proteínas en *Histoplasma capsulatum* y *Fusarium oxysporum* con sitios activos similares al de MEK1 humana

Identificación de compuestos con efecto antifúngico mediante cribado virtual dirigido a proteínas en *Histoplasma capsulatum* y *Fusarium oxysporum* con sitios activos similares al de MEK1 humana

Johann E. Bedoya-Cardona, MSc (ORCID 0009-0008-1375-8925)¹

Marcela Rubio-Carrasquilla, PhD (ORCID 0000-0001-7541-8370)^{1,2}

Mario S. Valdés-Tresanco, PhD (ORCID 0000-0002-1291-1587)¹

Ernesto Moreno, PhD (ORCID 0000-0002-2309-4826)^{1, *}

¹ Facultad de Ingenierías, Instituto de Ciencias Básicas, Universidad de Medellín, Medellín, Colombia

² Universidad Nacional de Colombia, Sede Caribe, San Andrés Islas, Colombia

* Autor de correspondencia: emoreno@udemedellin.edu.co

Resumen

Las infecciones fúngicas invasivas (IFI) se consideran altamente problemáticas para la salud humana y se ven agravadas por el aumento en la resistencia a los tratamientos actuales, lo que hace necesario ampliar el repertorio de alternativas de tratamiento, tanto desde la caracterización de nuevos blancos de acción como de inhibidores específicos.

De acuerdo con este panorama, siguiendo una estrategia propia de búsqueda de nuevos blancos terapéuticos y compuestos antifúngicos, identificamos varias proteínas fúngicas con sitios activos muy similares al sitio de la enzima MEK1 humana (quinasa activada por mitógeno 1), y nuestro grupo demostró que varios inhibidores de la proteína MEK1 humana inhiben el crecimiento de diferentes hongos patógenos, entre ellos *Histoplasma capsulatum* y *Fusarium oxysporum*. Por otro lado, las pocas diferencias entre los sitios activos de las proteínas fúngicas identificadas y la MEK1 humana podrían ser explotadas en el diseño e identificación de compuestos más selectivos por las proteínas de hongo.

En este trabajo usamos cribado virtual para identificar posibles inhibidores específicos de proteínas ortólogas a MEK1 en *H. capsulatum* y *F. oxysporum*, con el fin de evaluar el potencial de dichas proteínas como blancos moleculares, y encontrar compuestos líderes en la búsqueda de nuevos antifúngicos. La estrategia empleada incluyó análisis de secuencias, modelado estructural, cribado virtual y experimentos *in vitro* de inhibición del crecimiento, en cultivos de estos hongos y líneas celulares humanas.

De diez compuestos probados experimentalmente, cinco inhibieron a *H. capsulatum* y tres a *F. oxysporum*. En especial los compuestos UVI 3003 y OGT-IN-2 presentaron selectividad por *H. capsulatum* y podrían servir como compuestos líderes en estudios futuros, así como las proteínas ortólogas identificadas pueden ser potenciales blancos moleculares.

Palabras clave: MAPK, Cribado virtual, antifúngicos, *Histoplasma capsulatum*, *Fusarium oxysporum*.

Introducción

El impacto de las infecciones fúngicas a nivel global se ha vuelto más evidente en las últimas décadas a medida que existen mejores métodos de documentación y diagnóstico. Estas enfermedades representan un problema para la salud humana que se agrava debido a factores como el cambio climático y el aumento de la resistencia a los tratamientos antifúngicos disponibles (Becher & Wirsal, 2012; Lockhart et al., 2023; Seidel et al., 2024).

En este contexto, para el año 2021 se reportaron 1.73 mil millones de infecciones micóticas cutáneas, las cuales son las más frecuentes (Li et al., 2025). En este caso, la inmensa mayoría de estas infecciones no representan un riesgo para la salud humana, pero resaltan la magnitud de esta problemática, que es especialmente grave en el caso de las infecciones fúngicas invasivas (IFI). De acuerdo con estimados del 2024, estas infecciones afectan anualmente a más de 6.5 millones de personas y se les puede atribuir como causa de muerte directa en más de 2.5 millones de casos (Denning, 2024).

Uno de los retos más importantes en el tratamiento de este tipo de infecciones es la limitada cantidad de opciones terapéuticas disponibles, las cuales pueden presentar efectos secundarios adversos, baja tasa de absorción y el surgimiento de mecanismos de resistencia, todo lo cual limita enormemente las opciones de tratamiento para muchos pacientes (Albataineh et al., 2016; Pagano & Fernández, 2025).

Conscientes de este panorama, nuestro grupo de investigación propuso una estrategia computacional para la identificación de proteínas blanco en hongos, a partir de datos estructurales de los sitios activos de proteínas humanas que son blanco de fármacos aprobados por la FDA (Food and Drug Administration, Estados Unidos) (Bedoya-Cardona et al., 2023). Usando esta estrategia identificamos decenas de proteínas fúngicas en varios hongos patógenos con un alto grado de similitud de sus sitios activos con proteínas humanas, y como caso de estudio experimental tomamos inhibidores específicos de las proteínas MEK1 y MEK2, y observamos que varios de estos compuestos inhiben el crecimiento de diferentes hongos patógenos, entre ellos *Histoplasma capsulatum* y *Fusarium oxysporum*.

Estos resultados nos permitieron considerar estos ortólogos de las proteínas MEK1 y MEK2 como posibles blancos de acción en el tratamiento de infecciones micóticas, debido al rol de estas proteínas en la señalización celular, y a su alto grado de conservación en organismos eucariotas.

De manera general, las vías de señalización MAPK (Mitogen-activated protein kinase) son de los mecanismos de transducción de señales más conservados y esenciales en eucariotas y son fundamentales en la regulación de múltiples procesos como la proliferación, diferenciación, y muerte celular (Avruch, 2007; Morrison, 2012; Plotnikov et al., 2011; Robinson & Cobb, 1997). De forma simplificada estas vías tienen una estructura de tipo Estímulo→MAP3K→MAP2K→MAPK→respuesta, y comprenden una cascada de eventos que regulan genes que afectan a múltiples procesos celulares.

Una de estas vías de señalización es la MAPK/ERK (Extracellular signal-Regulated Kinase), de la cual hacen parte las proteínas MEK1 y MEK2, también conocidas como MAP2K1 y MAP2K2 (Mitogen-Activated Protein Kinase 1/2), que son responsables de la fosforilación y activación de dos quinasas MAPK conocidas como ERK1/2 (Extracellular Signal-Regulated Kinases 1 y 2), y sirven como un nodo en esta cascada de señalización dado que canalizan la respuesta de múltiples proteínas de tipo RAS y RAF (Avruch, 2007; Cuevas et al., 2007; X. Liu et al., 2004).

Dado que la vía MAPK/ERK es relevante en la proliferación celular y que la hiperactivación de las vías MAPK puede contribuir al desarrollo y crecimiento de tumores (Caunt et al., 2015), las proteínas MEK1/2 se han convertido en blancos terapéuticos importantes en el tratamiento del cáncer. Así, se han desarrollado inhibidores específicos de estas proteínas, tales como refametinib, cobimetinib y trametinib, que se utilizan en la práctica clínica como parte de terapias dirigidas a ciertos tipos de cáncer como el colorrectal, el melanoma y el cáncer pulmonar de células no pequeñas (Alzahrani et al., 2022; Iverson et al., 2009; Lee et al., 2007; Singh et al., 2015; Yamaguchi et al., 2011; Yang et al., 2018).

De manera análoga, estas vías de señalización también regulan funciones clave en hongos (González-Rubio et al., 2019) y se han documentado en especies de interés clínico e industrial como *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans* (Chen & Thorner, 2007; Martínez-Soto & Ruiz-Herrera, 2017; Xu, 2000).

Uno de los procesos regulados por estas rutas es la patogenicidad fúngica (Zhao et al., 2007), lo cual es relevante dado el impacto de las infecciones fúngicas en distintos sectores. En agricultura, los hongos representan una de las amenazas bióticas más importantes para la seguridad alimentaria global (Steinberg & Gurr, 2020), mientras que a nivel clínico se estima que causan más de 1.5 millones de muertes anuales (World Health Organization, 2022).

La inhibición de algunas de estas vías de señalización ha sido estudiada en hongos, si bien de manera limitada y solo en algunos organismos modelo como el hongo patógeno *Candida albicans* (Park et al., 2021). Además se ha demostrado que es posible inhibir el crecimiento de hongos usando inhibidores de proteínas MAPK, como en el caso del hongo *Fusarium graminearum* el cual afecta diferentes cultivos como el trigo, la cebada y el maíz, en el que se ha observado que el ácido 2,4-diclorofenoxiacético tiene un efecto inhibitorio en la proteína Gpmk1 (código UniProt Q8T619), que es una proteína de tipo MAPK (Hou et al., 2002), la cual hace parte de la vía de señalización GPM (Duan et al., 2023; Segorbe et al., 2017).

Nuestros resultados anteriores mostraron que diferentes inhibidores específicos de las proteínas MEK1/2 inhiben el crecimiento *in vitro* de varios hongos patógenos, especialmente el fármaco cobimetinib, que tuvo efecto antifúngico en *H. capsulatum*, *F. oxysporum*, *C. neoformans*, y *A. fumigatus* (Bedoya-Cardona et al., 2023).

En este contexto, las proteínas MAPK fúngicas se perfilan como potenciales blancos terapéuticos contra estos patógenos. La identificación de inhibidores específicos de estas proteínas representa un reto técnico que puede abordarse mediante metodologías

complementarias, tanto experimentales como computacionales (Niño-Vega et al., 2024; Vassilopoulos & Mylonakis, 2022).

Una de estas metodologías de identificación de compuestos es el cribado virtual, el cual consiste en la evaluación mediante acoplamiento molecular de la afinidad de múltiples compuestos (bibliotecas) por el sitio activo de una proteína, y que tiene la ventaja de permitir acotar la cantidad de compuestos a probar experimentalmente, permitiendo reducir tiempo y recursos, y ya se ha usado en la búsqueda de compuestos antifúngicos (Berne et al., 2012; Kontoyianni, 2017; Tripathi & Khan, 2018).

Teniendo en cuenta estos antecedentes y nuestros resultados previos con *Histoplasma capsulatum* y *Fusarium oxysporum*, en este trabajo nos planteamos identificar potenciales inhibidores de proteínas de estos dos hongos que compartan un sitio activo similar con MEK1 humana, y evaluar *in vitro* el efecto antifúngico de estos compuestos, así como su efecto citotóxico en líneas celulares humanas.

Entre los 10 compuestos ensayados experimentalmente, tres tuvieron efecto contra *F. oxysporum*, y cinco contra *H. capsulatum*. Entre estos últimos, dos compuestos mostraron mayor efecto citotóxico en el hongo. En esta etapa de investigación no podemos asegurar que la inhibición del crecimiento fúngico se dio por interacción directa con los ortólogos de MEK1, pero estos resultados sirven como punto de partida para estudios posteriores direccionados a la identificación de blancos específicos de potenciales inhibidores y además profundizar la investigación de las proteínas ortólogas obtenidas.

Finalmente, el enfoque usado en este estudio constituye una estrategia sólida y replicable que se puede implementar en la identificación inicial de blancos e inhibidores selectivos de hongos patógenos, con aplicaciones potenciales tanto en el ámbito clínico como en el agroindustrial.

Metodología

Identificación de las proteínas blanco en hongos y modelado por homología

Las proteínas MEK1 y MEK2 poseen un bolsillo de unión doble que consta de dos regiones conexas, que corresponden a una región de unión al ATP, la cual además incluye un ión Mg^{+2} que sirve como catalizador, y otra región a la cual se unen inhibidores específicos, no competitivos por el ATP. Varios de estos inhibidores han sido aprobados como fármacos para su uso en diferentes tipos de cáncer (Ohren et al., 2004; Teclé et al., 2009). Según nuestro trabajo previo, este bolsillo doble lo moldean un total de 53 residuos incluidos en la región entre los aminoácidos 74 y 219. La región no competitiva del sitio de unión de MEK1 está comprendida entre los residuos 78 y 219, y estructuralmente incluye 23 residuos, algunos de los cuales forman parte también de la región de unión al ATP. Además, estos 23 aminoácidos son idénticos entre MEK1 y MEK2 (Bedoya-Cardona et al., 2023).

Con el fin de identificar proteínas fúngicas con sitios activos similares al sitio no competitivo de MEK1 humana, la región 78-219 de esta proteína fue utilizada como secuencia de partida para realizar una búsqueda de secuencias similares en proteomas de referencia de

Histoplasma capsulatum (UP000008142) y *Fusarium oxysporum* (UP000009097), usando el programa BLAST (Altschul et al., 1990) de manera local. Tomando como base los alineamientos producidos por BLAST, se calculó el porcentaje de conservación (identidad de aminoácidos) de los 23 residuos del sitio no competitivo, para las proteínas con mayor similitud.

Debido a que no existen modelos cristalográficos de estas proteínas fúngicas recurrimos a crear modelos 3D por homología a partir de estructuras cristalográficas de MEK1, utilizando el servidor web SwissModel (Waterhouse et al., 2018). Para identificar un molde apropiado, se alinearon múltiples complejos de MEK1 disponibles en el PDB, usando los visualizadores VMD (Humphrey et al., 1996) y PyMol (Schrödinger LLC, 2015). Se descartaron las estructuras con AA faltantes en la región no competitiva, y entre las restantes se seleccionó una con orientación representativa de los complejos proteína-ligando.

En el caso de la proteína fúngica se seleccionó una proteína de cada hongo con el mayor porcentaje de identidad de aminoácidos en el sitio no competitivo. Los modelos construidos sirvieron como base para el análisis por cribado virtual descrito en la siguiente sección.

Cribado virtual

Para este estudio se seleccionaron dos bibliotecas de compuestos bioactivos disponibles comercialmente: 1) la base de datos de compuestos de Cayman Chemicals con alrededor de 18,000 moléculas, y 2) la base de datos de compuestos bioactivos de MedChem Express, con > 14,000 estructuras.

Ambas bibliotecas fueron procesadas a partir de sus archivos SDF (Spatial Data File), usando los paquetes de software RDKit (Open-source cheminformatics, <https://www.rdkit.org>) para generar las coordenadas 2D, MolKit para obtener los modelos 3D. Posteriormente, utilizando scripts incluidos en Auto Dock Tools (Morris et al., 2009), se procesó cada molécula para generar los archivos en formato PDBQT que sirven de entrada al programa de acoplamiento molecular. En total se prepararon 32,038 compuestos.

El cribado virtual se realizó con AutoDock Vina (Trott & Olson, 2009), usando una exhaustividad de 8, y seleccionando dos poses por cada complejo. Todos los compuestos fueron evaluados contra las dos proteínas modeladas, en las cuales se incluyó una molécula de ATP y el ion magnesio (Mg^{2+}) en su sitio catalítico. Como medida de comparación y control del cribado virtual y la distribución espacial de los compuestos, se realizó otro cribado de estas bibliotecas contra el sitio no competitivo de la MEK1 humana.

Finalmente, los resultados fueron procesados para obtener los puntajes asignados por Vina de afinidad de las moléculas con cada proteína, adicionalmente se tuvieron en cuenta parámetros como valores mínimos de puntaje (Docking score), comparativos entre los resultados del docking con cada proteína fúngica y la humana, también se tuvo en cuenta la distancia a un residuo específico del bolsillo de unión. Los complejos que superaron estos criterios se inspeccionaron visualmente más detalladamente, con el fin de seleccionar un conjunto limitado de moléculas para su evaluación experimental *in vitro*.

Ensayos *in vitro*

Cultivos celulares

Para los ensayos de inhibición con *H. capsulatum* se usó la cepa silvestre Panamá G186A (ATCC 26029), tanto el crecimiento como la preparación de las levaduras se hizo siguiendo el método sugerido por Guimarães et al, (Guimarães et al., 2011). Se establecieron 300.000 levaduras por pozo, las cuales fueron expuestas a diferentes concentraciones de los compuestos con diluciones 1:2 entre ellas, haciendo el cultivo en medio HAMF12 durante 5 o 6 días manteniendo condiciones de 37°C y 150 rpm. Al cultivo se le adicionó SDS al 0.002% para ayudar a la solubilidad del compuesto y la viabilidad celular se evaluó con el reactivo XTT.

En el caso de *Fusarium oxysporum* se cultivaron aproximadamente 40.000 conidias por pozo (las cuales se obtuvieron de la superficie de colonias del hongo removiendo con un asa desechable estéril en medio RPMI 1640 líquido y luego haciéndolas pasar por lana de vidrio empacada en una jeringa de vidrio de 50 ml), El cultivo se hizo en medio RPMI 1640 con 2% de glucosa durante 48h manteniendo condiciones de 37°C y 150 rpm. Al cultivo se adicionó SDS al 0.002% para ayudar a la solubilidad del compuesto y la viabilidad celular se evaluó con el reactivo XTT.

Para las líneas celulares humanas A431, derivadas de un carcinoma epidermoide (Stoscheck & Carpenter, 1983), y HEK293A, derivadas de riñón embrionario humano (Stepanenko & Dmitrenko, 2015), se realizó un cultivo primario en frascos T25 en medio DMEM suplementado con 5% de suero fetal bovino. Luego se realizó un cultivo adicional que consistió en un descarte inicial del medio seguido de un lavado con 5 ml de buffer verseno para eliminar residuos de suero, seguido de la adición de 500 µL tripsina y una incubación de 2–5 minutos a 37 °C para desprender las células. Posteriormente la reacción enzimática fue neutralizada con 2 ml de medio de cultivo, luego las células fueron resuspendidas mediante pipeteos sucesivos y transferidas a tubos Falcon de 15 ml y centrifugadas a 800 rpm durante 3 minutos. El pellet celular se reconstituyó en medio fresco, ajustando el volumen según el tamaño del sedimento. Para la cuantificación, se mezclaron 30 µL de suspensión celular con 30 µL de azul de tripán (1:1 v/v), se depositaron 10 µL en cámara de Neubauer y se realizó el conteo en los cuatro cuadrantes periféricos. La concentración celular se calculó mediante la fórmula.

$$\frac{\text{Células}}{\text{ml}} = \underline{X} \times 10^4 \times 2$$

donde X es el valor promedio del conteo de células en los 4 cuadrantes, 10^4 es la constante de la cámara, y 2 corresponde al factor de dilución.

Finalmente se agregaron aproximadamente 2,500 células por pozo en 100 uL de medio de cultivo en placas de 96 pozos, y se incubaron por 24 horas a 37°C, en atmósfera con 5% de CO₂ y 95% de O₂.

Ensayo de inhibición de crecimiento con los compuestos

El efecto antifúngico (inhibición de crecimiento celular) *in vitro* se evaluó frente a un total de 10 compuestos. Se utilizó itraconazol como control para los hongos, preparado según el estándar de referencia CLSI M27-A4 (Alexander, 2017), con algunas modificaciones específicas para *H. capsulatum*.

Las soluciones madre de cada compuesto se prepararon a una concentración 100 veces superior a la mayor concentración evaluada, disolviéndose en DMSO, PBS o metanol según las instrucciones del fabricante. Se incluyeron controles con 1 % de DMSO en cada microplaca para todos los ensayos.

Para determinar la concentración inhibitoria 50 % (IC₅₀), se preparó una serie de diluciones dobles con 4 o 5 concentraciones distintas de cada inhibidor en el medio de cultivo de cada organismo, asegurando una concentración final de DMSO máximo al 1% y SDS al 0.002%.

Para el caso de los hongos se agregaron 50 µl de solución con fármaco a pocillos en U de una microplaca de 96 pocillos, que contenían 50 µl de suspensión de hongos de acuerdo con las condiciones de cultivo. En el caso de las líneas celulares primero se lavaron las células fijadas y se agregaron 50 µl de medio fresco y 50 µl de solución con fármaco y se incubaron por 24 horas.

Determinación de viabilidad fúngica mediante ensayo colorimétrico

La evaluación de la viabilidad celular en el caso de los hongos se realizó usando la reducción del reactivo XTT en naranja de formazan (Kamiloglu et al., 2020), el cual es proporcional a la cantidad de células viables. Se agregaron 10 µl de este compuesto a cada pozo para alcanzar una concentración de 0.3 mg/ml del XTT, incubando durante 4 horas a 37 °C y 150 rpm. La absorbancia se midió a 490 nm en un lector de microplacas.

Para el caso de las líneas celulares se la viabilidad celular se midió a través de un ensayo con sulforodamina (SRB) (Kamiloglu et al., 2020); posterior a la incubación de las células con los compuestos de interés, los pozos se lavaron y posteriormente se agregaron 100 µl de solución 0.4% de sulforodamina durante 30 minutos, luego se lavó sucesivamente con ácido acético al 1%, y se agregaron 100 µl de tampón Tris 10mM (pH 10.5) para solubilizar el colorante, se agitó durante 30 min a 55 rpm y finalmente se leyó la absorbancia a una densidad óptica de 450 nm en un lector de placas.

Cálculo del porcentaje de inhibición.

El porcentaje de inhibición del crecimiento (%inhibición) se calculó a partir de los ensayos colorimétricos, utilizando los valores promedio de 2 o 3 réplicas experimentales, según la siguiente fórmula:

$$\% inh = 1 - \frac{(DO_{muestra})}{(DDO_{control\ DMSO_SDS})} \times 100$$

El valor de IC₅₀ se determinó mediante interpolación lineal entre las dos concentraciones consecutivas del fármaco que generaron valores por encima y por debajo del 50 % de inhibición del crecimiento fúngico, en comparación con el control sin fármaco.

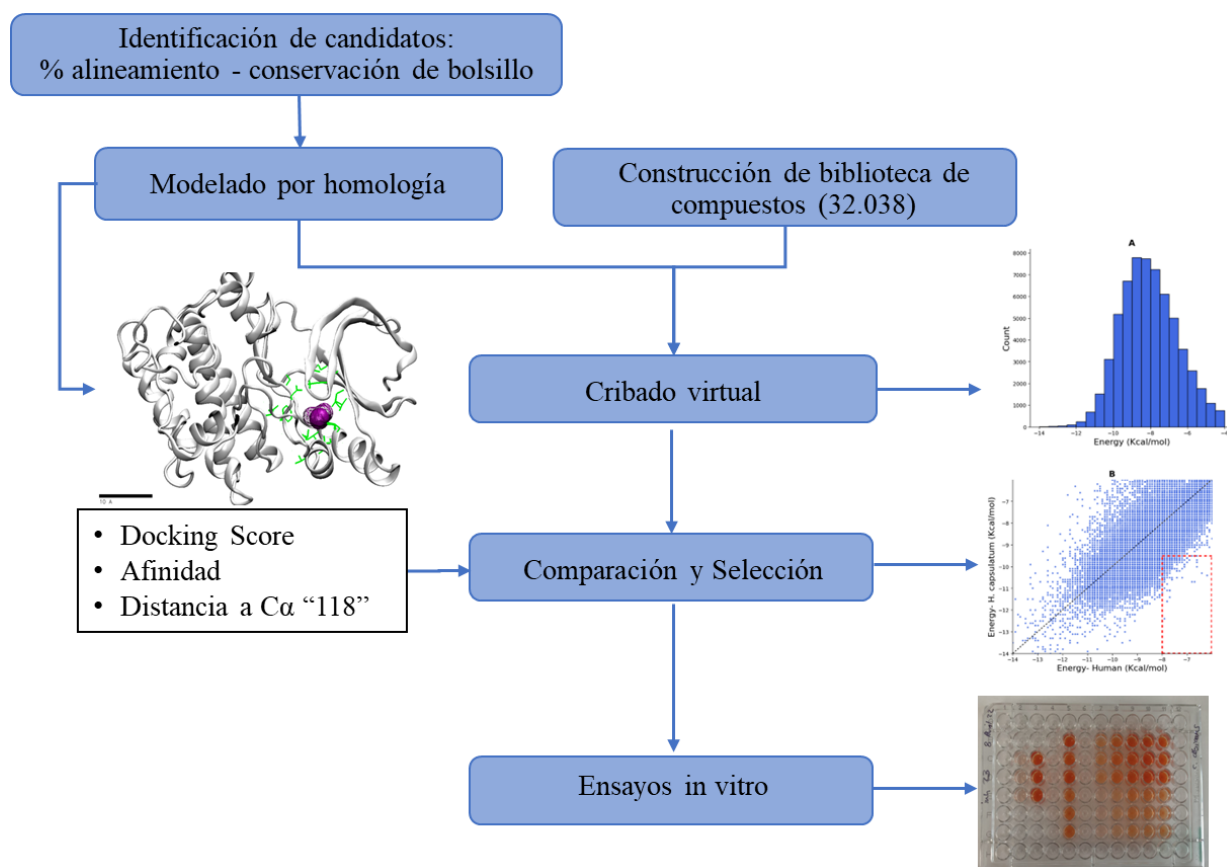


Figura 1: Resumen gráfico de la metodología empleada

Resultados y discusión

Proteínas fúngicas con sitios activos similares al de MEK1 humana

A partir del alineamiento local de la región de secuencia que incluye el sitio activo no competitivo de MEK1, contra secuencias de los proteomas fúngicos, se obtuvieron diferentes proteínas con alto porcentaje de identidad en esa región. Como criterios mínimos de selección se estableció un porcentaje de identidad $\geq 30\%$ y una conservación de aminoácidos del bolsillo $\geq 60\%$, descartando alineamientos que no incluyeran al menos 20 de los 23 residuos del sitio de unión. Con estos parámetros, se seleccionaron tres proteínas por proteoma, todas con identidad superior al 45 % y conservación del bolsillo mayor al 65 %, como se ilustra en la Figura 2. Estas proteínas están anotadas como MAP quinasas en la base UniProt, excepto A0A0D2XNJ1, que está anotada como quinasa. Para efectos de comparación, la numeración de los aminoácidos de estas proteínas se realizó con base en la secuencia de MEK1 humana (Q02750).

En *F. oxysporum*, de manera análoga, la proteína con el porcentaje de identidad más alto fue A0A0D2XNJ1, donde el cambio es L118M, que conserva aproximadamente el volumen interno del bolsillo en comparación con MEK1.

Dos proteínas bastante similares entre sí fueron F0UFI3 (*H. capsulatum*) y A0A0D2XGR3 (*F. oxysporum*), las cuales poseen un segmento adicional de 35-45 aa después de la posición 89 de la secuencia, como se observa en la Figura 2. Debido a estas inserciones, la cobertura original de estos alineamientos fue del 91% y 87% respectivamente, y el porcentaje de conservación de residuos de bolsillo se calculó sobre 20 aa, excluyendo las posiciones 78-80. No obstante, mediante un alineamiento global con la secuencia de MEK1, se verificó la correspondencia entre los residuos del bolsillo de todas las proteínas, como se observa en la Figura 2.

Mediante modelado por homología se observó que estas inserciones en F0UFI3 y A0A0D2XGR3 corresponden a lazos externos y no alteran la topología del sitio no competitivo. En la posición 118, ambas conservan la leucina, lo que sugiere una estructura interna similar a MEK1. Sin embargo, se identificó un cambio más drástico en Y79G, que podría tener implicaciones funcionales.

De manera análoga, las proteínas F0U908 y A0A0D2XDY6 también mostraron un alto grado de similitud entre sí; ambas poseen las mismas sustituciones N78A y L118N, y ambas están clasificadas en UniProt como MAPK kinase MKK2. No obstante, sus porcentajes de conservación fueron los más bajos en ambos organismos.

Para el cribado virtual, se priorizaron las proteínas con mayor identidad y conservación estructural, seleccionando finalmente F0UAN5 para *H. capsulatum* y A0A0D2XNJ1 para *F. oxysporum*.

Selección de compuestos a partir del cribado virtual

Los modelos de las MEK fúngicas se usaron para el cribado virtual contra las bibliotecas de compuestos preparados. La distribución de las energías de unión (scores) dados por Autodock Vina para la proteína de *H. capsulatum* se muestra en la Figura 3A (en el caso de *F. oxysporum*, la distribución fue similar). Como medida de referencia, se incluyeron en las simulaciones diferentes fármacos anti-MEK y otros inhibidores cristalizados, verificando que las poses predichas correspondieran con la geometría cristalográfica. En el caso del ligando con identificador MEK co-cristalizado en la estructura molde (código PDB: 3DV3), se obtuvo una energía de -9.6 kcal/mol, y el resto de los valores oscilaron entre -12.8 kcal/mol (trametinib) y -8.3 kcal/mol (cobimetinib).

Por otro lado, la Figura 3B muestra un gráfico de dispersión para comparar los resultados de docking entre la proteína F0UAN5 de *H. capsulatum* y la MEK1 humana. En este gráfico, cada punto representa las energías obtenidas para uno o varios compuestos superpuestos.

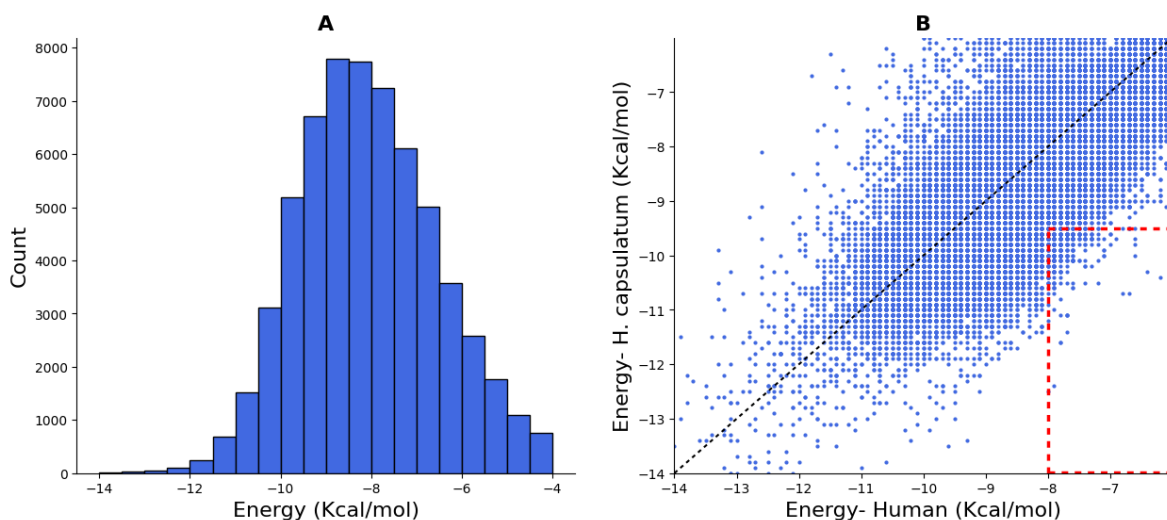


Figura 3: **A:** Distribución de puntuaciones de energía de los complejos proteína ligando obtenidos por el cribado virtual entre la proteína F0UAN5, se truncaron los datos sobre -6 Kcal/mol ya que se consideraron de poca afinidad. **B.** Gráfico de dispersión comparativo entre los valores de energía potencial de cada molécula, contra la proteína de *H. capsulatum* y la proteína humana, adicionalmente se resalta el subespacio de búsqueda seleccionado para las observaciones finales, en el cual se analizaron compuestos cuya afinidad fuera alta para los hongos, pero baja para MEK1.

En general, los resultados de docking no tienen correlación directa con la capacidad inhibitoria de los compuestos, tanto por las limitaciones propias de las funciones de puntuación (Jereva et al., 2022), como por la dinámica de las interacciones a nivel celular, que es compleja. Sin embargo, sirven de guía para la selección de un conjunto de compuestos para los ensayos *in vitro*.

Tomando en consideración el objetivo de obtener inhibidores específicos por la proteína fúngica, o sea, con baja afinidad por la MEK1 humana, se estableció como primer criterio de filtrado que la energía para MEK1 fuera mayor que la del inhibidor conocido con peor puntuación (cobimetinib: -8.3 kcal/mol). Por ello se descartaron los complejos con energía superior a -8 Kcal/mol contra MEK1, eliminando alrededor del 50% de los compuestos de la base. Adicionalmente, y aunque no se observó una alta correlación entre los resultados del cribado virtual para la proteína fúngica y la humana, como se muestra en la Figura 3B, incluimos como criterio de filtrado un umbral de energía más bajo para la proteína fúngica: ≤ -9.5 kcal/mol. Como resultado, se obtuvo un conjunto de varios cientos de compuestos, comprendidos en el recuadro rojo de la Figura 3B.

Otra condición importante fue que los compuestos a seleccionar deben ocupar parte del espacio liberado en el sitio no competitivo de F0UAN5 (en *H. capsulatum*) por la sustitución L118G. Para ello, se definió un umbral máximo de distancia de 6.5 Å entre el carbono alfa del aminoácido 118 y al menos un átomo pesado del compuesto. De este modo se favorecía

la selección de compuestos que puedan encajar en el sitio activo de la proteína fúngica, pero que no puedan hacerlo fácilmente en la proteína humana.

De estas selecciones se obtuvieron 125 moléculas para *H. capsulatum* y 134 para *F. oxysporum*. Las poses predichas para estos compuestos fueron revisadas visualmente caso a caso, como se ilustra en la Figura 4 con el compuesto OGT-IN-2 (usando PyMol y VMD), comparando la distribución espacial de los compuestos en el sitio de unión contra la orientación de inhibidores conocidos de MEK1.

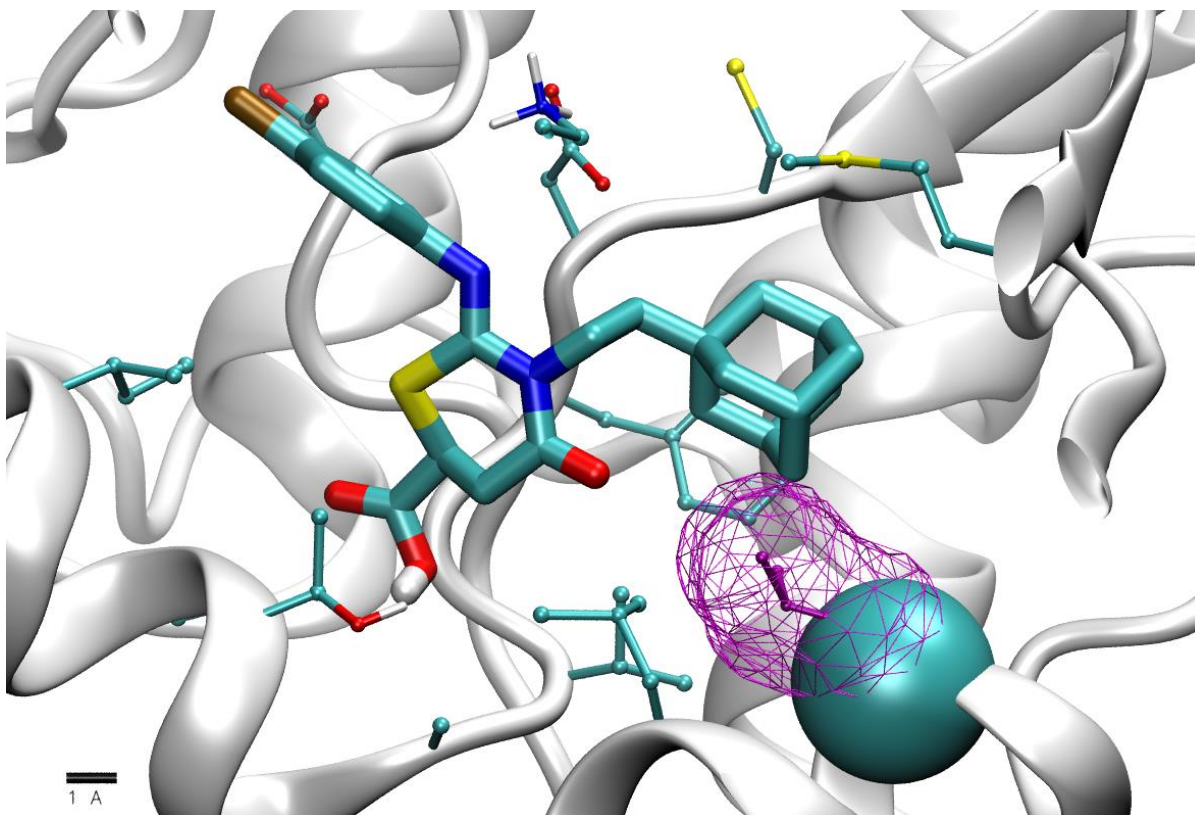
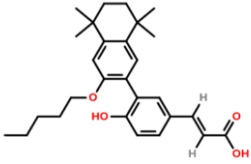
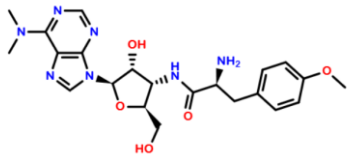
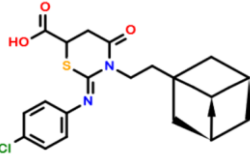
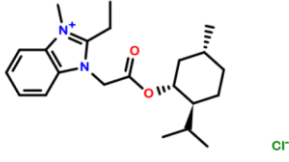
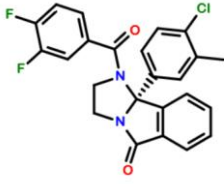
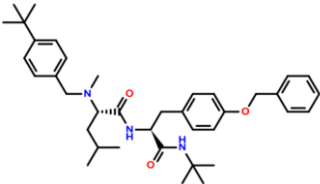


Figura 4: Representación del modo de unión esperado de los compuestos seleccionados tomando el compuesto OGT-IN-2 como ejemplo, en complejo con la proteína de *H. capsulatum*, se observa que la región voluminosa, un grupo adamantil ocupa la región donde se genera el espacio debido al cambio de L (malla morada) por G en la posición 118, el Ca de G118 se representa como esfera de VDW.

Ensayos *in vitro*

Finalmente, se seleccionaron 10 compuestos (Tabla 1) para ser ensayados *in vitro* contra *Histoplasma capsulatum*, *Fusarium oxysporum* y dos líneas celulares humanas: Los resultados de estos ensayos se muestran en la Tabla 2

Tabla 1. Compuestos seleccionados para los ensayos *in vitro*.

Datos del compuesto	Estructura
Nombre: UVI3003 P.M.: 436.6 Da Blanco: receptor X retinoide (P19793) CAS: 847239-17-2	
Nombre: Puromycin (hydrochloride) P.M.: 544.4 Da Blanco: Cadena polipeptídica CAS: 58-58-2	
Nombre: OGT-IN-2 P.M.: 446.99 Da Blanco: O-GlcNAc transferasa (O15294) CAS: 442665-87-4	
Nombre: Gboxin P.M.: 392.96 Da Blanco: ATP sintasa F0F1 (O75964) CAS: 2101315-36-8	
Nombre: (R)-VU 6008667 P.M.: 438.85 Da Blanco: Receptor muscarínico de acetilcolina M1 (P11229) CAS: 2097818-14-7	
Nombre: PD 173212 P.M.: 599.9 Da Blanco: Múltiples canales de calcio tipo N (x.ej. Q00975) CAS: 217171-01-2	

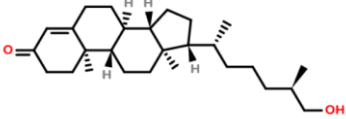
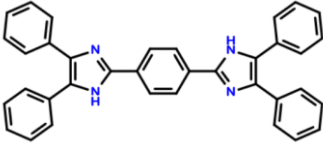
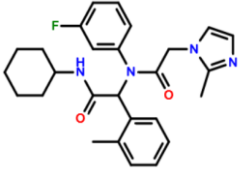
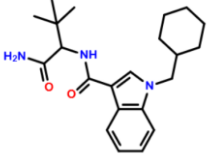
<p>Nombre: 27-hydroxy Cholestenone</p> <p>P.M.: 400.6 Da</p> <p>Blanco: CYP27A1 (Q02318)</p> <p>CAS: 56792-59-7</p>	
<p>Nombre: MSX-130</p> <p>P.M.: 514.6</p> <p>Blanco: CXCR4 (P61073)</p> <p>CAS: 4051-59-6</p>	
<p>Nombre: AGI-5198</p> <p>P.M.: 462.56 Da</p> <p>Blanco: IDH1 R132H (O75874 R132H)</p> <p>CAS: 1355326-35-0</p>	
<p>Nombre: ADB-CHMICA (canabidioide)</p> <p>P.M.: 369.5 Da</p> <p>Blanco: múltiples receptores de cannabidioides</p> <p>CAS: 2221100-70-3</p>	

Tabla 2: Resultados *in vitro* de los compuestos seleccionados contra *H. capsulatum*, *F. oxysporum*, y dos líneas celulares humanas.

Compuesto	IC50 (μM)			
	<i>Histoplasma capsulatum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	Células A431	Células HEK 293A
UVI 3003	2	>229	13	21
Puromycin dihydrochloride	3	178	<11	<12
OGT-IN-2	<7	>224	20	25
Gboxin	<8	92	<16	13
(R)-VU 6008667	12	>228	<14	<14
PD 173212	> 167	<5	ND	<10

27-hydroxy Cholestenone	> 250	<8	ND	63
MSX-130	>58	>58	ND	<4
AGI-5198	>216	>216	ND	>216
ADB-CHMICA	>271	>271	ND	>271

De los diez compuestos seleccionados para ensayos *in vitro*, cinco mostraron inhibición significativa del crecimiento de *H. capsulatum*, en un rango micromolar bajo, y tres lo hicieron en *F. oxysporum*. En líneas celulares humanas, ocho compuestos afectaron el crecimiento de HEK 293A, y los cinco compuestos ensayados en A431 tuvieron efecto similar.

Los compuestos más selectivos por *H. capsulatum* fueron UVI 3003, Puromycin dihydrochloride y OGT-IN-2, mientras que 27-hydroxy Cholestenone inhibió *F. oxysporum* a menores concentraciones.

UVI 3003 se une al receptor del ácido retinoico (P19793) en humanos (Nahoum et al., 2007), sin embargo, en los proteomas de los hongos estudiados no se identificó ninguna proteína con un porcentaje de identidad del sitio activo significativo para esta proteína humana. Por ello y por su baja IC50, UVI 3003 resulta un candidato promisorio para estudios posteriores, y se podría explorar el diseño de compuestos derivados de esta molécula.

Un escenario similar ocurre con el compuesto (R)-VU 6008667 que se une a la proteína muscarínica receptora de acetilcolina (P11229) (McGowan et al., 2017), para la cual tampoco se encontraron proteínas con sitio de unión similar en *H. capsulatum*. Sin embargo, teniendo en cuenta que su citotoxicidad en células humanas es comparable a su efecto en hongos, no se perfila como un buen candidato, en comparación con UVI 3003.

El dihidrocloruro de puromicina (o puromicina) inhibió significativamente a *H. capsulatum*, con menor efecto en *F. oxysporum*. Este compuesto es usado como supresor de la transcripción de proteínas, ya que se inserta en el segmento C-terminal de la cadena polipeptídica (Azzam And & Algranati, 1973; Lihrmann et al., 1981; Rodriguez-Fonseca et al., 2000). Teniendo en cuenta esto, su mecanismo de acción está vinculado a la inhibición de la traducción, no específicamente a MEK1, lo que sugiere que su efecto antifúngico podría ser inespecífico. Sin embargo, su actividad podría explorarse en contextos de ingeniería genética o como marcador selectivo. Por ejemplo, se ha reportado que existen cepas de *S. cerevisiae* sensibles a esta molécula, lo que la posiciona como un marcador útil en la ingeniería genética (Cary et al., 2014).

OGT-IN-2 se une a la proteína O-GlcNAc transferasa (O15294) (Gross et al., 2005), para la cual identificamos ortólogos en *H. capsulatum*. Esto plantea la posibilidad de que su mecanismo de acción esté vinculado a estas proteínas. Por otra parte, es posible que este compuesto pueda unirse efectivamente a F0UAN5. Como se observa en la Figura 4, su voluminoso grupo adamantil (J. Liu et al., 2011) se orienta en el interior del sitio de unión en el espacio que deja la sustitución L118G. De acuerdo con esto, este compuesto o sus

derivados, del mismo modo que UVI 3003, puede ser un candidato promisorio como inhibidor de *H. capsulatum*. Además, no existen reportes de su estudio como antifúngico, y estudios posteriores deberían enfocarse en evaluar mecanismos para optimizar la selectividad de este y sus derivados.

La gboxina (Gboxin), es un inhibidor de la fosforilación oxidativa (OXPHOS) que se dirige al glioblastoma. Inhibe la actividad de la ATP sintasa F0F1. Tiene actividad antitumoral, sin embargo, su uso es limitado (Zou et al., 2023). Su efecto consiste en reducir las cantidades de ATP en la célula, desactivando la ATP sintasa. Por esta razón, además de su alto efecto citotóxico, en nuestros resultados no se perfila como un candidato prometedor.

PD 173212 inhibió a *F. oxysporum*, este es un bloqueador de los canales de calcio tipo N y previene las convulsiones audiogénicas en ratones (Hu et al., 1999). El proteoma de *F. oxysporum* posee proteínas similares, sin embargo, como en el caso de la gboxina, su citotoxicidad fue comparable contra líneas celulares humanas.

En el caso de la 27-hydroxy Cholestenone, este es un oxisterol, que en humanos tiene como blanco la enzima esterol 26-hidroxilasa mitocondrial. Esta proteína posee anotaciones de otras proteínas similares en el proteoma de *F. oxysporum*. Nuestros resultados sugieren que podría ser útil como inhibidor específico de *F. oxysporum*, sin embargo, esto requerirá validaciones adicionales.

Consideraciones finales

El propósito de este estudio fue identificar potenciales blancos terapéuticos y nuevos inhibidores de estos blancos en los hongos *H. capsulatum* y *F. oxysporum*, tomando como modelo a la proteína MEK1 y teniendo en cuenta la alta conservación de las vías MAPK. A través de alineamientos dirigidos y modelado estructural, se identificaron tres pares de proteínas con alta conservación en el bolsillo de unión, priorizando F0UAN5 y A0A0D2XNJ1 como blancos para cribado virtual.

Nuestra identificación de compuestos con afinidad diferencial por proteínas fúngicas representa un punto de partida valioso en la búsqueda de inhibidores selectivos. Aparte de las proteínas identificadas, los resultados experimentales derivados del cribado virtual permitieron identificar compuestos con actividad antifúngica en rangos bajos de concentración. En particular, UVI 3003 y OGT-IN-2 mostraron perfiles de selectividad que justifican estudios posteriores de optimización estructural y evaluación funcional.

En conjunto, nuestros resultados demuestran que la combinación de análisis específicos de secuencia, modelado estructural, cribado virtual y validación experimental permite identificar compuestos con afinidad diferencial por proteínas fúngicas, incluso cuando sus blancos conocidos en humanos no están relacionados exclusivamente con la proteína de interés, en este caso ortólogos de MEK1. Este enfoque puede extenderse a otros patógenos fúngicos.

Finalmente, en el caso específico de proteínas MAPK, la eficacia de un tratamiento dirigido a ortólogos de MEK1 (u otra MAPK) en hongos dependerá de la comprobación de que el

organismo en cuestión conserva una vía MAPK funcionalmente equivalente, si el ortólogo identificado juega un papel central en dicha vía, y si se puede inhibir selectivamente esta proteína.

Referencias

Albataineh, M. T., Sutton, D. A., Fothergill, A. W., & Wiederhold, N. P. (2016). Update from the Laboratory: Clinical Identification and Susceptibility Testing of Fungi and Trends in Antifungal Resistance. *Infectious Disease Clinics of North America*, 30(1), 13–35. <https://doi.org/10.1016/J.IDC.2015.10.014>

Alexander, B. D. . (2017). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Clinical and Laboratory Standards Institute.

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)

Alzahrani, W. M., Alghamdi, S. A., Zughairi, T. A., & Rehan, M. (2022). Exploring the Natural Compounds in Flavonoids for Their Potential Inhibition of Cancer Therapeutic Target MEK1 Using Computational Methods. *Pharmaceuticals*, 15(2). <https://doi.org/10.3390/ph15020195>

Avruch, J. (2007). MAP kinase pathways: The first twenty years. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1773(8), 1150–1160. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.11.006>

Azzam And, M. E., & Algranati, I. D. (1973). Mechanism of Puromycin Action: Fate of Ribosomes after Release of Nascent Protein Chains from Polysomes (subunit exchange/spermidine/protein synthesis/ribosome cycle). In Part (Vol. 70, Issue 12). <https://www.pnas.org>

Becher, R., & Wirsal, S. G. R. (2012). Fungal cytochrome P450 sterol 14 α -demethylase (CYP51) and azole resistance in plant and human pathogens. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 95(4), 825–840. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4195-9>

Bedoya-Cardona, J. E., Rubio-Carrasquilla, M., Ramírez-Velásquez, I. M., Valdés-Tresanco, M. S., & Moreno, E. (2023). Identifying Potential Molecular Targets in Fungi Based on (Dis)Similarities in Binding Site Architecture with Proteins of the Human Pharmacolome. *Molecules*, 28(2), 692. <https://doi.org/10.3390/molecules28020692>

Berne, S., Podobnik, B., Zupanec, N., Novak, M., Kraševac, N., Turk, S., Korošec, B., Lah, L., Šuligoj, E., Stojan, J., Gobec, S., & Komel, R. (2012). Virtual screening yields inhibitors of novel antifungal drug target, benzoate 4-monooxygenase. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 52(11), 3053–3063. https://doi.org/10.1021/CI3004418/SUPPL_FILE/CI3004418_SI_002.MPG

Cary, G. A., Yoon, S. H., Torres, C. G., Wang, K., Hays, M., Ludlow, C., Goodlett, D. R., & Dudley, A. M. (2014). Identification and characterization of a drug sensitive strain enables

puromycin-based translational assays in *Saccharomyces cerevisiae* NIH Public Access. *Yeast*, 31(5), 167–178. <https://doi.org/10.1002/yea.3007>

Caunt, C. J., Sale, M. J., Smith, P. D., & Cook, S. J. (2015). MEK1 and MEK2 inhibitors and cancer therapy: The long and winding road. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 15, Issue 10, pp. 577–592). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrc4000>

Chen, R. E., & Thorner, J. (2007). Function and regulation in MAPK signaling pathways: Lessons learned from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1773(8), 1311–1340. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2007.05.003>

Cuevas, B. D., Abell, A. N., & Johnson, G. L. (2007). Role of mitogen-activated protein kinase kinases in signal integration. *Oncogene*, 26(22), 3159–3171. <https://doi.org/10.1038/SJ.ONC.1210409>

Denning, D. W. (2024). Global incidence and mortality of severe fungal disease. *The Lancet Infectious Diseases*, 24(7), e428–e438. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(23\)00692-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(23)00692-8)

Duan, K., Shen, Q., Wang, Y., Xiang, P., Shi, Y., Yang, C., Jiang, C., Wang, G., Xu, J. R., & Zhang, X. (2023). Herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid interferes with MAP kinase signaling in *Fusarium graminearum* and is inhibitory to fungal growth and pathogenesis. *Stress Biology*, 3(1). <https://doi.org/10.1007/s44154-023-00109-x>

González-Rubio, G., Fernández-Acero, T., Martín, H., & Molina, M. (2019). Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphatases (MKPs) in Fungal Signaling: Conservation, Function, and Regulation. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(7), 1709. <https://doi.org/10.3390/ijms20071709>

Gross, B. J., Kraybill, B. C., & Walker, S. (2005). Discovery of O-GlcNAc transferase inhibitors. *Journal of the American Chemical Society*, 127(42), 14588–14589. <https://doi.org/10.1021/ja0555217>

Guimarães, A. J., Martinez, L. R., & Nosanchuk, J. D. (2011). Passive administration of monoclonal antibodies against *H. capsulatum* and others fungal pathogens. *Journal of Visualized Experiments*, 48. <https://doi.org/10.3791/2532>

Hou, Z., Xue, C., Peng, Y., Katan, T., Corby Kistler, H., & Xu, J.-R. (2002). A Mitogen-Activated Protein Kinase Gene (MGV1) in *Fusarium graminearum* Is Required for Female Fertility, Heterokaryon Formation, and Plant Infection (Vol. 15, Issue 11).

Hu, L.-Y., Todd Ryder, R., Rafferty, M. F., Dooley, D. J., Geer, J. J., Lotarski, S. M., Miljanich, G. P., Millerman, E., Rock, D. M., Stoehr, S. J., Szoke, B. G., Taylor, C. P., & Vartanian, M. G. (1999). Structure-activity relationship of N-methyl-N-alkyl-peptidylamines as novel N-type calcium channel blockers. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 9(15), 2151–2156. [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(99\)00359-5](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(99)00359-5)

Humphrey, W., Dalke, A., & Schulten, K. (1996). VMD: Visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, 14(1), 33–38. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5)

Iverson, C., Larson, G., Lai, C., Yeh, L. T., Dadson, C., Weingarten, P., Appleby, T., Vo, T., Maderna, A., Vernier, J. M., Hamatake, R., Miner, J. N., & Quart, B. (2009). RDEA119/BAY 869766: A potent, selective, allosteric inhibitor of MEK1/2 for the treatment of cancer. *Cancer Research*, 69(17), 6839–6847. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-0679>

Jereva, D., Alov, P., Tsakovska, I., Angelova, M., Atanassova, V., Vassilev, P., Ikonov, N., Atanassov, K., Pajeva, I., & Pencheva, T. (2022). mathematics Application of InterCriteria Analysis to Assess the Performance of Scoring Functions in Molecular Docking Software Packages. <https://doi.org/10.3390/math10152549>

Kamiloglu, S., Sari, G., Ozdal, T., & Capanoglu, E. (2020). G U I D E L I N E Guidelines for cell viability assays. <https://doi.org/10.1002/fft2.44>

Kontoyianni, M. (2017). Docking and Virtual Screening in Drug Discovery. *Methods in Molecular Biology*, 1647, 255–266. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7201-2_18

Lee, K. W., Kang, N. J., Rogozin, E. A., Kim, H. G., Cho, Y. Y., Bode, A. M., Lee, H. J., Surh, Y. J., Bowden, G. T., & Dong, Z. (2007). Myricetin is a novel natural inhibitor of neoplastic cell transformation and MEK1. *Carcinogenesis*, 28(9), 1918–1927. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgm110>

Li, D., Fan, S., Zhao, H., Song, J., Guo, L., Li, W., Xu, X., Li, Q., González-González, G. M., Xue, Y., Ayanlowo, O., & Guadalupe Frías De León, M. (2025). Worldwide trends and future projections of fungal skin disease burden: a comprehensive analysis from the Global Burden of Diseases study 2021. *Front. Public Health*, 13, 1580221. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2025.1580221>

Lihmann, R., Bald, R., Stoffler-Meilicke, M., & Stoffler, G. (1981). Localization of the puromycin binding site on the large ribosomal subunit of *Escherichia coli* by immunoelectron microscopy (ribosome topography/peptidyl transferase center/IgG antibodies against minor nucleosides/antibiotics) (Vol. 78, Issue 12). <https://www.pnas.org>

Liu, J., Obando, D., Liao, V., Lifa, T., & Codd, R. (2011). The many faces of the adamantyl group in drug design. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46(6), 1949–1963. <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2011.01.047>

Liu, X., Yan, S., Zhou, T., Terada, Y., & Erikson, R. L. (2004). The MAP kinase pathway is required for entry into mitosis and cell survival. *Oncogene*, 23(3), 763–776. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207188>

Lockhart, S. R., Chowdhary, A., & Gold, J. A. W. (2023). The rapid emergence of antifungal-resistant human-pathogenic fungi. *Nature Reviews. Microbiology*, 21(12), 818–832. <https://doi.org/10.1038/S41579-023-00960-9>

Martínez-Soto, D., & Ruiz-Herrera, J. (2017). Functional analysis of the MAPK pathways in fungi. *Revista Iberoamericana de Micología*, 34(4), 192–202. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2017.02.006>

McGowan, K. M., Nance, K. D., Cho, H. P., Bridges, T. M., Jeffrey Conn, P., Jones, C. K., & Lindsley, C. W. (2017). Continued optimization of the M5 NAM ML375: Discovery of VU6008667, an M5 NAM with high CNS penetration and a desired short half-life in rat for addiction studies. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 27(6), 1356–1359. <https://doi.org/10.1016/J.BMCL.2017.02.020>

Morris, G. M., Ruth, H., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2009). Software news and updates AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, 30(16), 2785–2791. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>

Morrison, D. K. (2012). MAP Kinase Pathways. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(11), a011254–a011254. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011254>

Nahoum, V., Rez, P., Germain, P., Tima Rodríguez-Barríos, F., Manzo, F., Kammerer, S., Lemaire, G., Hirsch, O., Royer, C. A., Gronemeyer, H., De Lera, A. R., & Bourguet, W. (2007). Modulators of the structural dynamics of the retinoid X receptor to reveal receptor function. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0705356104

Niño-Vega, G. A., Padró-Villegas, L., & López-Romero, E. (2024). New Ground in Antifungal Discovery and Therapy for Invasive Fungal Infections: Innovations, Challenges, and Future Directions. <https://doi.org/10.3390/jof10120871>

Ohren, J. F., Chen, H., Pavlovsky, A., Whitehead, C., Zhang, E., Kuffa, P., Yan, C., McConnell, P., Spessard, C., Banotai, C., Mueller, W. T., Delaney, A., Omer, C., Sebolt-Leopold, J., Dudley, D. T., Leung, I. K., Flamme, C., Warmus, J., Kaufman, M., ... Hasemann, C. A. (2004). Structures of human MAP kinase kinase 1 (MEK1) and MEK2 describe novel noncompetitive kinase inhibition. *Nature Structural and Molecular Biology*, 11(12), 1192–1197. <https://doi.org/10.1038/nsmb859>

Pagano, L., & Fernández, O. M. (2025). Clinical aspects and recent advances in fungal diseases impacting human health. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 80(Suppl 1), i2. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKAF004>

Park, Y. K., Shin, J., Lee, H.-Y., Kim, H. D., & Kim, J. (2021). Inhibition of Ras1-MAPK pathways for hypha formation by novel drug candidates in *Candida albicans*. In bioRxiv (p. 2021.07.06.451239). Cold Spring Harbor Laboratory. <https://doi.org/10.1101/2021.07.06.451239>

Plotnikov, A., Zehorai, E., Procaccia, S., & Seger, R. (2011). The MAPK cascades: Signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1813(9), 1619–1633. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.12.012>

Robinson, M. J., & Cobb, M. H. (1997). Mitogen-activated protein kinase pathways. *Current Opinion in Cell Biology*, 9(2), 180–186. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(97\)80061-0](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(97)80061-0)

Rodriguez-Fonseca, C., Phan, H., Long, K. S., Porse, B. T., Kirillov, S. V, Amils, R., & Garrett, R. A. (2000). Puromycin-rRNA interaction sites at the peptidyl transferase center.

Schrödinger LLC. (2015). The PyMOL Molecular Graphics System, Version~1.8.

Segorbe, D., Di Pietro, A., Pérez-Nadales, E., & Turrà, D. (2017). Three *Fusarium oxysporum* mitogen-activated protein kinases (MAPKs) have distinct and complementary roles in stress adaptation and cross-kingdom pathogenicity. *Molecular Plant Pathology*, 18(7), 912–924. <https://doi.org/10.1111/mpp.12446>

Seidel, D., Wurster, S., Jenks, J. D., Sati, H., Gangneux, J.-P., Egger, M., Alastruey-Izquierdo, A., Ford, N. P., Chowdhary, A., Sprute, R., Cornely, O., Thompson, G. R., Hoenigl, M., & Kontoyiannis, D. P. (2024). Impact of climate change and natural disasters on fungal infections. *The Lancet Microbe*, 5(6), e594–e605. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(24\)00039-9](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(24)00039-9)

Singh, A., Ruan, Y., Tippett, T., & Narendran, A. (2015). Targeted inhibition of MEK1 by cobimetinib leads to differentiation and apoptosis in neuroblastoma cells. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 34(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13046-015-0222-x>

Steinberg, G., & Gurr, S. J. (2020). Fungi, fungicide discovery and global food security. *Fungal Genetics and Biology*, 144, 1087–1845. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2020.103476>

Stepanenko, A. A., & Dmitrenko, V. V. (2015). HEK293 in cell biology and cancer research: phenotype, karyotype, tumorigenicity, and stress-induced genome-phenotype evolution. *Gene*, 569(2), 182–190. <https://doi.org/10.1016/J.GENE.2015.05.065>

Stoscheck, C. M., & Carpenter, G. (1983). Biology of the A-431 cell: A useful organism for hormone research. *Journal of Cellular Biochemistry*, 23(1–4), 191–202. <https://doi.org/10.1002/jcb.240230116>

Tecele, H., Shao, J., Li, Y., Kothe, M., Kazmirski, S., Penzotti, J., Ding, Y. H., Ohren, J., Moshinsky, D., Coli, R., Jhawar, N., Bora, E., Jacques-O’Hagan, S., & Wu, J. (2009). Beyond the MEK-pocket: Can current MEK kinase inhibitors be utilized to synthesize novel type III NCKIs? Does the MEK-pocket exist in kinases other than MEK? *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 19(1), 226–229. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.10.108>

Tripathi, H., & Khan, F. (2018). Identification of potential inhibitors against nuclear Dam1 complex subunit Ask1 of *Candida albicans* using virtual screening and MD simulations. *Computational Biology and Chemistry*, 72, 33–44. <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2017.12.013>

Trott, O., & Olson, A. J. (2009). AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, NA-NA. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>

Vassilopoulos, S., & Mylonakis, E. (2022). Avenues for antifungal drug discovery and development: where to now? *Expert Opinion on Drug Discovery*, 17(7), 667–672. https://doi.org/10.1080/17460441.2022.2098950/ASSET/465C1D61-08E0-4365-9834-71346BC8B443/ASSETS/IMAGES/IEDC_A_2098950_F0001_B.GIF

Wang, R., Fang, X., Lu, Y., Yang, C.-Y., & Wang, S. (2005). The PDBbind Database: Methodologies and Updates. *Journal of Medicinal Chemistry*, 48(12), 4111–4119. <https://doi.org/10.1021/jm048957q>

Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F. T., De Beer, T. A. P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., & Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W296–W303. <https://doi.org/10.1093/nar/gky427>

World Health Organization. (2022). WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action.

Xu, J. R. (2000). MAP Kinases in Fungal Pathogens. *Fungal Genetics and Biology*, 31(3), 137–152. <https://doi.org/10.1006/FGBI.2000.1237>

Yamaguchi, T., Kakefuda, R., Tajima, N., Sowa, Y., & Sakai, T. (2011). Antitumor activities of JTP-74057 (GSK1120212), a novel MEK1/2 inhibitor, on colorectal cancer cell lines *in vitro* and *in vivo*. *International Journal of Oncology*, 39(1), 23–31. <https://doi.org/10.3892/ijo.2011.1015>

Yang, J. C. H., Lin, C. C. (Josh), & Chu, C. Y. (2018). Management of Toxicities of Targeted Therapies. *IASLC Thoracic Oncology*, 490-500.e3. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-52357-8.00049-4>

Zhao, X., Mehrabi, R., & Xu, J. R. (2007). Mitogen-activated protein kinase pathways and fungal pathogenesis. In *Eukaryotic Cell* (Vol. 6, Issue 10, pp. 1701–1714). <https://doi.org/10.1128/EC.00216-07>

Zou, Y., Sun, Y., Wang, Y., Zhang, D., Yang, H., Wang, X., Zheng, M., & Shi, B. (2023). Cancer cell-mitochondria hybrid membrane coated Gboxin loaded nanomedicines for glioblastoma treatment. *Nature Communications*, 14(1), 4557. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-40280-3>

Capítulo 5

Discusión final y conclusiones

Esta tesis presenta una estrategia computacional basada en estructura para la identificación de nuevos blancos terapéuticos y compuestos antifúngicos, con énfasis en el reposicionamiento de fármacos y la búsqueda de inhibidores específicos. Tomando como referencia el farmacoloma humano, se logró identificar ortólogos fúngicos con alta similitud en sus sitios de unión, enfocándonos principalmente en blancos con potencial terapéutico en *Histoplasma capsulatum* y *Fusarium oxysporum*, dos patógenos de prioridad clínica alta.

Los resultados obtenidos muestran que la similitud estructural entre proteínas humanas y fúngicas puede ser aprovechada para identificar compuestos con actividad antifúngica, aún cuando sus blancos originales no están directamente relacionados con infecciones fúngicas. En particular, se identificaron proteínas fúngicas cuya arquitectura en sus sitios de unión es altamente conservada, lo que permitió aplicar modelado estructural y cribado virtual para seleccionar inhibidores con afinidad diferencial. Este enfoque permitió detectar compuestos con actividad en rangos micromolares bajos, varios de los cuales no habían sido previamente evaluados como antifúngicos.

No todos los blancos fúngicos identificados serán adecuados para reposicionamiento, especialmente cuando los fármacos asociados presentan efectos secundarios severos o inmunosupresores. Sin embargo, se identificaron casos en los que los compuestos disponibles podrían ser reutilizados de forma segura, abriendo nuevas rutas para el tratamiento de micosis invasivas.

La identificación de diferencias sutiles en la topología de los sitios activos entre proteínas humanas y fúngicas también ofrece oportunidades para el diseño de inhibidores específicos, minimizando efectos adversos y mejorando la selectividad.

En el caso particular de los ortólogos de MEK1, la conservación funcional de las vías MAPK en hongos es un criterio importante para explorar la viabilidad terapéutica de estos blancos. La eficacia de los compuestos identificados dependerá de su capacidad para inhibir selectivamente proteínas que desempeñan un papel central en dichas vías, lo que justifica estudios posteriores de optimización estructural y evaluación funcional.

En conjunto, esta tesis aporta una plataforma metodológica robusta que puede extenderse a otros patógenos fúngicos, siempre que se identifiquen ortólogos funcionales y se disponga de modelos estructurales confiables. Los resultados obtenidos demuestran la validez de este enfoque, y contribuyen a los esfuerzos de ampliar el repertorio de blancos y compuestos antifúngicos disponibles, considerando el contexto clínico que está marcado por la resistencia y la escasez de opciones terapéuticas.

Referencias

- Albataineh, M. T., Sutton, D. A., Fothergill, A. W., & Wiederhold, N. P. (2016). Update from the Laboratory: Clinical Identification and Susceptibility Testing of Fungi and Trends in Antifungal Resistance. *Infectious Disease Clinics of North America*, 30(1), 13–35. <https://doi.org/10.1016/J.IDC.2015.10.014>
- Alvarez-Moreno, C. A., Cortes, J. A., & Denning, D. W. (2018). Burden of fungal infections in Colombia. *Journal of Fungi*, 4(2). <https://doi.org/10.3390/JOF4020041>
- Armstrong, P. A., Rivera, S. M., Escandon, P., Caceres, D. H., Chow, N., Stuckey, M. J., Díaz, J., Gomez, A., Vélez, N., Espinosa-Bode, A., Salcedo, S., Marin, A., Berrio, I., Varón, C., Guzman, A., Pérez-Franco, J. E., Escobar, J. D., Villalobos, N., Correa, J. M., ... Pacheco, O. (2019). Hospital-Associated Multicenter Outbreak of Emerging Fungus *Candida auris*, Colombia, 2016. *Emerging Infectious Diseases*, 25(7), 1339. <https://doi.org/10.3201/EID2507.180491>
- Ashburn, T. T., & Thor, K. B. (2004). Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nature Reviews Drug Discovery*, 3(8), 673–683. <https://doi.org/10.1038/nrd1468>
- Branda, F., Petrosillo, N., Ceccarelli, G., Giovanetti, M., De Vito, A., Madeddu, G., Scarpa, F., & Ciccozzi, M. (2025). Antifungal Agents in the 21st Century: Advances, Challenges, and Future Perspectives. *Infectious Disease Reports*, 17(4), 91. <https://doi.org/10.3390/idr17040091>
- Caceres, D. H., Echeverri Tirado, L. C., Bonifaz, A., Adenis, A., Gomez, B. L., Flores, C. L. B., Canteros, C. E., Santos, D. W., Arathoon, E., Soto, E. R., Queiroz-Telles, F., Schwartz, I. S., Zurita, J., Damasceno, L. S., Garcia, N., Fernandez, N. B., Chinha, O., Araujo, P., Rabagliati, R., ... Giusiano, G. (2022). Current situation of endemic mycosis in the Americas and the Caribbean: Proceedings of the first international meeting on endemic mycoses of the Americas (<scp>IMEMA</scp>). *Mycoses*, 65(12), 1179–1187. <https://doi.org/10.1111/myc.13510>
- Campoy, S., & Adrio, J. L. (2017). Antifungals. In *Biochemical Pharmacology* (Vol. 133, pp. 86–96). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.11.019>
- Chavez-Dozal, A. A., Lown, L., Jahng, M., Walraven, C. J., & Lee, S. A. (2014). *In vitro* Analysis of Finasteride Activity against *Candida albicans* Urinary Biofilm Formation and Filamentation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(10), 5855–5862. <https://doi.org/10.1128/AAC.03137-14>
- Dao, A., Kim, H. Y., Halliday, C. L., Oladele, R., Rickerts, V., Govender MMed, N. P., Shin, J.-H., Heim, J., Ford, N. P., Nahrgang, S. A., Gigante, V., Beardsley, J., Sati, H., Morrissey, C. O., Alffenaar, J.-W., & Alastruey-Izquierdo, A. (2024). Histoplasmosis: A systematic review to inform the World Health Organization of a fungal priority pathogens list. *Medical Mycology*, 62(6). <https://doi.org/10.1093/mmy/myae039>

- Denning, D. W. (2002). Echinocandins: A new class of antifungal. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49(6), 889–891. <https://doi.org/10.1093/jac/dkf045>
- Denning, D. W. (2024). Global incidence and mortality of severe fungal disease. In *The Lancet Infectious Diseases* (Vol. 24, Issue 7, pp. e428–e438). Elsevier Ltd. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(23\)00692-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(23)00692-8)
- Fang, W., Wu, J., Cheng, M., Zhu, X., Du, M., Chen, C., Liao, W., Zhi, K., & Pan, W. (2023). Diagnosis of invasive fungal infections: challenges and recent developments. In *Journal of Biomedical Science* (Vol. 30, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12929-023-00926-2>
- Gintjee, T. J., Donnelley, M. A., & Thompson, G. R. (2020). Aspiring Antifungals: Review of Current Antifungal Pipeline Developments. *Journal of Fungi*, 6(1), 28. <https://doi.org/10.3390/jof6010028>
- Giusiano, G. (2025). Systemic endemic mycoses: From a geographical risk to a concern expansion. *Revista Iberoamericana de Micología*. <https://doi.org/10.1016/J.RIAM.2025.07.001>
- Greener, M. (2022). Why have we neglected fungal infections? *Prescriber*, 33(8–9), 20–23. <https://doi.org/10.1002/psb.2008>
- Hazen, E. L., & Brown, R. (1951). Fungicidin, an Antibiotic Produced by a Soil Actinomycete. *Experimental Biology and Medicine*, 76(1), 93–97. <https://doi.org/10.3181/00379727-76-18397>
- Kadariswantiningsih, I., Empitu, M., Santosa, T., & Alimu, Y. (2025). Antifungal resistance: Emerging mechanisms and implications (Review). *Molecular Medicine Reports*, 32(3), 1–17. <https://doi.org/10.3892/mmr.2025.13612>
- Kapoor, M., Moloney, M., Soltow, Q. A., Pillar, C. M., & Shaw, K. J. (2020). Evaluation of resistance development to the GWT1 inhibitor manogepix (APX001A) in *Candida* species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 64(1). https://doi.org/10.1128/AAC.01387-19/SUPPL_FILE/AAC.01387-19-S0001.PDF
- Kim, J. H., Cheng, L. W., Chan, K. L., Tam, C. C., Mahoney, N., Friedman, M., Shilman, M. M., & Land, K. M. (2020). Antifungal drug repurposing. *Antibiotics*, 9(11), 1–29. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9110812>
- Kim, K., Zilbermintz, L., & Martchenko, M. (2015). Repurposing FDA approved drugs against the human fungal pathogen, *Candida albicans*. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 14(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12941-015-0090-4>
- Laniado-Laborín, R., & Cabrales-Vargas, M. N. (2009). Amphotericin B: side effects and toxicity. *Revista Iberoamericana de Micología*, 26(4), 223–227. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2009.06.003>

- Li, D., Fan, S., Zhao, H., Song, J., Guo, L., Li, W., Xu, X., Li, Q., González-González, G. M., Xue, Y., Ayanlowo, O., & Guadalupe Frías De León, M. (2025). Worldwide trends and future projections of fungal skin disease burden: a comprehensive analysis from the Global Burden of Diseases study 2021. *Front. Public Health*, *13*, 1580221. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2025.1580221>
- Maertens, J. A. (2004). History of the development of azole derivatives. *Clinical Microbiology and Infection*, *10*, 1–10. <https://doi.org/10.1111/j.1470-9465.2004.00841.x>
- Man, M. A., Todea, D. A., Motoc, N. Ștefania, & Rajnoveanu, R.-M. (2023). Histoplasmosis: An Overview Treatment of Histoplasmosis. In E. Dantes & E. Dumea (Eds.), *Histoplasmosis* (p. Ch. 6). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.110365>
- MEJÍA-ARANGO, M. A., SANTA-VÉLEZ, C., CADAVID-SIERRA, M., VÉLEZ, L. M., COLMENARES, L. M., RESTREPO-JARAMILLO, B. N., & CARDONA-CASTRO, N. (2013). Estudio etiológico y epidemiológico de las micosis cutáneas en un laboratorio de referencia - Antioquia - Colombia. *CES Medicina*, *27*, 7–19.
- Nasr Esfahani, A., Golestannejad, Z., Khozeimeh, F., Dehghan, P., Maheronnaghsh, M., & Zarei, Z. (2019). Antifungal effect of Atorvastatin against *Candida* species in comparison to Fluconazole and Nystatin. *Medicine and Pharmacy Reports*. <https://doi.org/10.15386/mpr-1209>
- Nucci, F., Nouér, S. A., Capone, D., Anaissie, E., & Nucci, M. (2015). Fusariosis. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, *36*(5), 706–714. <https://doi.org/10.1055/S-0035-1562897>
- Ordóñez, N., Tobón, A., Arango, M., Tabares, A., De Bedout, C., Gómez, B., Castañeda, E., & Restrepo, A. (1997). Brotes de histoplasmosis registrados en el área andina colombiana. *Biomédica*, *17*(2), 105. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v17i2.941>
- Pushpakom, S., Iorio, F., Eyers, P. A., Escott, K. J., Hopper, S., Wells, A., Doig, A., Williams, T., Latimer, J., McNamee, C., Norris, A., Sanseau, P., Cavalla, D., & Pirmohamed, M. (2018). Drug repurposing: Progress, challenges and recommendations. In *Nature Reviews Drug Discovery* (Vol. 18, Issue 1, pp. 41–58). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrd.2018.168>
- Ramos-Ospina, N., Lambertinez-Álvarez, I. C., Hurtado-Bermúdez, L. J., Muñoz-Lombo, J. P., Vélez-Londoño, J. D., Valencia-Montagut, J. A., & Moncada-Vallejo, P. A. (2024). Management of disseminated histoplasmosis in a high-complexity clinic in Cali, Colombia. *Medical Mycology*, *62*(7). <https://doi.org/10.1093/MMY/MYAE058>
- Rios-Fabra, A., Moreno, A. R., & Isturiz, R. E. (1994). FUNGAL INFECTION IN LATIN AMERICAN COUNTRIES. *Infectious Disease Clinics of North America*, *8*(1), 129–154. [https://doi.org/10.1016/S0891-5520\(20\)30577-8](https://doi.org/10.1016/S0891-5520(20)30577-8)
- Santos, R., Ursu, O., Gaulton, A., Bento, A. P., Donadi, R. S., Bologa, C. G., Karlsson, A., Al-Lazikani, B., Hersey, A., Oprea, T. I., & Overington, J. P. (2016). A comprehensive map of

- molecular drug targets. *Nature Reviews Drug Discovery*, 16(1), 19–34.
<https://doi.org/10.1038/nrd.2016.230>
- Scully, M. C., & Baddley, J. W. (2018). Epidemiology of Histoplasmosis. *Current Fungal Infection Reports*, 12(1), 51–58. <https://doi.org/10.1007/S12281-018-0309-X/METRICS>
- Seagle, E. E., Williams, S. L., & Chiller, T. M. (2021). Recent Trends in the Epidemiology of Fungal Infections. In *Infectious Disease Clinics of North America* (Vol. 35, Issue 2, pp. 237–260). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2021.03.001>
- Sigera, L. S. M., & Denning, D. W. (2023). Flucytosine and its clinical usage. *Therapeutic Advances in Infectious Disease*, 10. <https://doi.org/10.1177/20499361231161387>
- Souza, C. M. de, Bezerra, B. T., Mellon, D. A., & de Oliveira, H. C. (2025). The evolution of antifungal therapy: Traditional agents, current challenges and future perspectives. *Current Research in Microbial Sciences*, 8, 100341. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2025.100341>
- Tupaki-Sreepurna, A., & Kindo, A. J. (2018). *Fusarium*: The versatile pathogen. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 36(1), 8–17. https://doi.org/10.4103/IJMM.IJMM_16_24
- Valencia, Y., Cáceres, D. H., de Bedout, C., Cano, L. E., & Restrepo, Á. (2020). Frequency of Invasive Fungal Disease in Adults: Experience of a Specialized Laboratory in Medellín, Colombia (2009–2015). *Journal of Fungi*, 6(1), 39. <https://doi.org/10.3390/jof6010039>
- Vanzolini, T., & Magnani, Mauro. (2024). *Old and new strategies in therapy and diagnosis against fungal infections*. 108, 147. <https://doi.org/10.1007/s00253-023-12884-8>
- Wall, G., Chaturvedi, A. K., Wormley, F. L., Wiederhold, N. P., Patterson, H. P., Patterson, T. F., & Lopez-Ribot, J. L. (2018). Screening a Repurposing Library for Inhibitors of Multidrug-Resistant *Candida auris* Identifies Ebselen as a Repositionable Candidate for Antifungal Drug Development. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(10). <https://doi.org/10.1128/AAC.01084-18>
- Walsh, T. J., & Dixon, D. M. (1996). Spectrum of Mycoses. *Medical Microbiology*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7902/>
- Wishart, D. S. (2006). DrugBank: a comprehensive resource for in silico drug discovery and exploration. *Nucleic Acids Research*, 34(90001), D668–D672. <https://doi.org/10.1093/nar/gkj067>
- World Health Organization. (2022). *WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action*.
- World Health Organization. (2025a). *Antifungal agents in development*. <https://www.who.int/observatories/global-observatory-on-health-research-and-development/monitoring/antifungal-agents-in-development>
- World Health Organization. (2025b). *R&D funding for neglected diseases by disease*. <https://www.who.int/observatories/global-observatory-on-health-research-and->

development/monitoring/r-d-funding-flows-for-neglected-diseases-by-disease-year-and-funding-category

Anexos

Anexo 1

Table_S1.docx. Complementaria del capítulo 3; Contiene información adicional sobre los compuestos evaluados y los pares de proteínas humana-*H. capsulatum* identificadas, incluyendo los alineamientos (equivalencias estructurales) entre los residuos del sitio de unión, así como referencias a informes previos sobre actividad antifúngica en otros hongos.