



# BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

LICENCIATURA EN QUÍMICO  
FARMACOBIOLOGO

**“Estudio *in silico* de sapogeninas esteroideas del  
efecto modulador de la activación de Kiss1R”**

Tesis para obtener el título de  
**LICENCIADO EN QUÍMICO  
FARMACOBIOLOGO**

Presenta:

**Vicente Morales Ángel de Jesús**

Director de tesis:

D.C. Victorino Gilberto Serafín Alatraste Bueno

Codirector de tesis:

D.C. Alan Carrasco Carballo

02 de junio, 2023



Facultad de Ciencias Químicas BUAP



Laboratorio de Elucidación y Síntesis  
en Química Orgánica



El presente trabajo se desarrolló bajo la dirección del Dr. Victorino Gilberto Serafín Alatriste Bueno y el Dr. Alan Carrasco Carballo en el laboratorio de Neuroendocrinología y en el Laboratorio de Elucidación y Síntesis en Química Orgánica bajo el soporte de la licencia Schrödinger, financiado por el Proyecto CONACyTPronaces-317580.

Permiso de Impresión

# ÍNDICE

ÍNDICE	4
RESUMEN	6
INTRODUCCIÓN	7
Kisspeptina y su receptor	7
Kisspeptina: activador del eje hipotalámico-pituitario-gonadal	8
Vía de señalización de la Kisspeptina	9
El sistema Kisspeptin/KISS1R en el ovario	10
<i>Esteroidogénesis</i>	10
Relación entre SOP y Kisspeptina	11
Relación de Kisspeptina con el cáncer de mama	13
Modelado de la proteína	17
Fuentes de sapogeninas	20
Potencial médico de la diosgenina	21
Diosgenina contra el cáncer	21
JUSTIFICACIÓN	22
OBJETIVOS	22
Objetivo general:	22
Objetivos específicos:	22
METODOLOGÍA	23
Análisis <i>in silico</i> del receptor KISS1R	23
Modelado de las kisspeptinas y p-234	23
Docking molecular	24
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	25
Análisis estadístico	26
Análisis estadístico de los resultados obtenidos por medio de la prueba de Kruskal Wallis	28
Análisis estadístico para el carbono 2 (R1)	28
Análisis estadístico para el carbono 3 (R2)	29
Análisis estadístico para el carbono 4 (R3)	31
Análisis estadístico para el carbono 5 (R4)	32
Análisis estadístico para el carbono 6 (R5)	34

Análisis estadístico para el carbono 11 (R6)	35
Análisis estadístico para el carbono 12 (R7)	37
Análisis estadístico para el carbono 17 (R8)	38
Análisis estadístico para el carbono 25 (R9)	39
Análisis espacial	41
Sapogeninas Agonistas	43
Sapogeninas Antagonistas	46
Sapogeninas con actividad dual	48
Sapogeninas sin Actividad	50
CONCLUSIÓN	52
Referencias	53

## RESUMEN

*El gen KiSS1, se ubica en el cromosoma humano 1q32 y codifica un péptido de 145 aminoácidos que después se divide por proteólisis en péptidos más cortos conocidos como kisspeptinas (KP): KP-10, KP-13, KP-14 y KP-54 (metastina) por el número de aminoácidos que poseen. Estas KPs se unen al receptor 54 acoplado a proteína G (GPR54), también llamado KISS1R que activa las proteínas G intracelulares G $\alpha$  q/11.*

*En la placenta y en el cerebro se han encontrado altos niveles de KiSS-1. Además, existe gran expresión del receptor en la hipófisis, páncreas y médula espinal.*

*El gen KiSS1, las KPs y el receptor KISS1R regulan el desarrollo y la progresión de varios tipos de cáncer. Existe un papel dual de la kisspeptina, por una parte actúan como supresores de la tumorigénesis y la metástasis en muchos tipos de cáncer, pero en otros cánceres como el de mama e hígado son promotores de la enfermedad caracterizando así a las Kisspeptina con funciones duales, lo que destaca la importancia de su estudio. Dadas sus funciones en diferentes células del cuerpo humano, KiSS1, KPs y KISS1R son moléculas potencialmente importantes en el desarrollo de nuevas terapias y/o como marcadores de pronóstico para el cáncer.*

*En esta tesis estudiamos sapogeninas, las cuales tienen características anfipáticas y han mostrado tener diferentes efectos terapéuticos en varias enfermedades que afectan al humano.*

*A través de Docking molecular evaluamos la interacción con el receptor KISS1R; analizando tanto los aminoácidos del sitio de unión y los radicales que interactúan con cada carbono que forma la base de las sapogeninas, además de los tipos de interacciones que se presentan. Para este análisis se hizo un modelado de la proteína humana KISS1R (Q969F8) obteniendo su secuencia aminoacídica de la base de datos UNIPROT y posteriormente un modelado de proteínas por homología. Para el docking molecular se utilizó la plataforma Schrödinger, la preparación del ligando se hizo con la herramienta LigPrep y la del receptor con Protein Preparation Wizard.*

*Por la naturaleza de los datos, se emplearon pruebas no paramétricas como la de Kruskal-Wallis, para conocer si existían o no diferencias estadísticamente significativas entre las 154 sapogeninas evaluadas, tomando en cuenta las combinaciones de funcionalización y estereoquímica que forman la base de cada sapogenina. También se hizo un análisis espacial para observar los sitios en los que se unían los ligandos con KP-10 y la P-234, frente al receptor y de este modo determinar cuáles eran aquellos aminoácidos que los diferenciaba para que uno actuara como un modulador positivo y el otro como negativo. A partir de esto., evaluar cada sapogeninas frente al sitio de unión del receptor y contrastar con los ligandos comerciales para saber qué comportamiento presentaba, ya sea como un modulador positivo o como negativo.*

*De 154 moléculas se seleccionaron aquellas que presentan actividad agonista, antagonista, dual y sin actividad tomando en cuenta los aminoácidos y las interacciones que presentaban en comparación a los ligandos comerciales.*

*En síntesis, se obtuvieron sapogeninas agonistas y antagonistas. En el último caso, se pueden emplear en la inhibición del receptor para tratar enfermedades como el síndrome de ovario poliquístico. También para la investigación básica por su actividad dual. Para esto último se deben realizar más estudios enfocados a la evaluación de las dosis mínimas efectivas de dichas moléculas y conocer el efecto terapéutico.*

# INTRODUCCIÓN

## Kisspeptina y su receptor

En 1996, la kisspeptina (KISS1) y su gen codificante *KiSS1* se identificaron por primera vez gracias a Welch y sus colegas de la Facultad de Medicina de la Universidad Estatal de Pensilvania, Hershey, Pensilvania. [1] En un principio buscaban a los genes responsables de la supresión de la metástasis en híbridos de células de cromosoma 6/melanoma y de este modo se dio el descubrimiento. [2,3]

Se sugirió que este gen es supresor del melanoma maligno humano. [4,5]

Las kisspeptinas son una familia de péptidos codificados por el gen *KiSS1*; la proteína precursora de 145 aminoácidos se escinde proteolíticamente en péptidos más cortos y el número de aminoácidos restantes se indica mediante su sufijo. [3]

En humanos, *KiSS1* está ubicado en el brazo largo (q) del cromosoma 1 en q32. *KiSS1* codifica un prepro péptido intermedio inestable y biológicamente inactivo de 145 aminoácidos, que después de la traducción, se convierte en cuatro péptidos biológicamente activos que se distinguen en función de su número de aminoácidos: kisspeptina-54, -14, -13 y -10. [3]

Las figura 1A y 1B muestran la estructura tridimensional de la Kisspeptina 10. Kisspeptin-54 se denominó inicialmente como "metastina" debido a su capacidad para inhibir la metástasis tumoral. Este péptido ha sido considerado como el principal producto del gen *KiSS1* humano. [3,4]

En los seres humanos, la kisspeptina se biosintetiza en dos estructuras del hipotálamo: el núcleo arqueado (ARC) y el núcleo periventricular (PNV) ventral anterior. [5]

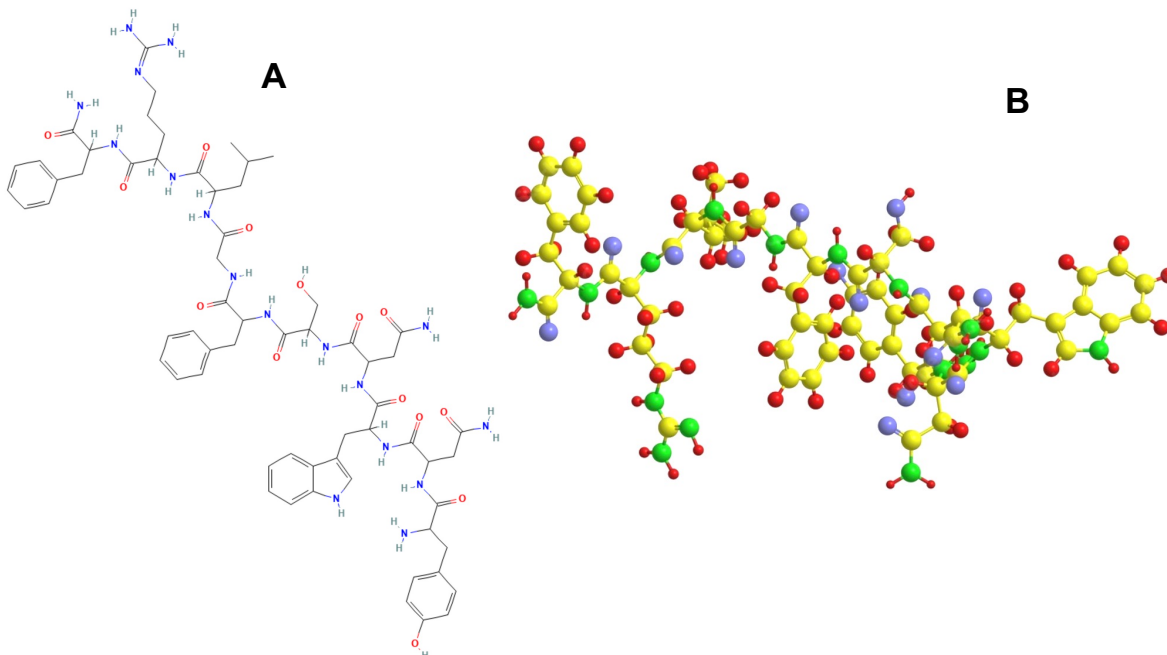


Figura 1. A) Estructura 2D de la Kisspeptina 10. B) Estructura molecular de Kisspeptina (metastina)., representación 3D. Tomado de National Center for Biotechnology Information. [7,8]

## Kisspeptina: activador del eje hipotalámico-pituitario-gonadal

El desarrollo sexual depende de la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-gónada. En este eje están involucrados varios moduladores que permiten su funcionamiento. Recientemente se ha identificado que la kisspeptina puede modular también su actividad. [9]

La kisspeptina estimula el eje reproductivo neuroendócrino (hipotálamo-hipófisis-gónada). Los esteroides sexuales regulan la expresión del ARNm de KiSS1 en diferentes núcleos dentro del prosencéfalo. Se ha descrito que en el núcleo periventricular anteroventral (AVPV), la kisspeptina es liberada por las neuronas kisspeptinérgicas, alcanzando a sus receptores KISS1R en las neuronas GnRHérgicas del núcleo arcuato, permitiendo su activación y con ello la liberación de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) (Figura 2), donde posteriormente ocurre la liberación de la hormona Luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH). [5]

A través de la secreción de dichos esteroides sexuales, estas se retroalimentan para regular la actividad de las neuronas kisspeptina, y así inhibir la expresión de KISS1 en el Arc e induciendo su expresión en el AVPV. [9, 10]

El efecto inductivo de los esteroides sexuales sobre la expresión de Kiss1 en el AVPV puede contribuir al aumento preovulatorio de LH en las mujeres (Figura 2). [9]

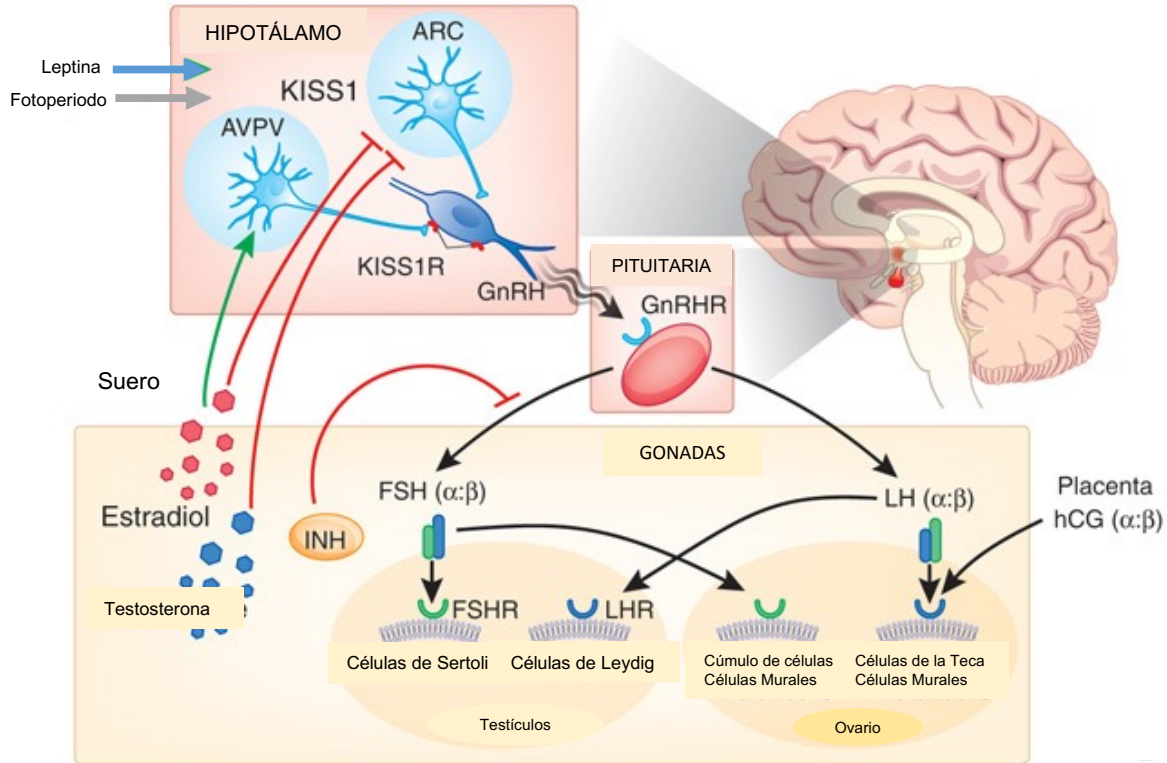


Figura 2. Receptor de Kisspeptina en el cerebro y su relación con el eje HPG. Tomado y modificado de Kisspeptin Flipper. ARC-Núcleo arcuato, AVPV-Núcleo periventricular anteroventral, GnRH- Hormona liberadora de gonadotropina, LH- hormona Luteinizante. [9]

## Vía de señalización de la Kisspeptina

La kisspeptina activa varias señales a través de KISS1R, este receptor KISS1R está acoplado a la proteína G, pertenece al subgrupo de receptores típicos asociados a proteína Gq/11. Su mecanismo de acción propuesto es: la kisspeptina se une a KISS1R, la proteína Gq/11 fosforilada activa a la fosfolipasa C (PLC)-β, activando varios segundos mensajeros, incluida la hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP<sub>2</sub>), la acumulación de inositol-(1, 4,5)-trifosfato (IP<sub>3</sub>) y diacilglicerol, activación de proteína quinasa C (PKC) y movilización y liberación de Ca<sup>2+</sup> intracelular. Resaltamos la activación de PKC, ya que es necesaria para la síntesis de progesterona inducida por LH en los folículos preovulatorios de ratas, gallinas, cerdos y codornices. Además, se requiere la activación de la actividad de PKC para promover la cascada de señalización de ERK que finalmente facilita la producción de progesterona inducida por LH. Peng y colaboradores mostraron que la kisspeptina promovía la síntesis de progesterona mediante la fosforilación de ERK1/2. Por lo tanto, la vía de señalización PLC-PKC-ERK muy probablemente media la síntesis de progesterona en las células de la granulosa-lútea (Figura 3). [10]

El Ca<sup>2+</sup> se almacena inicialmente en el retículo endoplásmico y siguiendo la señal de IP<sub>3</sub>, se libera Ca<sup>2+</sup> a través de canales específicos, por lo que se eleva la concentración de Ca<sup>2+</sup> libre en el citoplasma. La LH induce aumento rápido de

$Ca^{2+}$  intracelular que se libera de las reservas de  $Ca^{2+}$  en las capas del cúmulo y, posteriormente, aumenta la salida de  $Ca^{2+}$  hacia el ovocito. Se ha propuesto que el aumento de  $Ca^{2+}$  en el ovocito desempeña un papel en el control de la maduración del ovocito, ya sea espontánea o inducida por gonadotropinas, posiblemente al modular las concentraciones de AMPc intracitoplasmático a través de un adenilato ciclasa sensible a  $Ca^{2+}$ . [10] En la figura 3, presenta dicha vía.

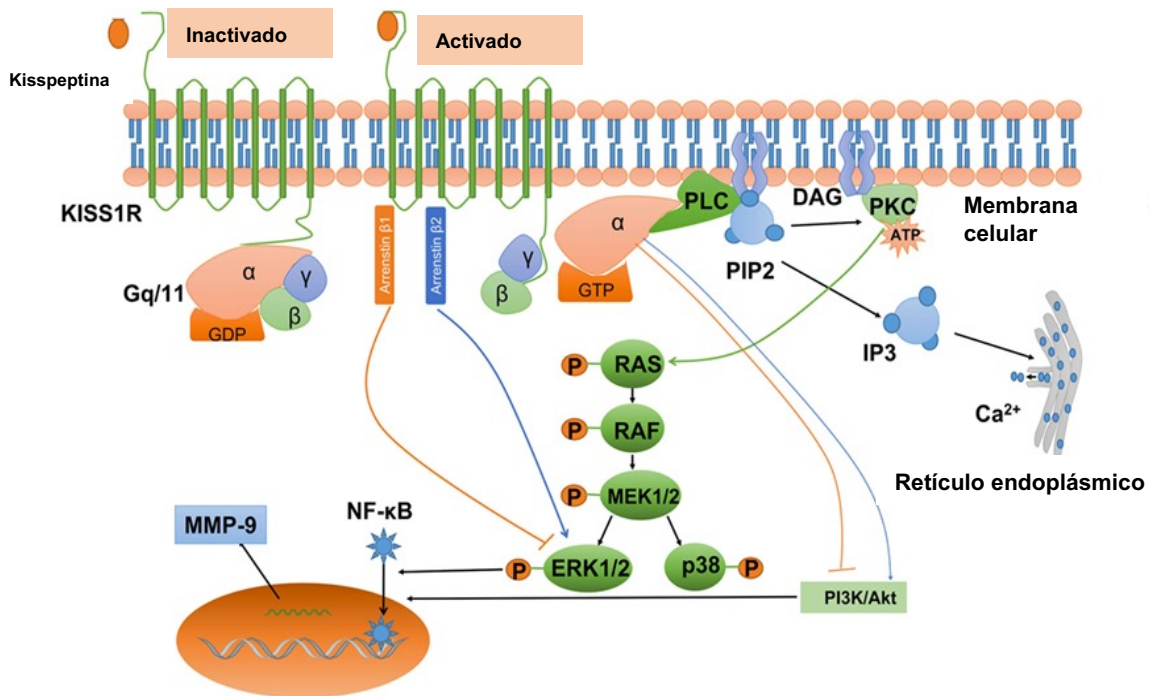


Figura 3. Vía de señalización intracelular de Kisspeptina y su receptor acoplado a proteína G. Fosfolipasa C (PLC); Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2); Inositol trifosfato (IP3); Proteína quinasa C (PKC). [10]

## El sistema Kisspeptin/KISS1R en el ovario

La expresión en los folículos ováricos de kisspeptina/KISS1R aumenta gradualmente a medida que crecen los folículos, con un nivel más alto en la etapa preovulatoria en humanos que se debe en parte al efecto estimulante de las gonadotropinas gradualmente aumentadas sobre la expresión de kisspeptina en esta etapa. [10]

## Esteroidogénesis

El papel de las kisspeptinas en la regulación del sistema endocrino se identificó por primera vez en 2001, se expresan en gran medida en la placenta humana, la glándula pituitaria, el páncreas y la médula espinal y era un estimulador endógeno de la oxitocina. La síntesis de progesterona está controlada por varias enzimas como la proteína reguladora aguda esteroidogénica (StAR), el citocromo P450 (enzima de escisión de cadena lateral P450<sub>scc</sub>) y enzima 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β-HSD). En células lúteas de rata, el tratamiento con kisspeptina no tuvo efecto significativo en el nivel de ARNm de 3β-HSD, mientras que el

tratamiento conjunto con kisspeptina y hCG aumentó significativamente la transcripción de  $3\beta$ -HSD. [10]

## **Relación entre SOP y Kisspeptina**

De acuerdo con la evidencia existente de la kisspeptina en la regulación del eje HPG, es biológicamente plausible que la cantidad de neuronas que expresan kisspeptina pueda estar correlacionado positivamente con el nivel de LH, por lo tanto, también se puede esperar que los niveles de kisspeptina en plasma/suero se asocien positivamente con el nivel de LH en suero, aunque lo que no se sabe es si estos niveles de kisspeptina circulantes son proporcionales al número de neuronas de kisspeptina en el hipotálamo. [11]

Tanto la neurona kisspeptina como la neurona KND-y pueden generar y liberar kisspeptina, como se muestra en la figura 4, donde esta se une a los receptores expresados por las neuronas que liberan a la GnRH, facilitando la liberación de la misma, aumentando la expresión de quie?. Por lo tanto, se espera que la kisspeptina sobreexpresada aumente la actividad del eje Hipotálamo-Pituitario-Gonadal, lo que conduce a una mayor relación LH/FSH y mayor secreción de andrógenos, lo que altera la función y la morfología del ovario y hace que el acné y el hirsutismo sean más susceptibles. [11]

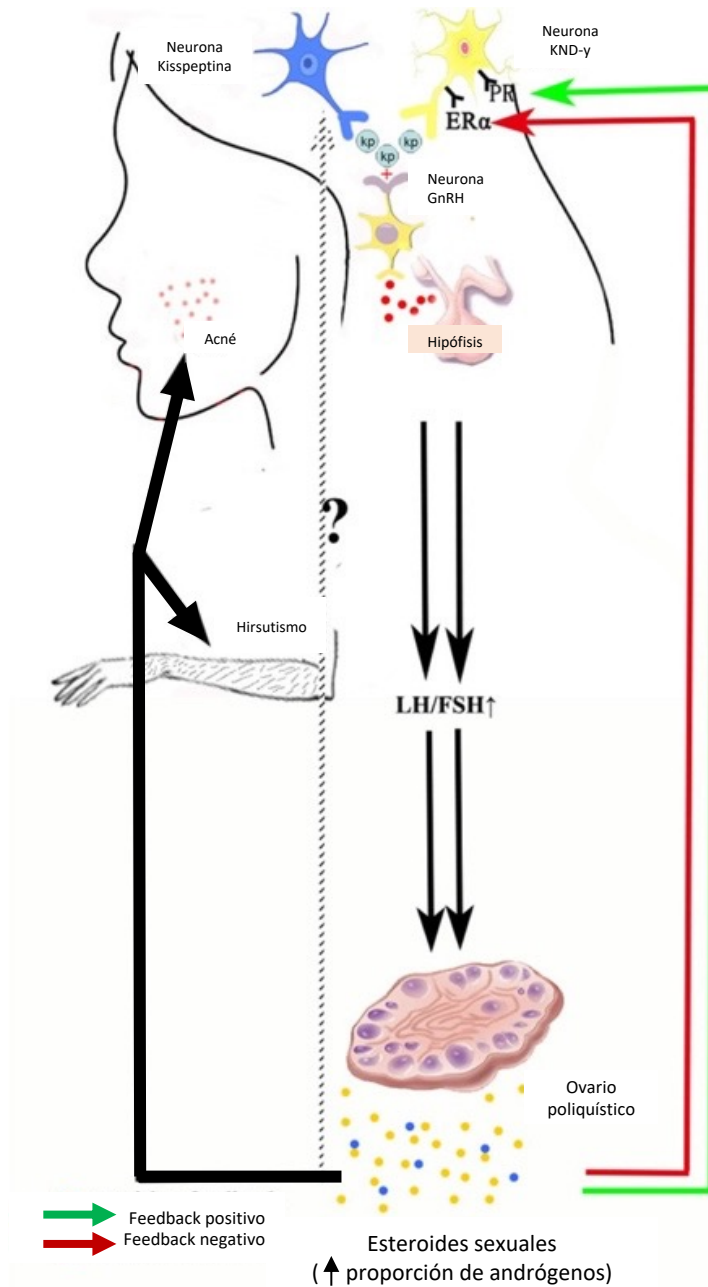


Figura 4. Kisspeptina y SOP. Tomado y modificado de Kisspeptin and Polycystic Ovary Syndrome [11]. Tanto la neurona kisspeptina como la neurona KND-y pueden generar y liberar kisspeptina, que se une a los receptores expresados por la neurona GnRH, lo que facilita la liberación de GnRH. Por lo tanto, se espera que la kisspeptina sobreexpresada provoque un aumento de la actividad del eje HPG, lo que conduce a una mayor relación LH/FSH y una secreción excesiva de andrógenos, lo que altera la función y la morfología del ovario y hace que el acné y el hirsutismo sean más susceptibles. neurona KND-y, neurona Kisspeptin-Neurokinin B-Dynorphin; kp, kisspeptina; GnRH, hormona liberadora de gonadotropina; LH, Hormona Luteinizante; FSH, Hormona Follicular Estimulante; PR, receptor de progesterona; ER $\alpha$ , receptor de estrógeno- $\alpha$ .

## Relación de Kisspeptina con el cáncer de mama

El sistema kisspeptina interviene en otras situaciones fisiológicas, como lo son los procesos de cáncer, de los cuales destaca el cáncer de mama. [1,16]

En el cáncer de mama se ha observado, que la expresión de la proteína KISS1 aumenta significativamente en los tumores primarios en comparación con los tejidos mamarios normales. También se encontró que los niveles de expresión de KISS1 eran más altos en pacientes con enfermedad metastásica en comparación con individuos sanos, y que esto se asoció con un mal pronóstico del paciente. [1]

Los tumores de mama se dividen en tumores con receptor de estrógeno  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) positivo y ER $\alpha$  negativo, y el papel de KISS1 y KISS1R en el grupo positivo es contradictorio la cual podemos observar en la figura 5 junto a otros cánceres donde se involucra la expresión de kisspeptina o del receptor. [1]

El estradiol (E2) a través de su receptor ER $\alpha$  está involucrado en el crecimiento y desarrollo normal de los conductos mamarios. Está bien establecido que el estrógeno está asociado con un mayor riesgo de cáncer de mama. Además se ha mostrado que E2 regula negativamente la expresión de KISS-1 y KISS1R. También que en los tumores primarios positivos para ER $\alpha$ , los niveles de KISS1 son más bajos que en los tumores negativos para ER $\alpha$ . [1]

A pesar de que la kisspeptina y su receptor KISS1R juegan un rol en la prevención o para inhibir la metástasis en varios tipos de cáncer, sigue existiendo controversia con respecto a su papel en el cáncer de mama, de ahí la dualidad que puede presentar dicho péptido. Estudios contrastantes han demostrado funciones pro o antimetastásicas para este péptido y su receptor en el cáncer de mama. Por ejemplo, la expresión de kisspeptina se ha demostrado estar elevado en tumores de mama metastásicos en varios estudios, mientras que otro mostró lo contrario donde hay reducción del gen KISS1. Además, los estudios *in vitro* también han arrojado resultados con conclusiones contrastantes con respecto a la kisspeptina y la función KISS1R en el cáncer de mama, donde algunos sugieren que actúan de manera pro-metastásica, mientras que otros sugieren que actúan de manera forma antimetastásica. De hecho, se ha demostrado que la sobreexpresión de KISS1R en sí mismo depende de la forma en que las células responden y, por lo tanto, los estudios se basan en líneas celulares que sobre-expresan KISS1R. [16]

Después de distintos análisis, se ha propuesto como hipótesis que en el subtipo de cáncer de mama que la kisspeptina y KISS1R tienen relación con la metástasis. Las células de cáncer de mama con receptor de estrógeno positivo responden a la kisspeptina al reducir la migración y la proliferación. Por el contrario, varias células negativas para receptores de estrógenos las líneas responden a la kisspeptina aumentando la migración, la invasión y la proliferación. [16]

## Estudios sobre otros tumores y la participación de la Kisspeptina

Se ha demostrado que la Kisspeptina juega un rol importante en distintos cánceres además de aquellas situaciones ya mencionadas, como lo es el cáncer colorrectal (CCR), siendo este uno de los tipos de cáncer más frecuentes y mortales; siendo el segundo tumor más frecuente entre las mujeres y el tercero en los hombres. [1,2]

Una complicación importante del CCR es la progresión de la enfermedad donde puede llegar a metástasis hepáticas (figura 5). Las metástasis de CRC están asociadas completamente a expresiones de metaloproteinasa de matriz (MMP)-9. El análisis de la expresión de KiSS1 y KISS1R en metástasis hepáticas colorrectales mostró la existencia de una correlación con el pronóstico de los pacientes. Los tejidos de CRC con niveles bajos de KiSS1, se observa que expresan niveles altos de MMP-9 y tienen la capacidad de hacer metástasis a zonas distantes con mayor frecuencia. [1]

Chen y colaboradores demostraron que el gen KiSS1 disminuye el potencial metastásico de las células CRC al inhibir la expresión de MMP-9. La sobreexpresión de KiSS-1 demostró una supresión de la proliferación y la invasividad de las células HCT-119 CRC y mejoró su apoptosis al reducir la expresión de MMP-9 mediante el bloqueo de la vía PI3K/Akt/NF-κB. [1]

En cuanto a los tejidos malignos, se ha demostrado que el nivel de expresión de KiSS-1 se correlaciona negativamente con la estadificación de Dukes, la estadificación TNM (tumor, ganglio linfático y metástasis), donde el tamaño del tumor y la afectación de los ganglios linfáticos se ven involucrados. La reducción de KISS1R también se asocia con un mal pronóstico de los pacientes; por lo que KISS-1 y MMP-9 podrían considerarse como marcadores pronósticos en pacientes con CCR (tabla 1). [1, 2]

También se ha demostrado una correlación inversa entre KiSS-1 y MMP-9 en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC). Se ha informado que el ARNm y la proteína de KiSS-1 y MMP-9 se correlacionan con el estadio de la enfermedad, la metástasis y la supervivencia de los pacientes. En particular, se encontró que la expresión de KiSS-1 era más baja en los tejidos metastásicos en comparación con los tumores primarios, lo que respalda la idea de que KiSS-1 puede considerarse un supresor de metástasis en NSCLC. [1]

Además, encontraron que las células recolectadas de la enfermedad en etapa baja mostraron una alta tasa de apoptosis y detención en la fase G1, lo que sugiere un papel del sistema KiSS-1/KiSS1R no solo en la invasión y migración, sino también en la apoptosis y los procesos del ciclo celular. [1]

Otro tipo de cáncer en el que la expresión de KiSS-1 se correlaciona con el estadio y el grado del tumor es el cáncer de vejiga (tabla 1). Sánchez-Carbayo y

colaboradores [1] encontraron niveles más bajos de KiSS-1 en tejidos de cáncer de vejiga en comparación con su contraparte normal; además, documentaron que la pérdida de KiSS-1 está asociada con la progresión del cáncer de vejiga y el resultado clínico. [1,2]

Sucesivamente, Cebrian y colaboradores (2018) identificaron silenciamiento epigenético de KiSS-1 debido a una hipermetilación de secuencias CpG cerca de su región promotora, que se correlaciona con niveles más bajos de transcripciones de KiSS-1 en el cáncer de vejiga invasivo en comparación con los tumores superficiales. Estos hallazgos resaltan el valor de KiSS-1 como biomarcador de pronóstico. Existen otros cánceres en los cuales se expresa KISS-1/KISS1R como lo muestra la figura 6, donde los niveles de esta se ven aumentadas o disminuidas, lo que genera un gran interés como blanco terapéutico y así regular su expresión.[2]

### Expresión de KISS1/KISS1R en tumores de distintos pacientes

Tipos de cáncer	Evidencia clínica: expresión de KISS1/KISS1R y niveles plasmáticos de kisspeptina	Tamaño de la muestra
Cáncer de mama	Aumento de ARNm y proteína de KISS1 en tumores de mama primarios y con metástasis en ganglios linfáticos	normales: 33 Tumorales: 124
	Aumento del ARNm de <i>KISS1</i> con el grado de los tumores de mama; tumores de mama ERα positivos; expresó siete veces menos <i>KISS1</i> que los tumores de mama ERα-negativos.	Tumores: 92
	Proteína KISS1/KISS1R aumenta frente al control	No tumorales: 11 (enfermedad fibroquística) Tumorales: 43 adenocarcinomas de mama resecados
	La expresión de la proteína KISS1 se asocia positivamente con el estado positivo de los ganglios linfáticos.	Microensayo de tumor de mama (n = 48)
Cáncer de mama triple negativo (TNBC)	Aumento de ARNm y proteína de KISS1/KISS1R en tumores TNBC primarios en comparación con mamas sanas.	Saludable: 13 TNBC: 20
Carcinoma hepatocelular (CHC)	Aumento de la expresión de ARNm de <i>KISS1R</i> en CHC frente a lo normal; sin cambios en los niveles de <i>KISS1</i> .	Normal: 8 CHC: 60

	Inmunorreactividad de KP-54 asociada con grado tumoral, estadio de mal pronóstico	Normal: 10 CHC: 142
	Proteína KISS-1 más baja en CHC vs normal.	Normal: 16 CHC: 150 pacientes
cáncer de páncreas	Alto nivel de inmunotinción KP-54/KISS1R asociado con una supervivencia más prolongada.	Tumores: 53 Normal: no informado
	<i>ARNm de KISS1</i> más bajo en tejido de cáncer de páncreas vs control. Mayor expresión de <i>KISS1R</i> en tumores pancreáticos frente a controles emparejados.	Normal adyacente: 5 Tumores: 30
Cáncer colorrectal (CCR)	Disminución de la expresión de <i>KISS1</i> asociada con metástasis en ganglios linfáticos y peor pronóstico.	CDN: 175
Disminución de la expresión de <i>KISS1/KISS1R</i> en tejidos tumorales en comparación con los normales.	Normal: 80 CRC: 94	
	KP-54 medio (CRC): $86,2 \pm 20,5$ ng/ml; Media de pacientes KP-54 (control): $49 \pm 12,7$ ng/ml	Controles: 59 CRC: 81
	Disminución de la expresión del ARNm de <i>KISS1</i> y de la proteína KP-54: mayor profundidad de la invasión y metástasis en los ganglios linfáticos.	Normal: 142 CRC: 126
Cáncer de vejiga	<i>KISS1</i> hipermetilado en ~83 % de los tumores, la pérdida de expresión de <i>KISS1</i> inducida por epigenética se asoció con supervivencia deficiente	804 tumores primarios de vejiga
	Disminución o pérdida de la expresión de <i>KISS1</i> en tumores vesicales invasivos ( $n = 173$ ) vs controles	Urotelio normal: 25 Tumores: 173
Carcinoma de células renales (CCR)	Mayor ARNm de <i>KISS1R</i> en RCC vs corteza renal no neoplásica	No neoplásicos: 25 Tumores: 25
Carcinoma de ovario	Menor marcaje de <i>KISS1</i> en biopsias primarias de cáncer epitelial de ovario (COE) frente al control; los pacientes con tejidos negativos para <i>KISS1</i> tuvieron una tasa de supervivencia más baja en	COE: 207 Control: 60

	comparación con los pacientes positivos para KISS1	
	Pronóstico favorable y supervivencia general asociados con la inmunorreactividad de KISS1 y KISS1R	Microarray de tejido de carcinomas de ovario: 518
	Kisspeptina plasmática mediana: estadio 1 ( n = 9): 17,4 pmol/L, estadios 2-4 ( n = 23): 7,8 pmol/L, control: 11,4 pmol/L	Pacientes con cáncer: 31 Voluntarios sanos: 31

*Tabla 1. Tabla de expresión de KISS1/KISS1R en tumores de pacientes. [2]*

## KISS1R: una diana clínica eficaz contra el cáncer

Para el desarrollo de las terapias clínicas basadas en Kisspeptina es crucial comprender completamente cómo administrar efectivamente Kisspeptina nativo y análogos (administración pulsátil versus administración crónica) para lograr el resultado deseado (por ejemplo, señalización KISS1R prolongada y gonadotropinas elevadas). Para la infertilidad en contraste con la terminación de la señalización de KISS1R y la disminución de las hormonas gonadotropinas y esteroides para el tratamiento de enfermedades dependientes de hormonas). Delinear y comprender la dinámica de la señalización de KISS1R ayudará a diseñar protocolos para lograr estos regímenes estimulantes e inhibidores. Este conocimiento se puede aplicar luego en la administración de Kisspeptina en condiciones fisiológicas y patológicas. [6]

Sin embargo, al ser KISS-1R, un receptor que responde a compuestos esteroidales, ya que su principal ligando son los esteroides sexuales, es aquí donde entran las sapogéninas como una alternativa para el uso de nuevas moléculas como lo son las sapogeninas, sin embargo, no se conoce un modelo tridimensional de dicha proteína, por lo que una alternativa es modelar las proteínas para extender el estudio sobre la misma. [6]

## Modelado de la proteína

El modelado comparativo de proteínas (MCP) es una técnica predictiva que permite obtener una aproximación de la estructura atómica de una cadena polipeptídica con base a estructuras conocidas de proteínas relacionadas (casi siempre homólogas), llamadas moldes o "templetes". Este modelado de proteínas se puede aplicar en el análisis del efecto de mutaciones hasta la predicción de ligandos y actividades catalíticas, en función de la calidad de los modelos, que a su vez depende de su semejanza con las estructuras molde utilizadas. [19]

Cuando una secuencia de estructura desconocida tiene un homólogo claro de estructura conocida se puede modelar basándose en esta estructura. Si la homología es alta y el alineamiento es bueno, las regiones con estructura secundaria (core de la proteína) no suelen tener problemas a la hora de modelarse, para ellas se toman las coordenadas del esqueleto y los aminoácidos de la

estructura molde. Para las regiones “loop” se usan distintas aproximaciones dependiendo del programa usado. Para las cadenas laterales se usan librerías de rotámeros y dinámica molecular o minimización de energía como lo muestra la figura 5. [19]

### **SWISS-MODEL**

Hay muchos programas que hacen modelado por homología, sin embargo, suelen ser complejos de usar y suelen requerir conocimiento especializado. SWISS-MODEL tiene una interface WWW que lo hace sencillo de usar, es automático y su fiabilidad es comparable a otros programas mas complejos. además realiza todo el proceso, desde la búsqueda de proteínas cristalizadas homólogas hasta la generación del modelo 3D final. [19,20]

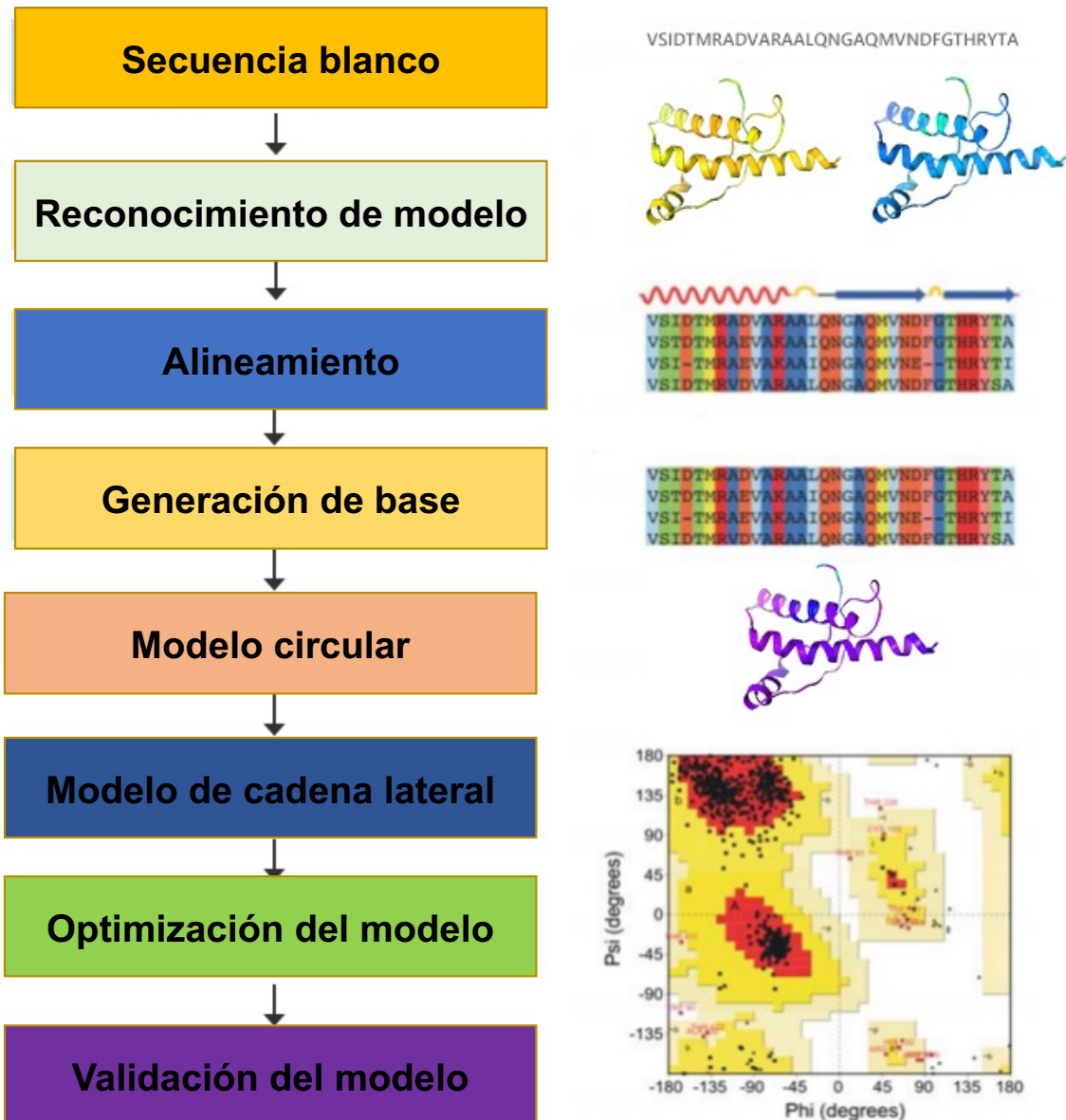


Figura 5. Guía para la elaboración de un modelado de proteína por homología. Imagen modificada tomada de Profacgen [21].

La opción de "modelo aproximado" comprueba si hay una estructura homóloga para poder hacer el modelado, si existe, genera un primer modelo y datos que son necesarios para hacer luego el modelo refinado. [19,20]

Principales problemas: Rotameros y modelado de loops. El modelado por homología presenta dos limitaciones importantes.: por un lado, predecir las posibles disposiciones espaciales de las cadenas laterales de los residuos que conforman la cadena peptídica. [20]

## Sapogeninas triterpénicas y esteroidales

Para nuestro grupo de trabajo, las sapogeninas son moléculas de intereses científico. Consideramos que las sapogeninas podrían interactuar con el receptor KISS1R, lo cual pueda abrir puertas para usarlas como moduladores de las funciones que realiza el receptor. [12]

Las sapogeninas triterpénicas y esteroidales son un amplio grupo de moléculas de naturaleza anfipática que están presentes en gran cantidad de plantas superiores, donde destacan las del género *Dioscorea*. Estructuralmente se compone de una parte hidrofílica y otra hidrofóbica, llamada sapogenina. Dentro de este último grupo se encuentra la **diosgenina**, esta puede tener estructuras triterpenoides o esteroideas (Figura 6), la cual ha probado tener amplios usos en el área médica, por ejemplo, como precursor común de fármacos esteroideos. [12]

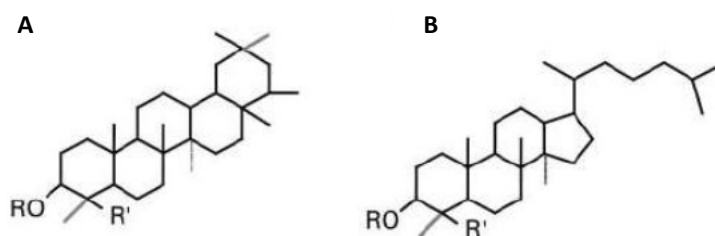


Figura 6. Estructura básica de las sapogeninas: A) triterpenoide y B) esteroide. [12]

La diferencia de los núcleos se encuentra en el número de carbonos que forman parte de la aglicona, siendo para la de tipo esteroide con 27 átomos de carbono; sin embargo, ambas tienen la misma vía biogenética. [12]

Además, este compuesto ha mostrado tener otras actividades biológicas, como antiinflamatorias, puesto que reduce la producción de mediadores inflamatorios, y antimetastásicas, por inhibir factores angiogénicos como la integrina y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor). También se han reportado propiedades antialérgicas, al suprimir la producción de IgE, y antioxidantes. [12]

## Fuentes de sapogeninas

En las plantas, las sapogeninas (saponinas) tienen funciones antimicrobianas, antifúngicas y plaguicidas [12]. Estos efectos biológicos se han asociado con su capacidad de permear las membranas de las células por esa naturaleza anfipática. Las sapogeninas se extraen de plantas como *Dioscorea* sp., *Trigonella* sp., *Costus* sp. y *Smilax* sp. De estas especies en particular, se obtiene la dioscina (Figura 7), una sapogenina que por un proceso de hidrólisis ácida o enzimática genera una sapogenina esteroidea conocida como **diosgenina**. [14]

## Potencial médico de la diosgenina

La diosgenina tiene importancia farmacológica, ya que muchos medicamentos esteroideos, como hormonas sexuales y corticoesteroides, se obtienen de forma semisintética a partir de este precursor natural. [14]

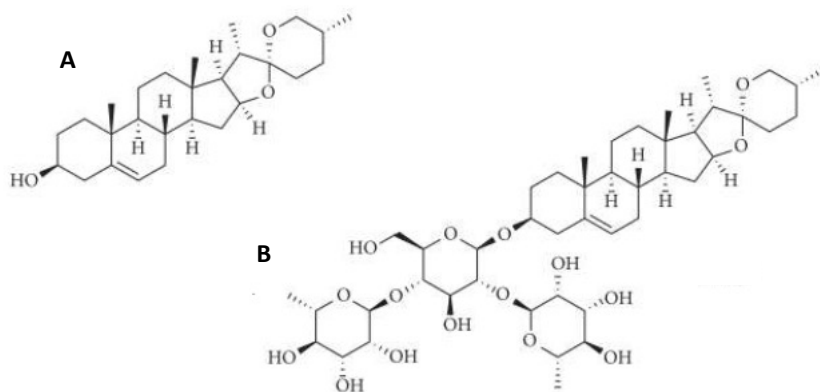


Figura 7. Estructura química de la diosgenina y la dioscina. [14]

## Diosgenina contra el cáncer

El cáncer es una enfermedad que tiene un impacto importante en la salud humana, siendo esta una de las principales causas de muerte año tras año, lo que hoy en día de hoy conlleva a una búsqueda insaciable por encontrar nuevos fármacos o productos farmacéuticos. [13]

En años recientes y la actualidad, ha habido una gran tendencia por obtener precursores de fármacos con efectos anticancerígenos a partir de productos naturales provenientes de plantas, microorganismos u organismos marinos, donde estos han mostrado ser una fuente eficaz para el desarrollo de nuevas moléculas bioactivas. [14]

La diosgenina es una de estas moléculas y siendo esta la más estudiada, la cual ha demostrado tener interesantes propiedades anticancerígenas y presenta cierto perfil de uso seguro. Su actividad se asocia a la regulación de múltiples vías de crecimiento, diferenciación y muerte celular, arresto del ciclo celular, modulación de la actividad de caspasas, entre otras. [12]

La diosgenina ha demostrado ser un inductor de apoptosis a través de diversos mecanismos dependiendo del tipo de línea celular entre las cuales resaltan las células de osteosarcoma y las células de cáncer de mama donde ocasiona un un arresto celular, mientras que en líneas celulares de cáncer de pulmón se ha visto que a concentraciones superiores a 5  $\mu\text{mol/L}$  la actividad de telomerasas se ven suprimidas. [15]

# JUSTIFICACIÓN

El receptor KISS1R es una proteína que ha sido localizada principalmente en neuronas del sistema nervioso central sin embargo, estudios recientes han evidenciado su presencia en células de diferentes órganos periféricos.

En el hipotálamo, el receptor KISS1R es un activador de las neuronas GnRHérgicas, un fenómeno asociado al inicio de la pubertad en mamíferos la actividad sexua de los individuos adultos.

En otros órganos periféricos como páncreas, médula espinal, ganglios linfáticos, tejido adiposo y bazo, el receptor KISSR está involucrando en el proceso de desarrollo celular, permitiendo la diferenciación y maduración celular. Además, se ha asociado en procesos de cáncer, siendo considerado un blanco molecular para el manejo de esta patología.

Es importante destacar, que las saponinas son moléculas con alto impacto médico y de investigación. Por lo cual, consideramos que el estudio *in silico*, de las saponinas en relación a sus acciones sobre el receptor KISS1R puede darnos información de su interacción y su posible aplicación médica.

## OBJETIVOS

### Objetivo general:

- Analizar el efecto agonista/antagonista para el receptor KISS1R de las saponinas espirostánicas y su posible uso contra distintos tipos de cánceres.

### Objetivos específicos:

- Analizar la interacción energética *in silico* de las saponinas con el receptor KISS1R.
- Determinar el efecto antagonista/agonista de las saponinas espirostánicas con el receptor KISS1R.
- Establecer los posibles efectos biológicos de las saponinas hacia el receptor Kiss1R.

# METODOLOGÍA

## **Análisis *in silico* del receptor KISS1R**

Se llevará a cabo un modelado por homología del receptor KISS1R [23]

Para realizar el modelado de la proteína KISS1R (Q969F8) se obtendrá su secuencia aminoacídica de la base de datos de UNIPROT (<https://www.uniprot.org/uniprot/Q969F8.fasta>). [24] Posteriormente con la secuencia del KISS1R, se hizo un alineamiento con la herramienta Multiple Sequence Viewer de la plataforma Schrödinger [25], para identificar las secuencias homólogas y establecer la plantilla a usar. [23]

El modelado de KISS1R se realizó con la plataforma Schrödinger utilizando como plantilla la estructura cristalina de rayos X del receptor del péptido FQ de nociceptina/orfanina [26] (NOP; 5 DHG. PDB RCSB Protein Data Bank) con resolución de 3.00 Å. Posteriormente se procedió a la formación del modelo 3D por homología, para continuar con el análisis de la estabilidad del modelo, adición de estados de protonación a pH fisiológico, y finalmente a la minimización del modelo, esto realizado en el módulo ProteinWizardPrep [27] de la plataforma Schrödinger.

Para la inserción de la membrana, se utilizaron dos modelos prediseñados, uno para células epiteliales y el segundo para sistema nervioso central en el módulo MembraneBouilPrep, posterior a la inserción se optimizaron puentes de hidrogeno, estados de protonación y minimizo a la estructura más estable. [23]

## **Modelado de las kisspeptinas y p-234**

Para el modelado de las kisspeptinas (Kp-54, Kp-14, Kp-13, Kp-10) se obtuvo la secuencia aminoacídica y estructura de la base de datos de UNIPROT (<https://www.uniprot.org/uniprot/Q15726#sequences>) de KISS1 (Q15726) [24]. La secuencia obtenida y su estructura se utilizó como plantilla para el modelado de las kisspeptinas, mientras que la secuencia aminoacídica de p-234 se obtuvo de Roseweir y colaboradores., (2009). El modelado de las kisspeptinas se realizó en la plataforma Schrödinger haciendo un alineamiento con la herramienta Multiple Sequence RViewer y posteriormente se procedió a la formación del modelo 3D por homología para continuar con el análisis de la estabilidad del modelo, adición de estados de protonación a pH fisiológico. Finalmente se realizó la minimización del modelo; dado que en este caso las kisspeptinas y p-234 son ligandos del KISS1R, se generó la estructura molecular 3D en con la herramienta LigPrep. [28]

## **Docking molecular**

Para la realización del docking se utilizó la plataforma Schrödinger, en donde se prepararon el ligando con la herramienta LigPrep y el receptor en Protein Preparation Wizard. En donde se agregaron hidrógenos polares y se optimizaron. El acoplamiento molecular se calculó con Glide. [22]

# DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Análisis discriminativo de diferentes sapogeninas contra el receptor KISS1R a partir de su energía de acoplamiento y los sustituyentes que ocupan cada carbono.

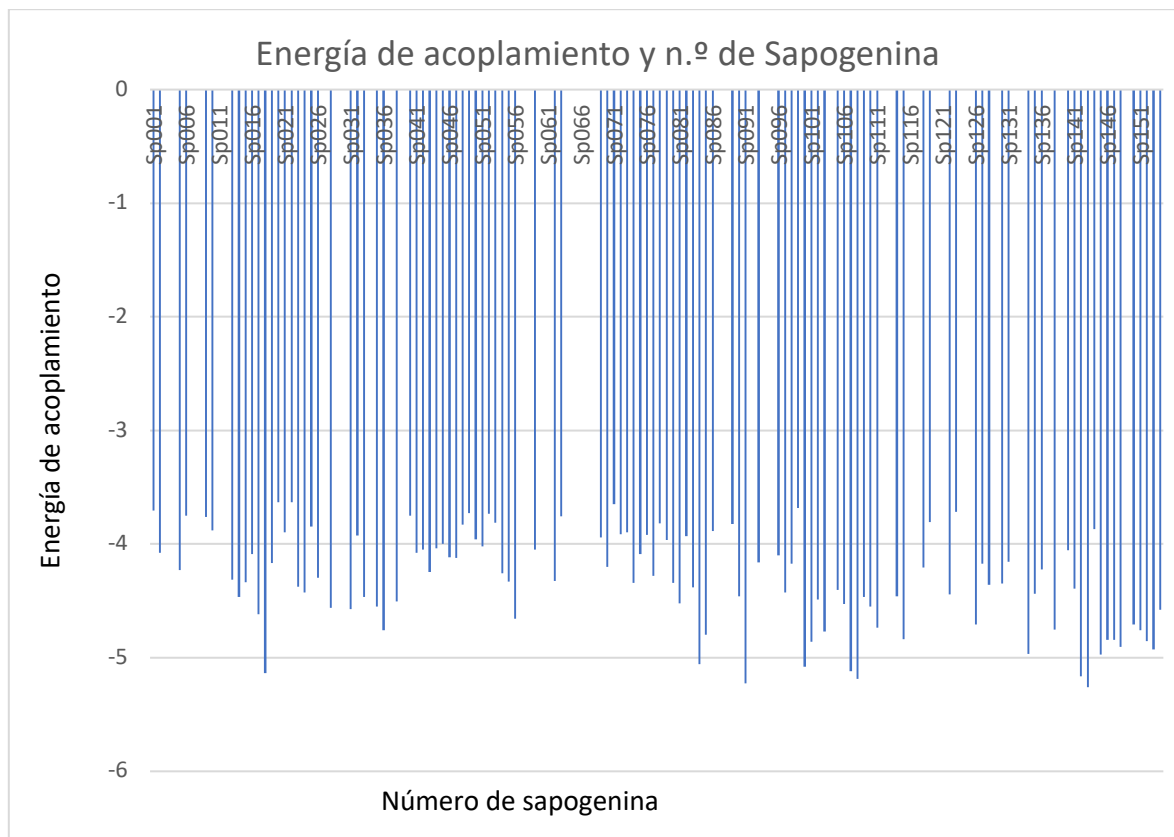


Figura 8. Sapogeninas y sus energías de acoplamiento con el receptor.

En la figura 8, se muestra una gráfica con todas las sapogeninas vs energías de acoplamiento, hay espacios vacíos que corresponden a sapogeninas que no se acoplaron; estos son aquellos que fueron designados como NC (no concordancia) y fueron descartados para el estudio por no tener sitio de acción para el modelo de KISS1R. Cabe destacar que las sapogeninas que mejor energía de acoplamiento presentaron fueron aquellas que su valor va de -4 Kcal/mol en adelante. Sin embargo para su selección como una excelente molécula candidato para actuar sobre su receptor se contemplan también las distintas interacciones que presenta dichas moléculas con el sitio del receptor, así como los sustituyentes que presentan en cada carbono que forma la base de dicha sapogenina. Al observar esto, se hizo un gráfico de correlación lineal a fin de observar el comportamiento de los datos y de ajustarse a la pendiente, de modo que se observe su comportamiento, por tanto, en la figura 9 podemos observar dicho gráfico.

## Análisis estadístico

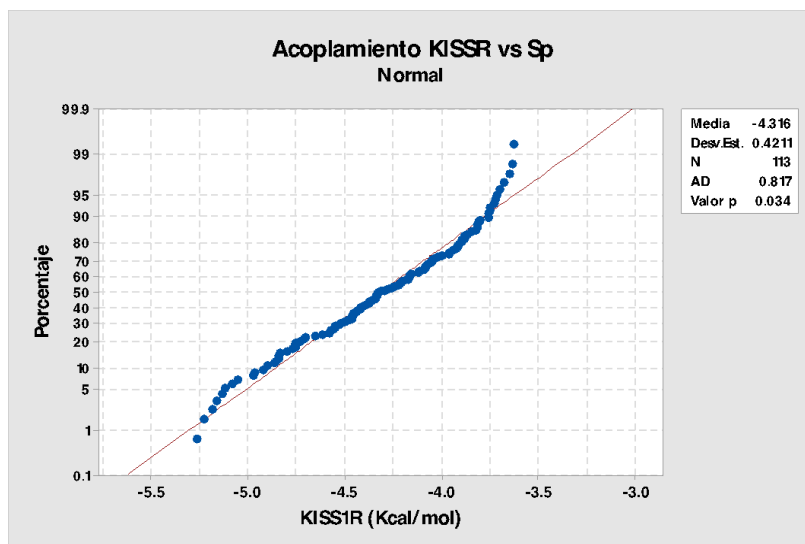


Figura 9. Correlación entre KISS1R y las sapogeninas?.

En la figura 9, se muestra una gráfica de correlación lineal empleado una prueba de normalidad, se muestra una distribución normal de los datos en su mayoría, sin embargo hay varios que caen fuera de la pendiente y a través de la desviación estándar se puede observar que existe una ligera variabilidad de los dato. Cabe destacar que no todas las sapogeninas presentan la misma energía de acoplamiento y nuestro valor  $p$  nos permite deducir que la probabilidad de obtener un valor semejante si se realiza el experimento en las mismas condiciones es mayor, dado que es menor a 0.05.

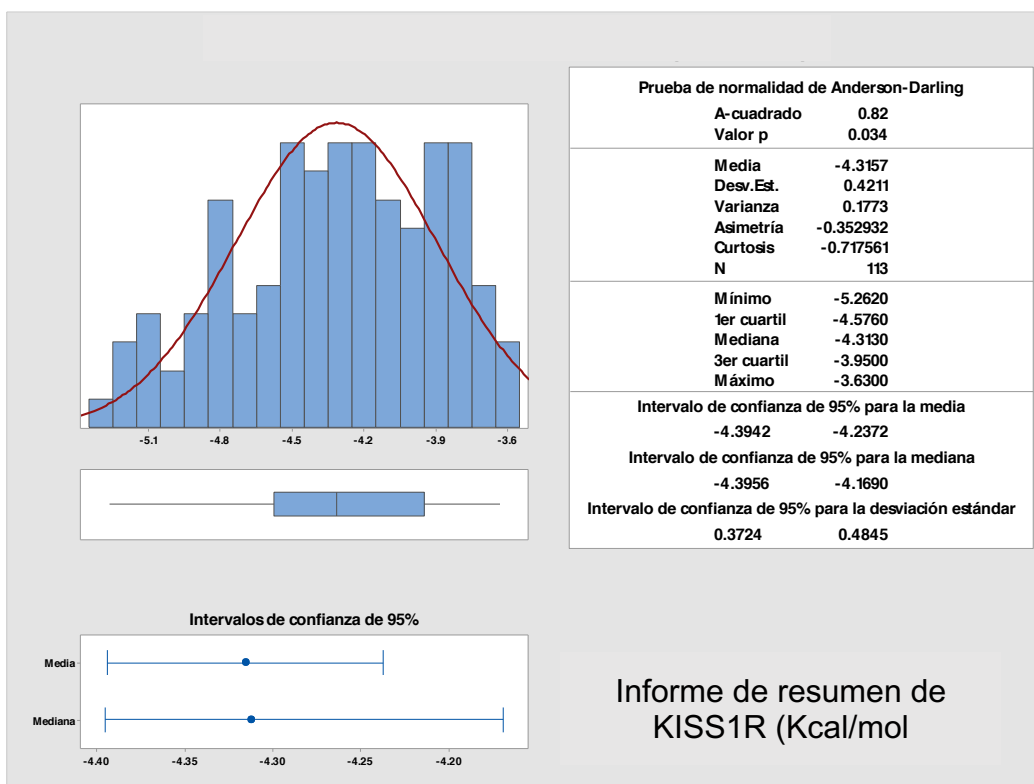


Figura 10. Grafica de distribución para el análisis de la mayor concentración de datos frente al receptor.

En la figura 10, se muestra que no tiene una distribución normal, por lo que muchos de los valores caen a la derecha e izquierda, obteniendo una curtosis alta, existen varios datos atípicos contrastados con la asimetría. Al no tener una distribución particular, los datos no están organizados de una forma normal y la mediana está representando mejor en el centro de la distribución, se opta por utilizar las medianas con un intervalo de confianza del 95% y se eligió una prueba no paramétrica como la prueba de Kruskal Wallis buscando así, si existen diferencias estadísticamente significativas.

El acoplamiento molecular se realizó para las 154 sapogeninas a partir de la combinación de las propiedades de los grupos químicos y su estereoquímica en todos los estereocentros como se muestra en la figura 11, evaluando su energía de acoplamiento y los radicales que pueden tomar cada posición en los carbonos que presenta la base de la molécula.

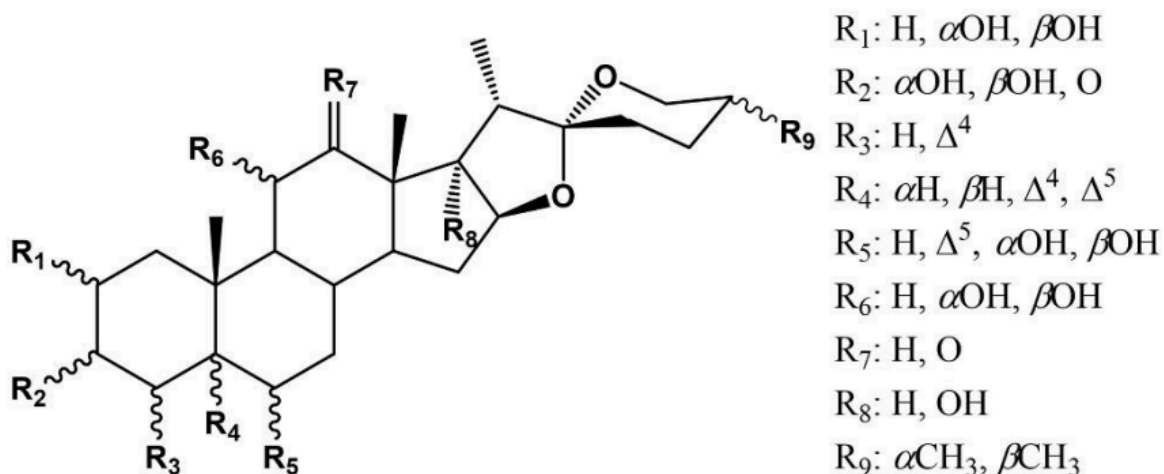


Figura 11. Combinaciones de funcionalización y estereoquímica en los 154 espirostanos (Sp) diseñados.

## Análisis estadístico de los resultados obtenidos por medio de la prueba de Kruskal Wallis

### Análisis estadístico para el carbono 2 (R1)

Tabla 2. Prueba de Kruskal-Wallis: KISS1R (Kcal/mol) vs. C-2 (R1)

#### Estadísticas descriptivas

C-2 (R1)	N	Mediana	Clasificación de medias	Valor Z
H	92	-4.288	57.5	0.35
$\alpha$ OH	12	-4.424	49.8	-0.80
$\beta$ OH	9	-4.116	61.2	0.40
General	113		57.0	

Tabla 3. Tabla con hipótesis y método para la prueba.

Hipótesis nula	$H_0$ : Todas las medianas son iguales			
Hipótesis alterna	$H_1$ : Al menos una mediana es diferente			
Método	GL	Valor H	Valor $p$	
No ajustado para empates	2	0.75	0.688	
Ajustado para empates	2	0.75	0.688	

A través de esta prueba podemos observar que el valor de  $p$  es mayor a 0.05, por lo que no existen diferencias estadísticamente significativas.

En la figura 12, se muestran dos sapogeninas interaccionando con el Receptor KISSR, las cuales a través del análisis estadístico, indica que no existen diferencias estadísticamente significativas, por tanto se tomaron dos moléculas las cuales tuvieran los mismos radiales en todos los carbonos, a excepción del C-2, donde se puede observar que hay cambio de un hidrógeno por un  $\alpha$ OH. Se encuentran los mismos aminoácidos y solo se puede observar al ácido glutámico formando un puente de hidrógeno en la Sp-02 en comparación con la Sp-17, la cual el ácido glutámico forma dos enlaces por puente de hidrógeno. Ambas muestran en la misma zona una carga negativa.

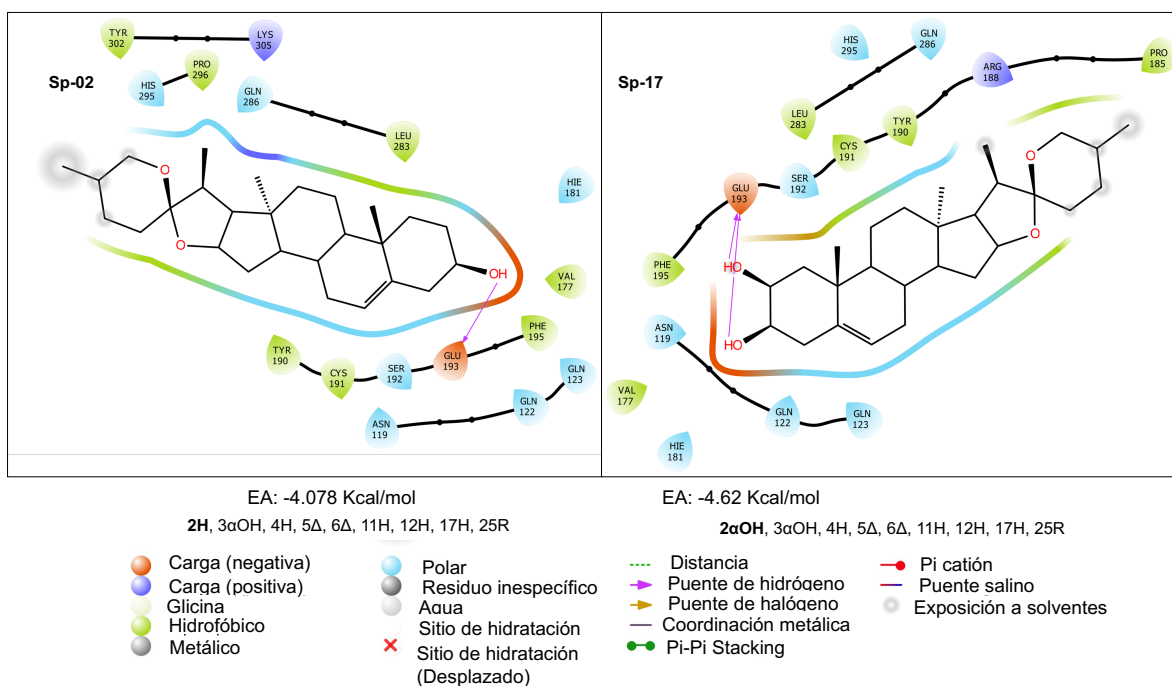


Figura 12. Sp sin diferencia estadística en C-2 en el receptor Kiss1R. Prueba de Kruskal-Wallis,  $p > 0,05$ .

Cabe aclarar que el análisis estadístico muestra que no existen diferencias estadísticamente significativas, sin embargo, pueden variar en algún aminoácido o enlace que forman y a través de este análisis se puede predecir el comportamiento de dicha molécula y si actúa en el sitio de unión ya sea como agonista o antagonista.

## Análisis estadístico para el carbono 3 (R2)

Tabla 4. Prueba de Kruskal-Wallis: KISS1R (Kcal/mol) vs. C-3 (R2)

### Estadísticas descriptivas

C-3 (R2)	N	Mediana	Clasificación de medias	Valor Z
O	18	-4.8015	28.5	-4.03
$\alpha$ OH	48	-4.1860	59.4	0.66

$\beta$ OH	47	-4.2590	65.5	2.33
General	113		57.0	

Tabla 5. Tabla con hipótesis y método para la prueba.

Hipótesis nula	$H_0$ : Todas las medianas son iguales			
Hipótesis alterna	$H_1$ : Al menos una mediana es diferente			
Método	GL	Valor H	Valor $p$	
No ajustado para empates	2	17.07	0.0001967	
Ajustado para empates	2	17.07	0.0001967	

A través de esta prueba podemos observar que el valor de  $p$  es menor a 0.05, por lo que sí existen diferencias estadísticamente significativas y esto es observable al ver que los radicales en R2, su valor Z es bastante diferente entre uno y otro de modo que nos está indicando a cuántas desviaciones estándar de un valor dado se encuentra de la media por arriba o por debajo y la posibilidad de encontrar dichos valores en la muestra.

En la figura 13 podemos observar la comparación de dos sapogeninas 75 y 82 que se tomaron de las 154 Sp analizadas, donde se ha buscado que tengan los mismo radicales a excepción de donde va el carbono 3 (C-3) y en la prueba mostró que existen diferencias estadísticamente significativas, ocupando un  $\alpha$ OH en la Sp-75 y un  $\beta$ OH para la Sp-82. Se puede observar que tienen las mismas interacciones en distintas zonas, a excepción de la interacción particular con Glutamina 123 con la Sp-82 formando un puente de hidrógeno la cual no está presente en la Sp-75.

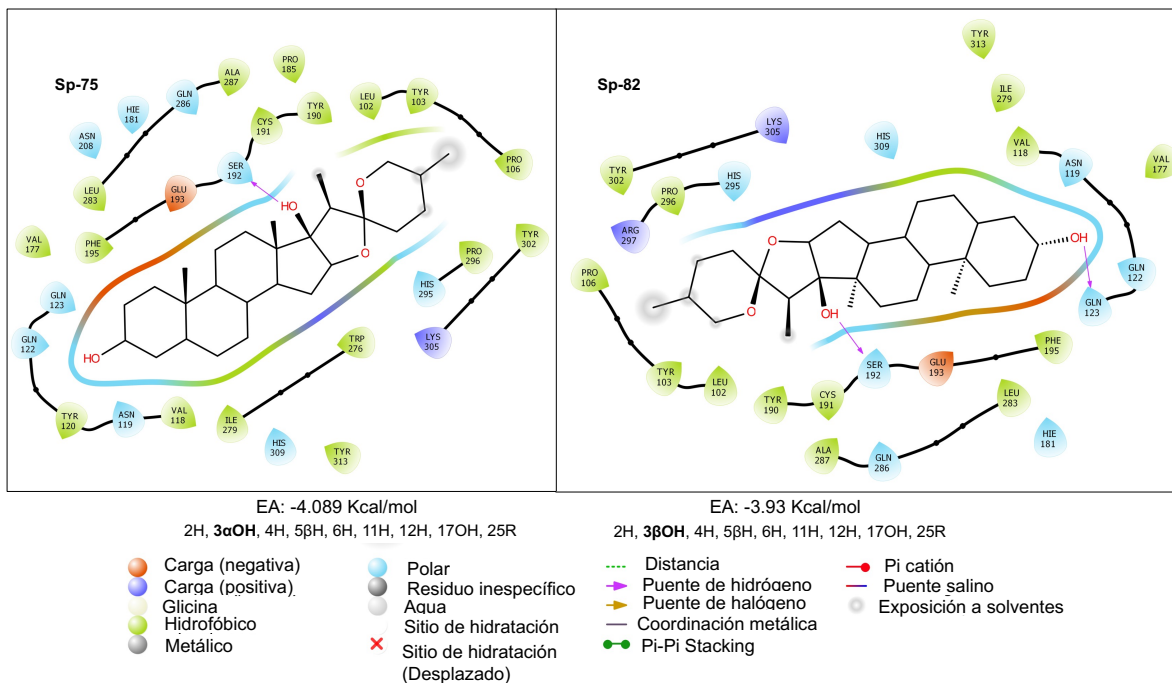


Figura 13. Sp sin diferencia estadística en C-3 en el receptor Kiss1R. Prueba de Kruskal-Wallis,  $p < 0,05$ .

## Análisis estadístico para el carbono 4 (R3)

Tabla 6. Prueba de Kruskal-Wallis: KISS1R (Kcal/mol) vs. C-4 (R3)

### Estadísticas descriptivas

C-4 (R3)	N	Mediana	Clasificación de medias	Valor Z
H	95	-4.2080	62.4	4.03
$\Delta$	18	-4.8015	28.5	-4.03
General	113		57.0	

Tabla 7. Tabla con hipótesis y método para la prueba.

Hipótesis nula	$H_0$ : Todas las medianas son iguales		
Hipótesis alterna	$H_1$ : Al menos una mediana es diferente		
Método	GL	Valor H	Valor $p$
No ajustado para empates	1	16.23	0.000056
Ajustado para empates	1	16.23	0.000056

A través de esta prueba podemos observar que el valor de  $p$  es menor a 0.05, por lo que sí existen diferencias estadísticamente significativas y esto es observable al ver que los radicales en R3, su valor  $Z$  va de lo negativo a lo positivo con respecto a la media, lo que nos permite valorar con qué posibilidad puedo encontrar dicho valor.

Para el C-4, se han buscado que solo exista diferencia en el radical que ocupa el C-4 como se observa en la figura 14, variando únicamente los valores de energía de acoplamiento, aunque cabe destacar que por las características de la molécula en la en la prueba mostró que existen diferencias estadísticamente significativas, lo particular es que ambas presentan una mayor exposición a solventes y esto puede afectar en su funcionamiento. Cabe destacar también que no existe una semejanza a la KP-10, como a la p-234 al no presentar enlaces de funcionalidad para el comportamiento de la molécula.

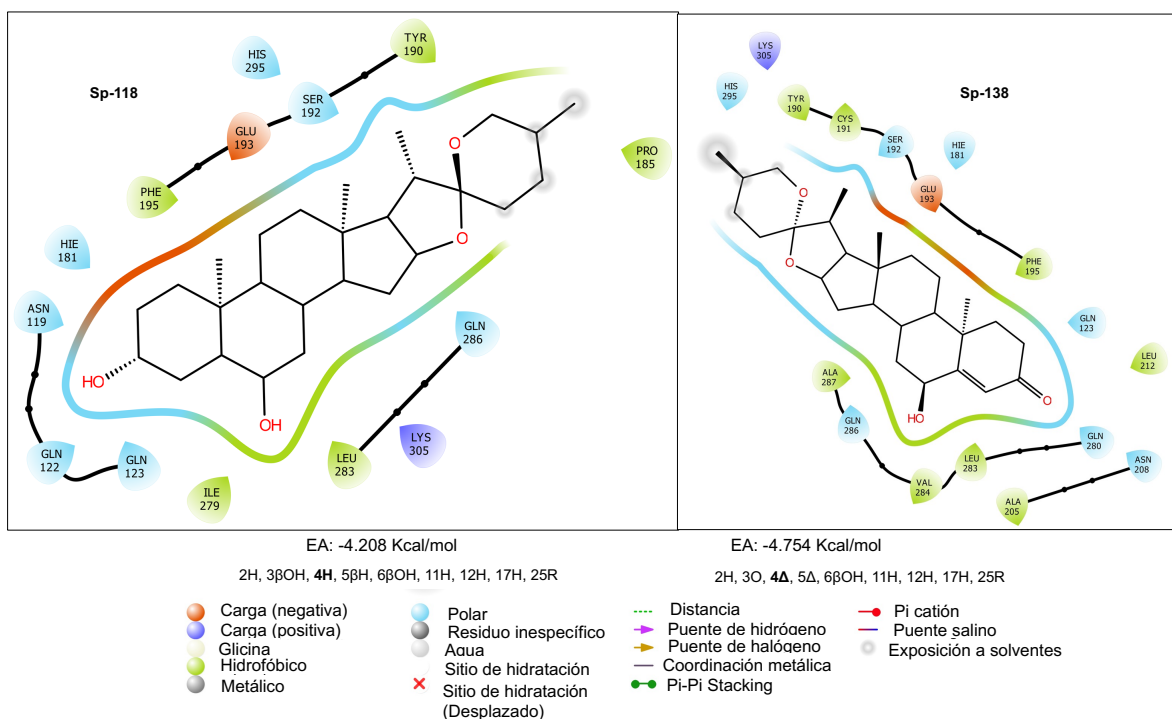


Figura 14. Sp sin diferencia estadística en C-4 en el receptor Kiss1R. Prueba de Kruskal-Wallis,  $p < 0,05$ .

## Análisis estadístico para el carbono 5 (R4)

Tabla 8. Prueba de Kruskal-Wallis: KISS1R (Kcal/mol) vs. C-5 (R4)

### Estadísticas descriptivas

C-5 (R4)	N	Mediana	Clasificación de medias	Valor Z
$\alpha$ H	31	-4.1210	63.8	1.35
$\alpha$ OH	7	-4.3480	59.0	0.17

$\beta$ H	32	-4.1815	63.9	1.40
$\Delta$	43	-4.4630	46.7	-2.62
General	113		57.0	

Tabla 9. Tabla con hipótesis y método para la prueba.

Hipótesis nula	H <sub>0</sub> : Todas las medianas son iguales		
Hipótesis alterna	H <sub>1</sub> : Al menos una mediana es diferente		
Método	GL	Valor H	Valor <i>p</i>
No ajustado para empates	3	7.01	0.071
Ajustado para empates	3	7.02	0.071

A través de de la prueba estadística se observa que el valor de *p* es mayor a 0.05, por lo que no existen diferencias estadísticamente significativas. Tomando en cuenta que los radicales que pueden ocupar el estereocentro se mantienen en valor de Z positivos, de modo que están por arriba de la media indicando con qué frecuencia puedo observar estas características en cada sapogenina.

En el caso del C-5, como lo muestra la figura 15, se tomaron dos sapogeninas donde la única diferencia que se buscaba es con el estereocentro del carbono 5, sin embargo por las características del modelo, no se pudo mantener una energía de acomplamiento similar entre ambas moléculas. Para la Sp-52 hay un  $\alpha$ H en la posición del C-5 y para la Sp-80 encontramos un  $\beta$ H, ocasionando así una variación en su energía de acomplamiento, siendo mayor para la Sp-80.

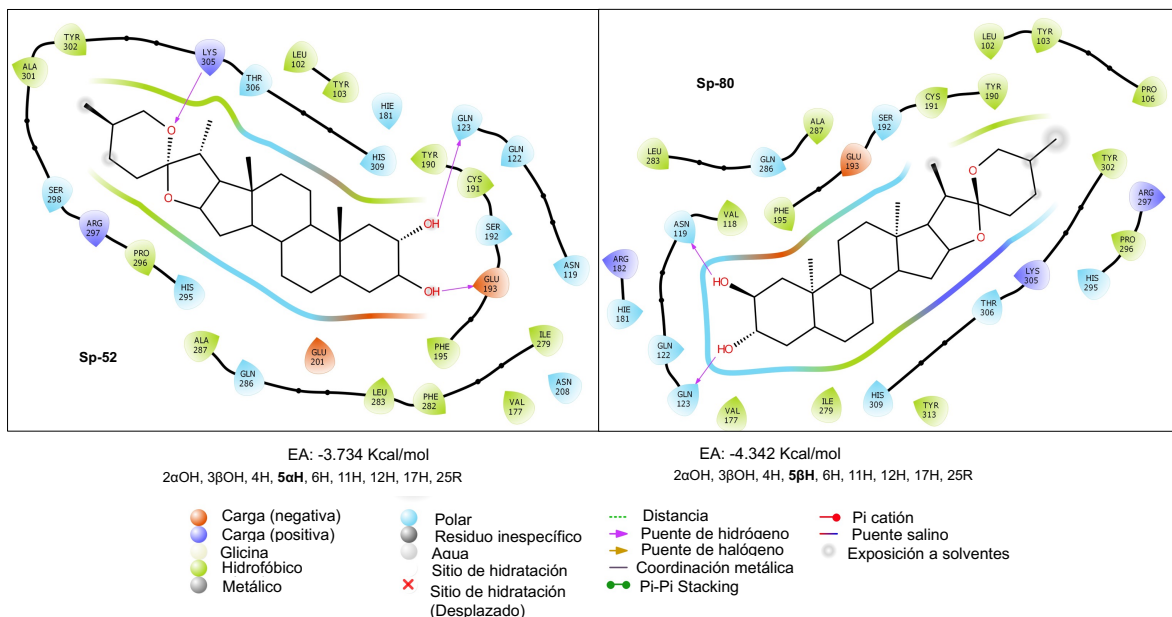


Figura 15. Sp sin diferencia estadística en C-5 en el receptor Kiss1R. Prueba de Kruskal-Wallis,  $p > 0,05$ .

## Análisis estadístico para el carbono 6 (R5)

Tabla 10. Prueba de Kruskal-Wallis: KISS1R (Kcal/mol) vs. C-6 (R5)

### Estadísticas descriptivas

C-6 (R5)	N	Mediana	Clasificación de medias	Valor Z
H	60	-4.1420	61.2	1.44
O	11	-4.4050	52.0	-0.53
$\alpha$ OH	10	-4.4975	34.2	-2.30
$\beta$ OH	7	-4.3480	51.7	-0.44
$\Delta$	25	-4.3330	59.8	0.48
General	113		57.0	

Tabla 11. Tabla con hipótesis y método para la prueba.

Hipótesis nula	$H_0$ : Todas las medianas son iguales		
Hipótesis alterna	$H_1$ : Al menos una mediana es diferente		
Método	GL	Valor H	Valor $p$
No ajustado para empates	4	6.43	0.169
Ajustado para empates	4	6.43	0.169

A través de esta prueba podemos observar que el valor de  $P$  es mayor a 0.05, por lo que no existen diferencias estadísticamente significativas y los radicales en R5 existen tantos valores positivos como negativos en términos del valor Z, lo que cabe destacar es que entre una y otra existe diferencia notable, dando así un valor de  $P$  mayor a 0.05.

En este análisis, se han buscado dos moléculas donde sean iguales las energías de acoplamiento con la finalidad de observar a detalle qué aminoácidos cambian con solo mover un radical en el mismo estereocentro en el C-6; como se muestra en la figura 16, se ha obtenido una Sp-102 que tiene una cetona en dicho sitio y un Sp-114 que lo cambia por un  $\alpha$ OH. Se puede observar a la GLN-123 y a la GLU-193 formando puentes de hidrógeno. Por parte de la Sp-102, existen mayores zonas polares en la presencia de histidina 295, por otro lado la Sp-114 forma puentes de Hidrógeno entre el ASN-119 Y la GLN-123, cabe destacar que tienen similitud con la KP-10, lo cual puede permitir un mejor sitio de unión al receptor.

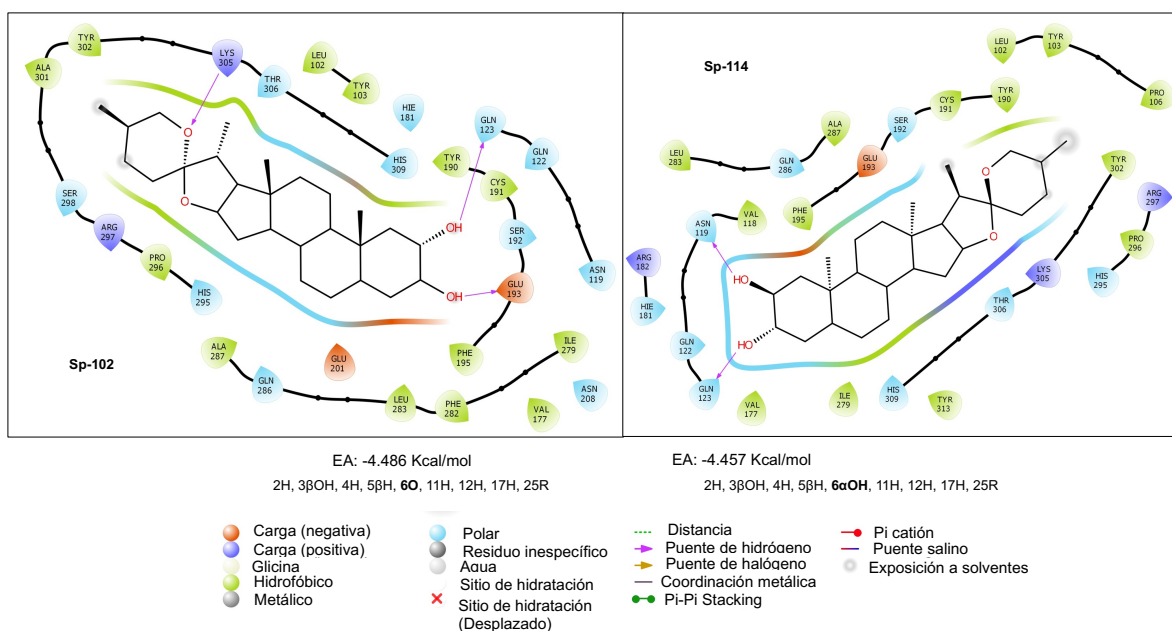


Figura 16. Sp sin diferencia estadística en C-6 en el receptor Kiss1R. Prueba de Kruskal-Wallis,  $p > 0,05$ .

## Análisis estadístico para el carbono 11 (R6)

Tabla 12. Prueba de Kruskal-Wallis: KISS1R (Kcal/mol) vs. C-11 (R6)

### Estadísticas descriptivas

C-11 (R6)	N	Mediana	Clasificación de medias	Valor Z
-----------	---	---------	-------------------------	---------

H	80	-4.3275	56.6	-0.19
O	10	-4.0635	66.7	0.98
$\alpha$ OH	14	-4.5075	48.0	-1.10
$\beta$ OH	9	-4.2470	63.6	0.63
General	113		57.0	

Tabla 13. Tabla con hipótesis y método para la prueba.

Hipótesis nula	$H_0$ : Todas las medianas son iguales			
Hipótesis alterna	$H_1$ : Al menos una mediana es diferente			
Método	GL	Valor H	Valor $p$	
No ajustado para empates	3	2.31	0.511	
Ajustado para empates	3	2.31	0.511	

A través de esta prueba podemos observar al igual que en C-6 que el valor de  $p$  es mayor a 0.05, por lo que no existen diferencias estadísticamente significativas y los radicales en R5 existen tantos valores positivos como negativos en términos del valor Z, lo que cabe destacar es que entre una y otra existe diferencia notable, dando así un valor de  $p$  mayor a 0.05.

En la figura 17, se muestran dos sapogeninas donde sus energías de acoplamiento son iguales y lo único que cambian son los radicales que se encuentran en el C-11, ya que en la primera se observa la interacción con un átomo de hidrógeno y en la siguiente existe un  $\beta$ OH además de presentar una gran zona cargada negativamente. Cabe destacar que en la Sp-5 no hay varios aminoácidos presentes como en la Sp-43, a partir de esto se puede observar a la Sp-43 con un comportamiento agonista frente al receptor.

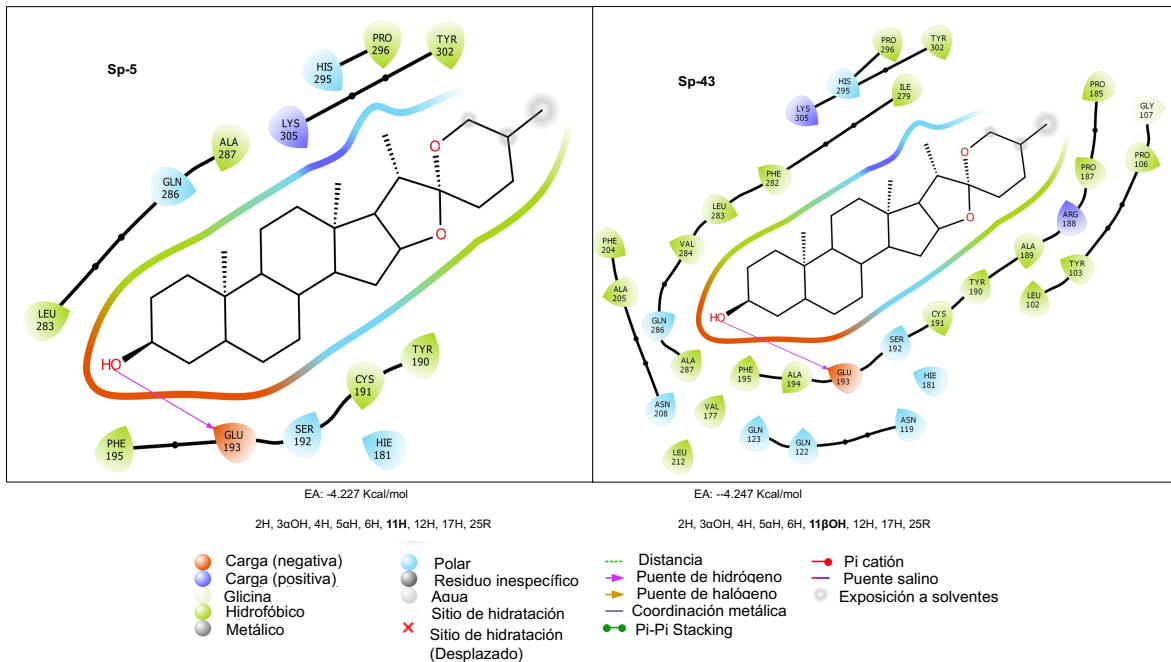


Figura 17. Sp sin diferencia estadística en C-11 en el receptor Kiss1R. Prueba de Kruskal-Wallis,  $p > 0,05$ .

## Análisis estadístico para el carbono 12 (R7)

Tabla 14. Prueba de Kruskal-Wallis: KISS1R (Kcal/mol) vs. C-12 (R7)

### Estadísticas descriptivas

C-12 (R7)	N	Mediana	Clasificación de medias	Valor Z
H	100	-4.288	56.5	-0.42
O	13	-4.324	60.6	0.42
General	113		57.0	

Tabla 15. Tabla con hipótesis y método para la prueba.

Hipótesis nula	$H_0$ : Todas las medianas son iguales		
Hipótesis alterna	$H_1$ : Al menos una mediana es diferente		
Método	GL	Valor H	Valor $p$
No ajustado para empates	1	0.18	0.672
Ajustado para empates	1	0.18	0.672

A través de esta prueba obtuvimos que el valor de  $P$  es mayor a 0.05, por lo que no existen diferencias estadísticamente significativas y esto es probable al ver que los radicales en R7, su valor Z va de lo negativo a lo positivo.

Para el C-12, se buscaron sapogeninas donde las energías de acoplamiento sean iguales y solo cambien los radicales en el C-12. Para esto se obtuvieron a la Sp-10 la cual tiene una interacción con un átomo de hidrógeno y en la Sp-76 se encuentra una cetona, aunque en esta se encuentra la Lys 305 formando un puente de hidrógeno y en la Sp-10 es la GLN-123 la que lo forma como se puede observar en la figura 18.

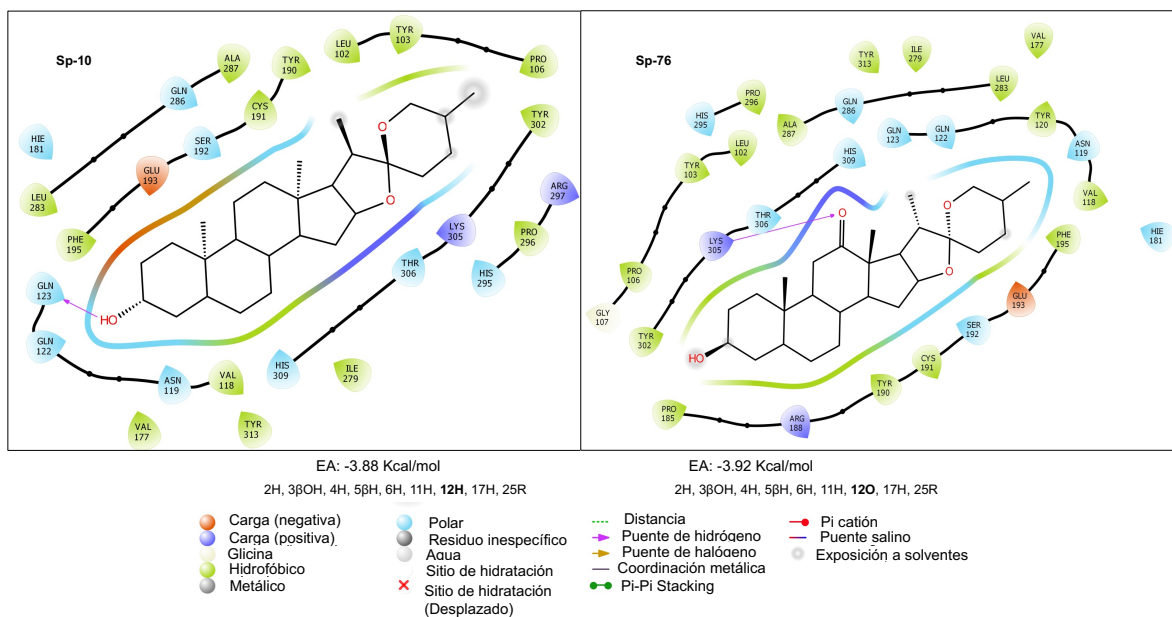


Figura 18. Sp sin diferencia estadística en C-12 en el receptor Kiss1R. Prueba de Kruskal-Wallis,  $p > 0,05$ .

## Análisis estadístico para el carbono 17 (R8)

Tabla 16. Prueba de Kruskal-Wallis: KISS1R (Kcal/mol) vs. C-17 (R8)

### Estadísticas descriptivas

C-17 (R8)	N	Mediana	Clasificación de medias	Valor Z
H	101	-4.3330	56.1	-0.83
OH	12	-4.1425	64.4	0.83
General	113		57.0	

Tabla 17. Tabla con hipótesis y método para la prueba.

Hipótesis nula	$H_0$ : Todas las medianas son iguales		
Hipótesis alterna	$H_1$ : Al menos una mediana es diferente		
Método	GL	Valor H	Valor $p$
No ajustado para empates	1	0.69	0.407
Ajustado para empates	1	0.69	0.407

A través de esta prueba podemos observar que el valor de  $P$  es mayor a 0.05, igual que el caso anterior con C-12, por lo que no existen diferencias estadísticamente significativas y esto es observable al ver que los radicales en R8, su valor  $Z$  va de lo negativo a lo positivo.

En la figura 19 se puede observar a dos sapogeninas que presentan cambio en el radical que ocupa la posición del C-17, en la primera se observa la interacción con un átomo de hidrógeno y en la siguiente existe una cetona además de presentar una gran zona cargada negativamente por parte de la Sp-5. Sin embargo cabe destacar que en la Sp-5 no hay varios aminoácidos presentes como en la Sp-47 y esta misma se ve que ocasiona un alejamiento de los aminoácidos presentes.

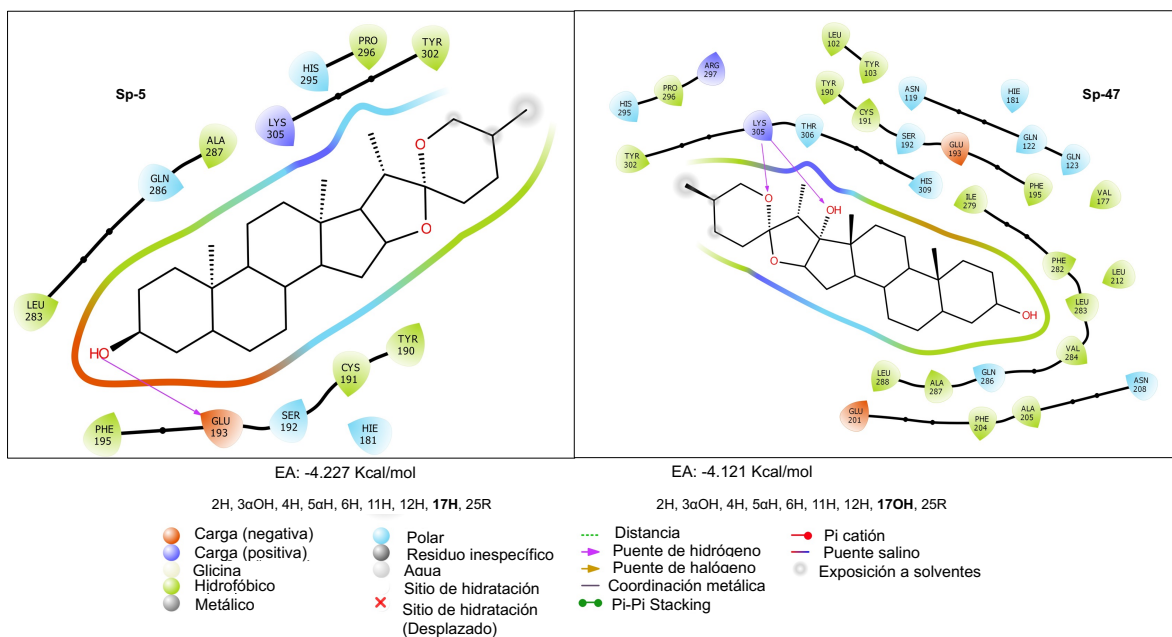


Figura 19. Sp sin diferencia estadística en C-17 en el receptor Kiss1R. Prueba de Kruskal-Wallis,  $p > 0,05$ .

## Análisis estadístico para el carbono 25 (R9)

Tabla 18. Prueba de Kruskal-Wallis: KISS1R (Kcal/mol) vs. C-25 (R9)

### Estadísticas descriptivas

C-25 (R9)	N	Mediana	Clasificación de medias	Valor Z
R	78	-4.1725	64.0	3.37
S	35	-4.4660	41.5	-3.37
General	113		57.0	

Tabla 19. Tabla con hipótesis y método para la prueba.

Hipótesis nula	$H_0$ : Todas las medianas son iguales
Hipótesis alterna	$H_1$ : Al menos una mediana es diferente

Método	GL	Valor H	Valor $p$
No ajustado para empates	1	11.39	0.001
Ajustado para empates	1	11.39	0.001

En esta prueba se observa que el valor de  $p$  es menor a 0.05, por lo que sí existen diferencias estadísticamente significativas, lo cual se muestra con nuestro valor de  $Z$  por los extremos de cada valor y qué tan posible es que uno sea levógira o dextrógira, además, que la población mayor se concentra en R (78), en contraste con S (35).

Finalmente, para el C-25, se puede observar en la figura 20 un cambio en la posición del radical ya que para la Sp-45 está a la derecha y la Sp-59 está hacia la izquierda, ya que la energía de acoplamiento son diferentes y en ambas se observa a la GLU-193 formando enlaces de hidrógeno, dos en el caso de la Sp-45 y uno para la Sp-59. Ambas se comportan perfectamente como agonistas. Cabe destacar que la prueba nos muestra que sí existen diferencias estadísticamente significativas, por esa razón podemos observar la diferencia entre aminoácidos que están presentes entre uno y otro.

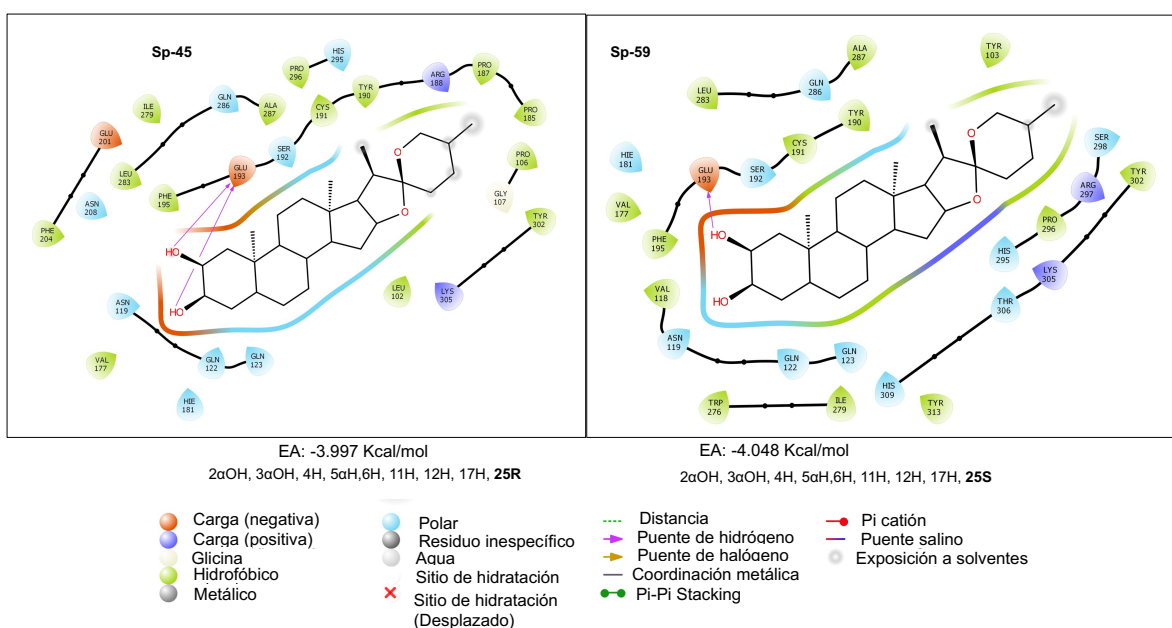


Figura 20. Sp con diferencia estadística en C-25 en el receptor Kiss1R. Prueba de Kruskal-Wallis,  $p < 0,05$ .

# Análisis espacial

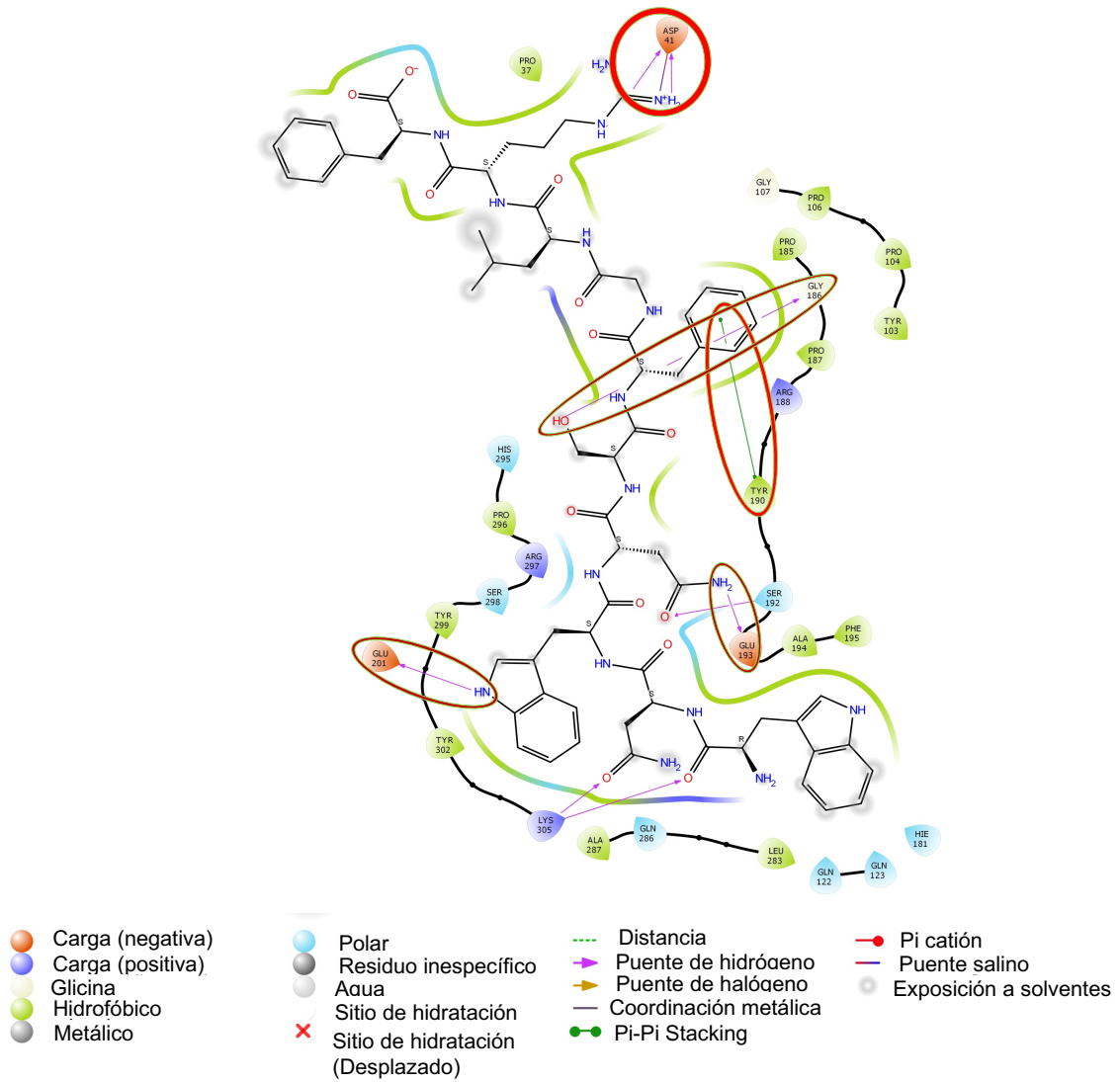


Figura 21 . Imagen 2D de la Kisspeptina 10 con los aminoácidos y sus interacciones.

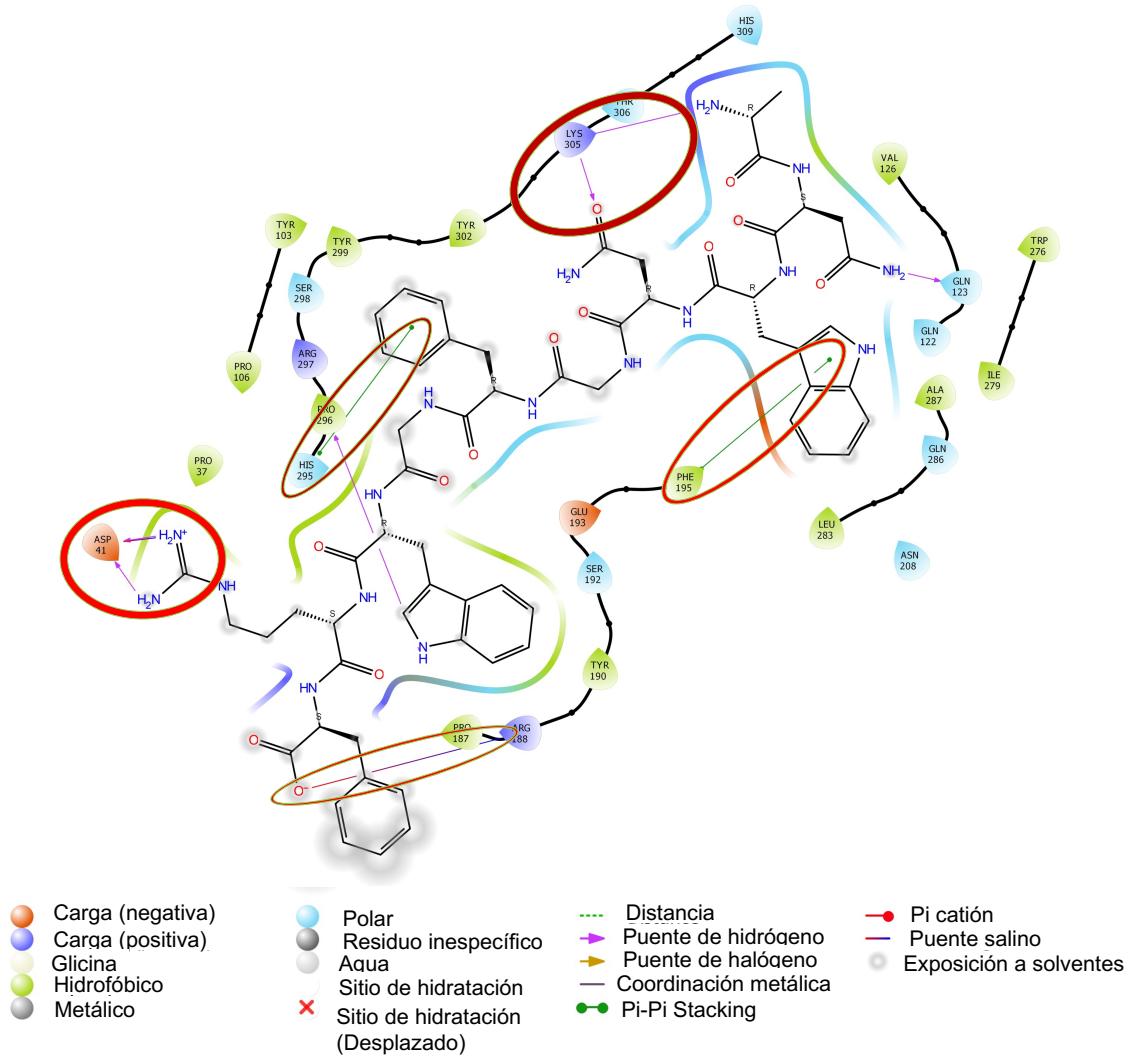
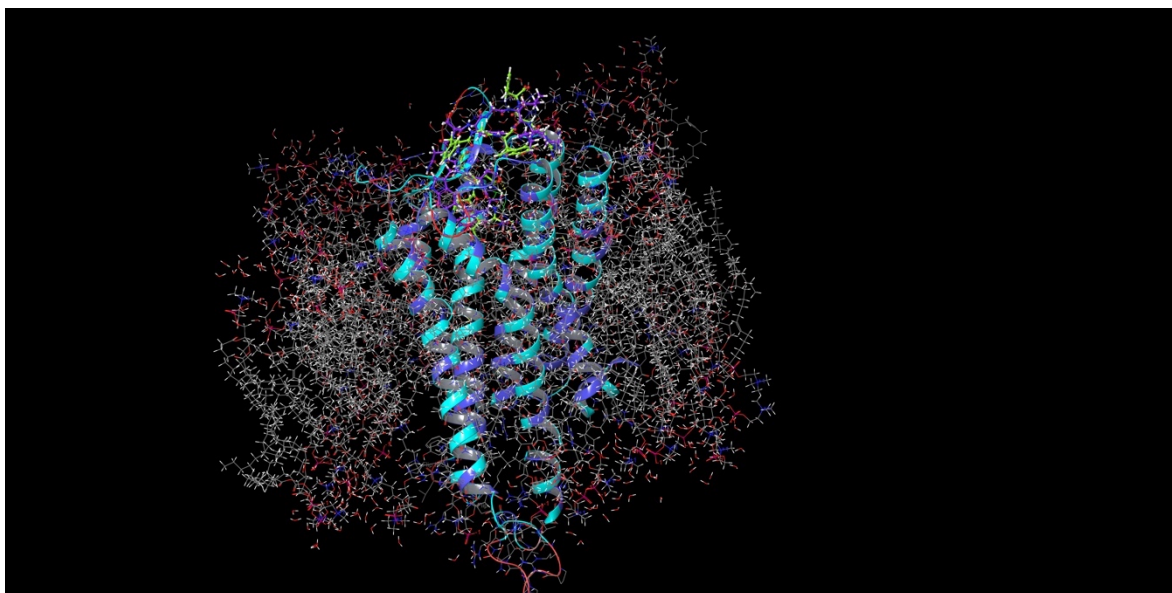


Figura 22. Imagen 2D de la P-234 con los aminoácidos y sus interacciones.

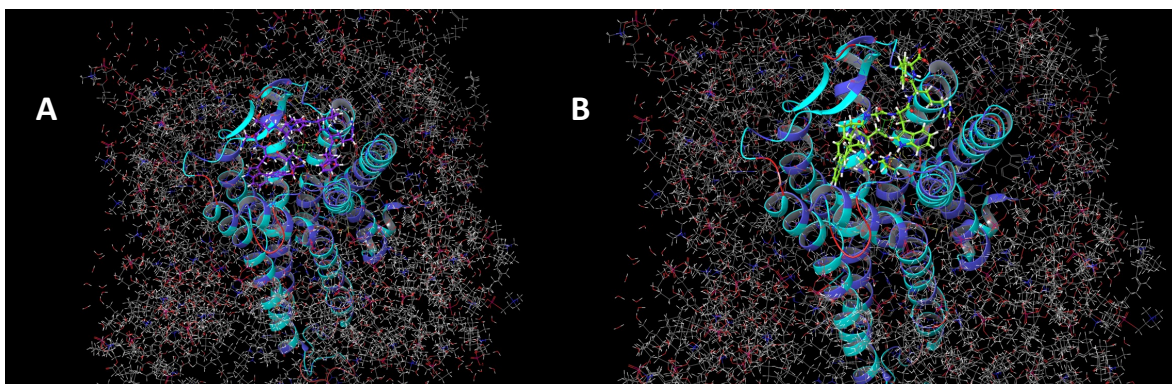
En la figura 21 y 22 se muestra a la Kp-10, siendo este el ligando agonista del receptor e implicado en tantos procesos de la maduración sexual, así como a la P-234, dicha molécula es el inhibidor comercial del receptor. Se hizo un análisis de los aminoácidos que tienen cada una de las moléculas con el fin de observar cuáles son esas características que le permiten a uno y otro actuar ya sea como agonista o como antagonista.

En la figura 21 muestra que la Kisspeptina-10 tiene a la tirosina 190 en enlace Pi-Pi “stacking”, a la serina 192, al igual que la lisina 305, el ácido glutámico 193 y la glicina 186 se encuentran formando puentes de hidrógeno. En la figura 22, la Arginina 188, la prolina 296, lisina 305 y glutamina 123 forman puentes de hidrógeno; también se observa a la histidina formando enlace Pi-Pi stacking, de manera similar, la fenilalanina también se observa formando un enlace Pi-Pi stacking. Ambas comparten al ácido aspártico formando puentes de hidrógeno y un puente salino.

En la figura 23 se muestra una imagen 3D donde la KP-10 y a la P-234 interactúan en el sitio de unión del receptor ubicado en la parte externa de la membrana. Ambos se unen en el mismo sitio y lo que los hace diferente son los aminoácidos con los que interactúan. En la figura 24A se muestra otra imagen 3D a la KP-10 sola en el sitio de unión al receptor, como de igual forma la figura 24B que en este caso tiene a la P-234 el antagonista comercial del receptor KISS1R, esto con la finalidad de que se pueda observar cómo se colocan en el sitio de unión y de ahí analizar todas las demás sapogeninas a estudiar y en qué zona se disponen.



*Figura 23. Imagen 3D de la KP-10 y la P-234 juntas en el sitio de unión al receptor.*



*Figura 24 A) KP-10 en sitio de unión al receptor en 3D B) P-234 en sitio de unión al receptor en 3D.*

Para el análisis espacial se usaron moléculas con una diferencia de 1 Kcal/mol en la energía de acoplamiento.

## **Sapogeninas Agonistas**

A través del análisis en cuanto a los aminoácidos que presentan cada Sapogenina y las diferentes interacciones que presentan entre ellas, se puede ver

la similitud que existe con el agonista principal del receptor KISS1R, el cual es la KP-10, de este modo, se ha hecho una selección de moléculas y se muestra a continuación dos de ellas para ejemplificar dicho comportamiento.

Se puede observar en la figura 24 a la Sp-56, la cual muestra un enlace por puente de hidrógeno (flecha rosa) con la Serina 192, siendo esta una característica importante en la KP-10, ya que es uno de los aminoácidos base y clave que se tiene y permite interactuar bien con el sitio de unión al receptor, entre ellos también se encuentran otros aminoácidos que permite tener similitud con la molécula agonista por excelencia como lo es la KP-10.

Por otra parte, se puede observar a la Sp-91 presentando las mismas características, presentando el mismo enlace que la molécula anterior y finalmente la Sp-151, que si bien no tiene el mismo enlace pero tiene al ácido glutámico, uno de los aminoácidos de importancia para su interacción haciendo un enlace por puente de hidrógeno, además de compartir zonas hidrofóbicas y otras cargadas tanto positiva como negativamente lo cual les permite una unión al receptor de manera correcta.

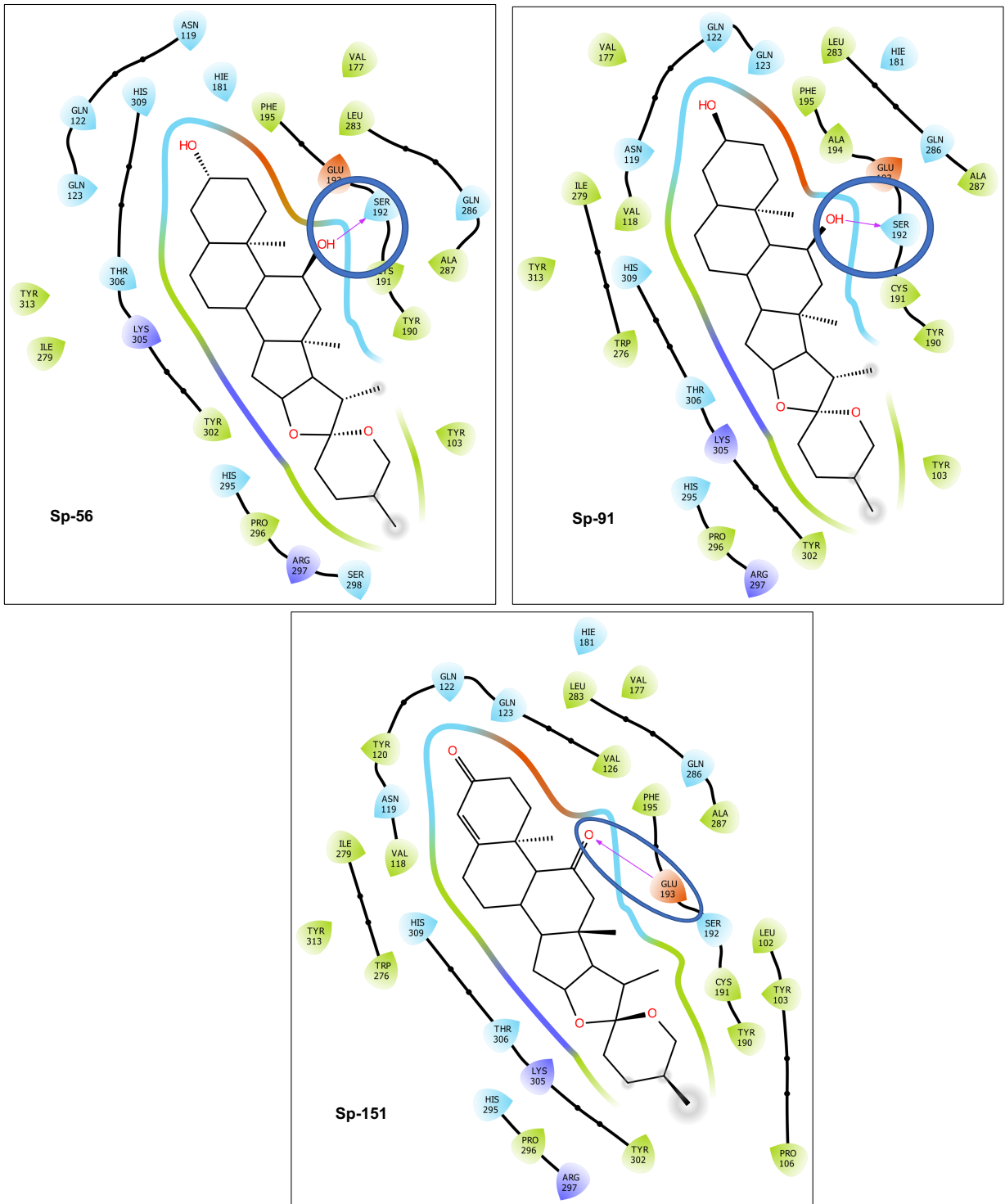


Figura 25. Sp-56, Sp-91 y Sp-151, comparación como agonistas y aminoácidos de importancia para su acción.

En el grupo que presentan esta misma similitud se encuentran también la Sp-5, 14, 23, 28, 43, 45, 47, 56, 59, 74, 75, 85, 91, 147, 148, 151.

Estas sapogeninas tienen la misma actividad, ya que comparten un enlace diferencial para su actividad como es el puente de hidrógeno de la serina con el hidroxilo al igual que el ácido glutámico con la cetona. Además de tener grandes zonas hidrofóbicas y polares que favorecen su interacción con el receptor.

Estas moléculas permiten ayudar a personas que tienen complicaciones con la maduración sexual y secreción de ciertas hormonas implicadas en el eje Hipotálamo-pituitaria gonadal, ya que permiten estimular al receptor y de este modo se envía la señal a la hipófisis a través de su vía de señalización, favoreciendo la producción de las hormonas FSH y LH.

## **Sapogeninas Antagonistas**

En esta sección, podemos observar a las sapogeninas que tienen la característica de comportarse como antagonistas frente al receptor KISS1R, de este modo se ha analizado las diferentes interacciones que presenta y los aminoácidos que están dentro de la misma.

En la figura 21, podemos observar 3 sapogeninas, a la Sp-33, 122 y la 145, las cuales tienen un aminoácido en común formando un puente de hidrógeno como lo es la GLN-123, lo cual le confiere una característica particular como lo es la de actuar como un antagonista del receptor, además de compartir la mayoría de los aminoácidos que le dan estructura. De este modo logran una gran similitud con el antagonista comercial por excelencia para el receptor KISS1R como lo es la p-234.

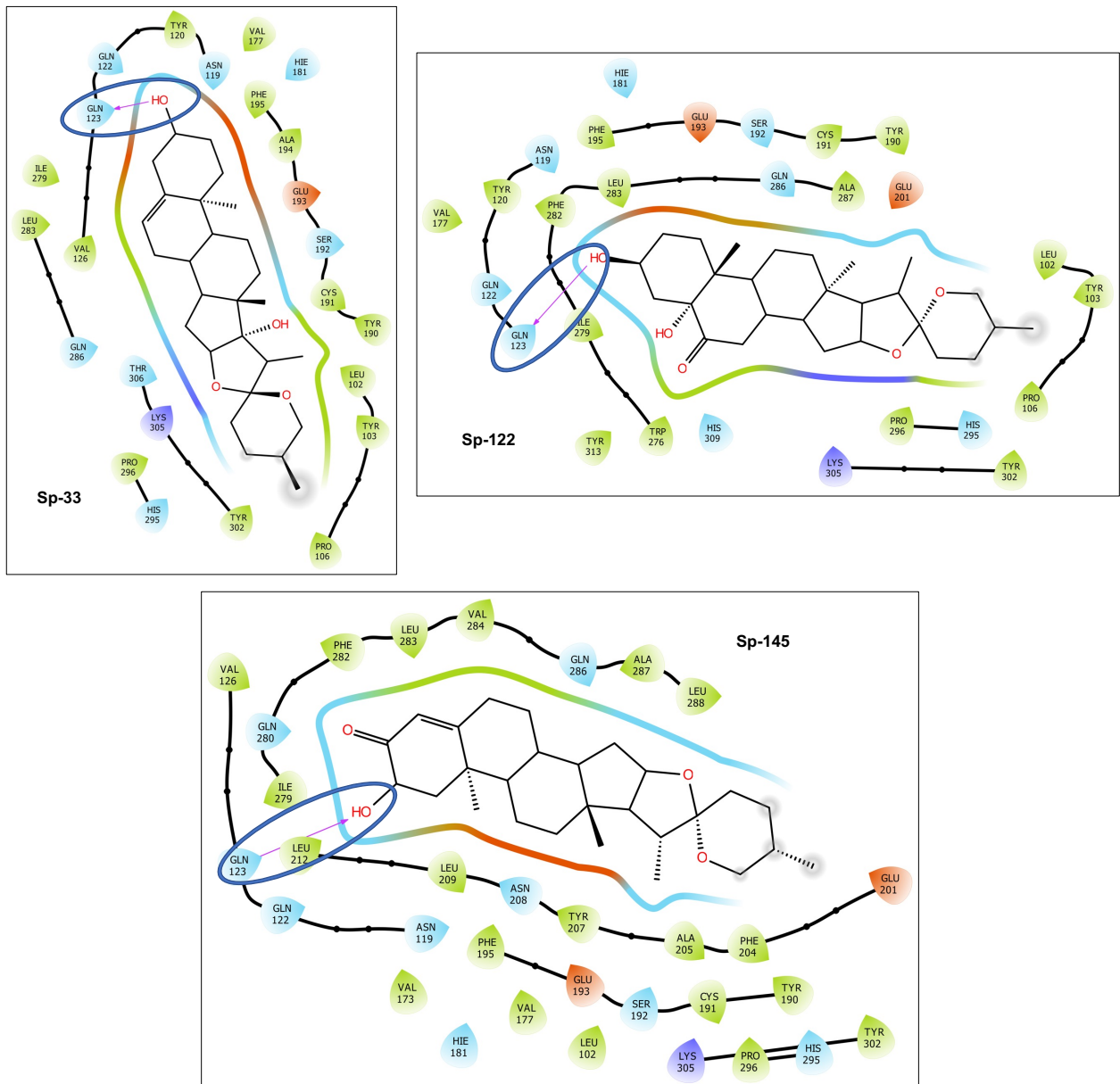


Figura 26. Sp-33, Sp-122 y Sp-145, comparación como antagonistas y aminoácidos de importancia para su acción.

Encontrar estas sapogeninas, permite un nuevo panorama terapéutico, ya que a través de ello se puede emplear como tratamiento de diferentes cánceres donde la expresión de Kisspeptina se ve aumentado o incluso la misma expresión del receptor, de modo que se pueda controlar y así tener una nueva alternativa de tratamiento, considerando la dosis mínima para que ejerza su efecto terapéutico. Incluso emplear estos fármacos en patologías como el síndrome de ovario poliquístico, ya que permitiría una mejor regulación de la secreción de hormonas y así controlar la maduración sexual.

También podemos encontrar a las Sp-10, 18, 24, 35, 38, 77, 102, 105, 110, 126, 130, 142, 146. Uno de los enlaces que le diferencia para su comportamiento como

antagonista es la interacción de GLN 123 con los hidroxilos además de tener varias zonas con carga negativa.

## Sapogeninas con actividad dual

Existen una serie de sapogeninas que presentan una actividad dual, aunque esto no es benéfico pues esta dualidad podría generar incertidumbre en el comportamiento de las moléculas y no ejercer el efecto terapéutico deseado, ocasionando así un efecto adverso. Resulta de gran interés ver cómo un aminoácido puede provocar una dualidad en su comportamiento y a partir de esto se pueden probar frente a otros receptores.

Existen ciertas similitudes entre ambas moléculas y cabe destacar que tienen interacciones que están tanto como agonistas como lo es la interacción del GLU-193 y de forma antagonista como lo es con la GLN-123, estas tres sapogeninas presentan las mismas interacciones (24, 38, 97), además de tener similitud en sus aminoácidos.

En la figura 26, podemos observar un diagrama de Venn que involucra a las sapogeninas de son moduladores positivos y negativos, además de la relación que existe entre los que presentan una actividad dual.

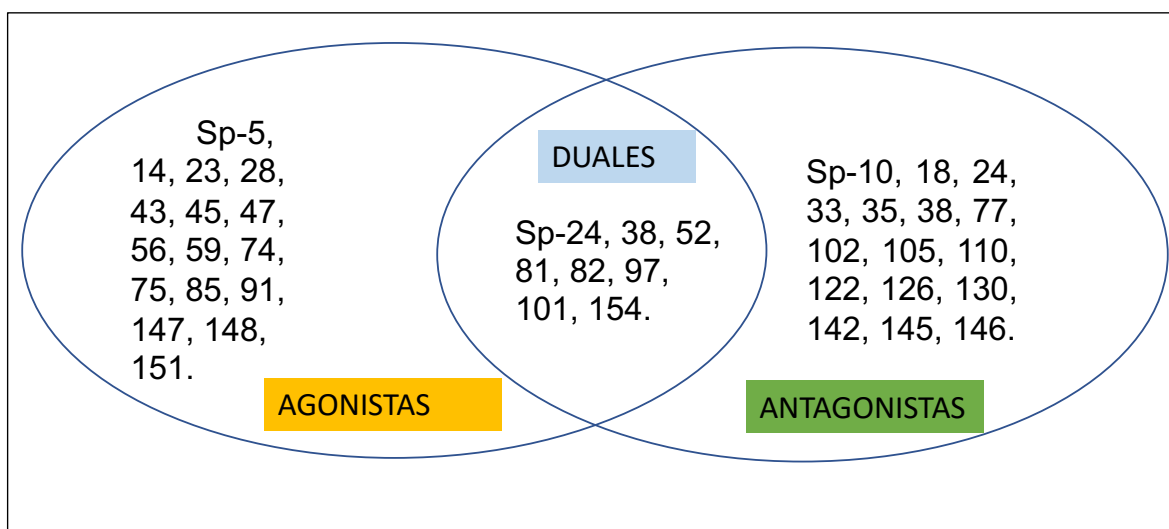


Figura 27. Diagrama de Venn para la correlación de las sapogeninas con actividad dual y moduladores positivos y negativos.

La particularidad de estas sapogeninas, se da porque tienen interacciones tanto de la KP-10 como de la P-234, por tanto comparte propiedades de ambos moduladores, confiriéndoles dicha dualidad.

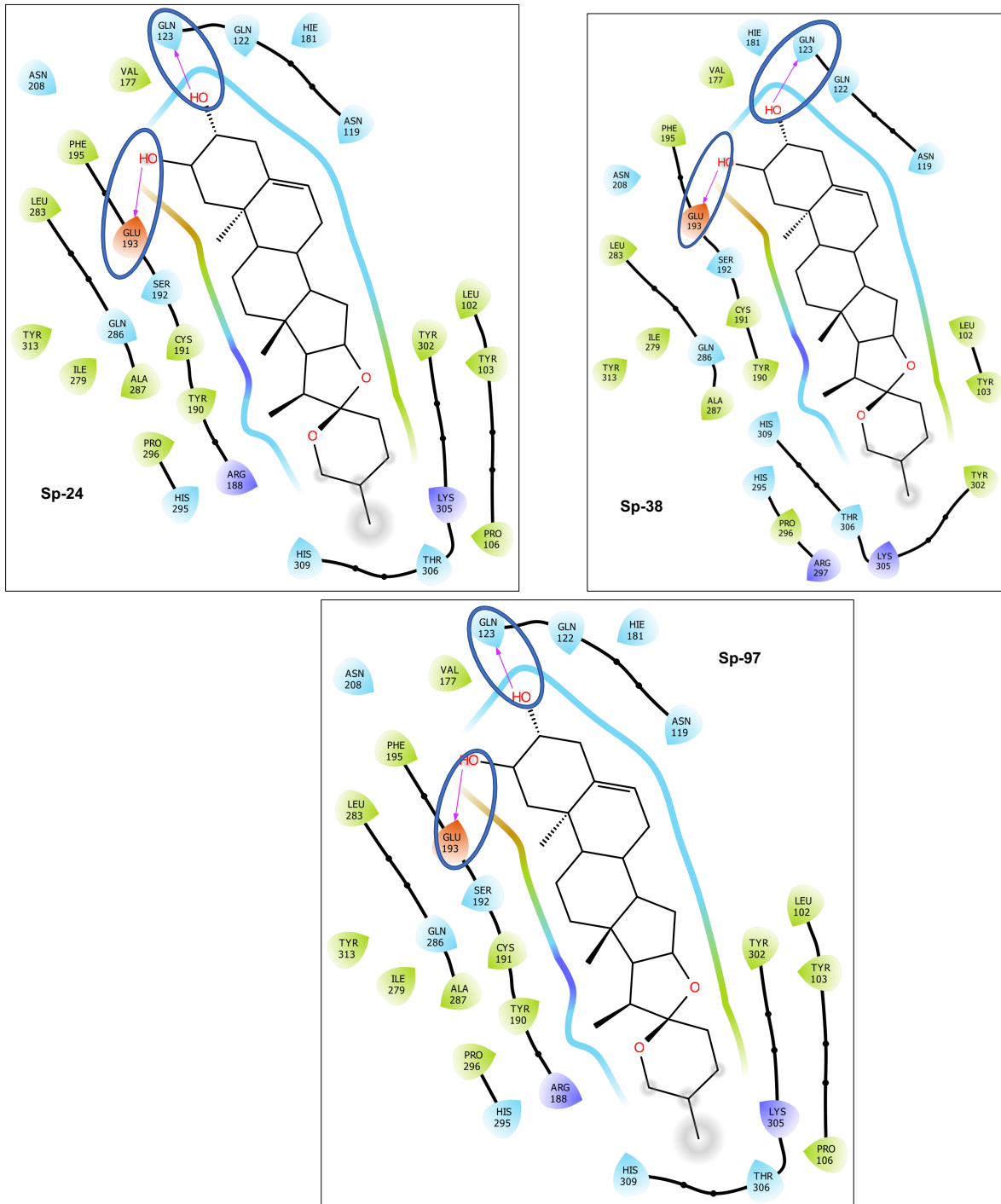


Figura 28. Sp-24, Sp-38 y Sp-97, comparación como moléculas duales y aminoácidos de importancia para su acción.

También podemos encontrar a las Sp-52, 81, 82, 101, 154.

Estas sapogeninas se caracterizan por presentar interacciones fundamentales de ambas moléculas, tanto de la KP-10, como de la p-234. De este modo permite actuar ya sea como agonista o antagonista, la desventaja de esto es

que puede comportarse como un modulador positivo o negativo, lo cual implica que para una patología en particular que se quiera abordar, sería una incertidumbre y muy probablemente cause efectos adversos que puedan condicionar la salud del paciente.

## Sapogeninas sin Actividad

Dentro del análisis, se pudo observar sapogeninas que no presentan alguna actividad frente al sitio de unión al receptor, por tanto se descartan en su totalidad, pero para fines del estudio, se puede ver que pese a cumplir con la energía de acoplamiento, es necesario comprender y analizar las distintas interacciones y aminoácidos que están presentes en las moléculas.

Sp-13, 17, 26, 31, 36, 55, 62, 76, 80, 83, 84, 91, 100, 102, 103, 106, 107, 108, 109, 111, 114, 115, 134, 138, 128, 134, 135, 138, 141, 143, 150, 152, 153.

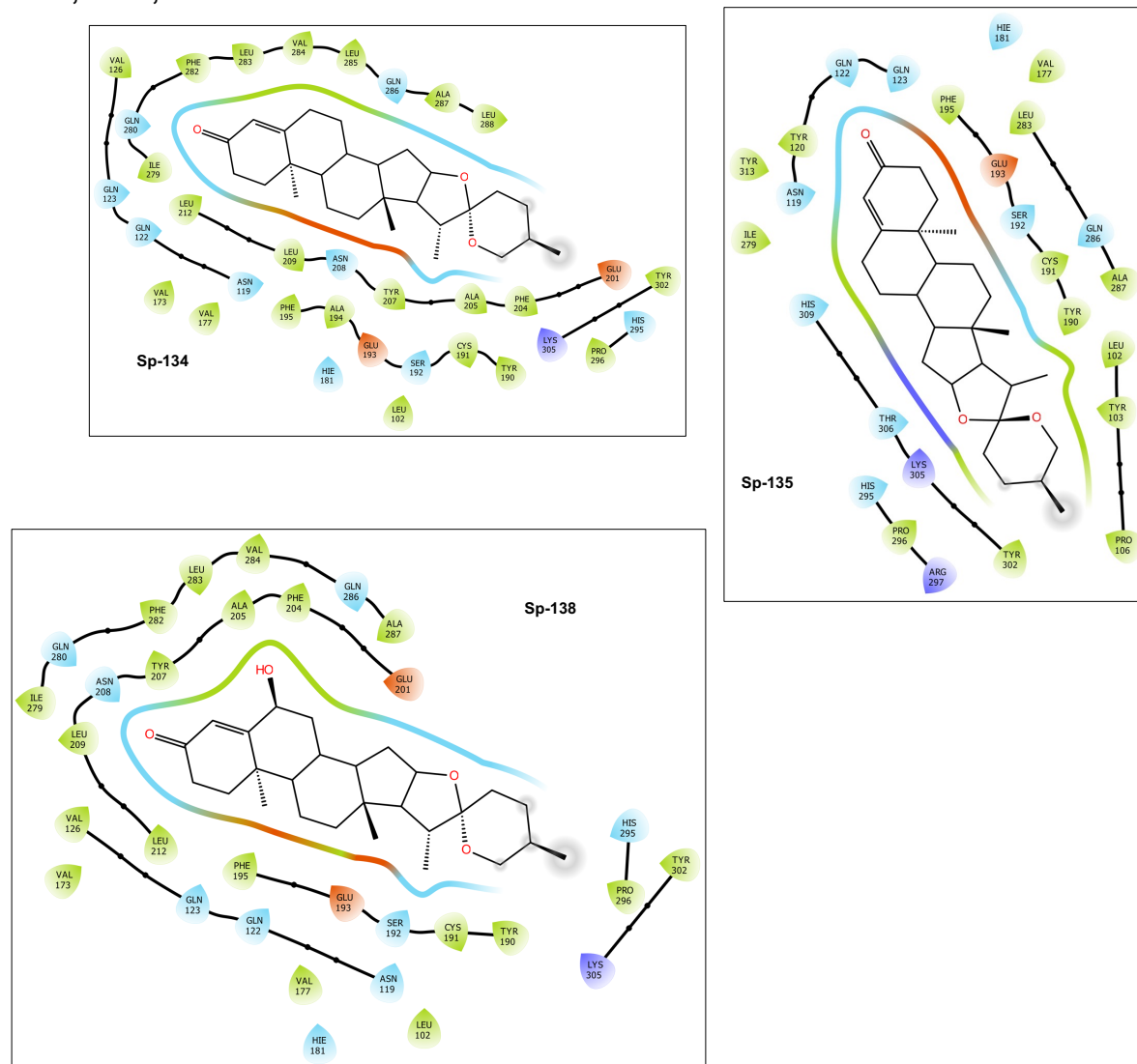


Figura 29. Sp-134, Sp-135 y Sp-138, comparación como moléculas sin actividad y aminoácidos que presentan.

Todas estas moléculas no han cumplido con las características necesarias para la interacción con el sitio de unión al receptor, por tanto no tiene una mayor importancia dentro del análisis.

## CONCLUSIÓN

Se tiene 154 moléculas esteroidales llamadas sapogeninas, las cuales pueden ser un nuevo blanco terapéutico para el abordaje de distintas enfermedades, tal es el caso del cáncer ya sea de hígado, pulmón o síndromes asociados al desarrollo y madurez sexual como el síndrome de ovario poliquístico.

De 154 sapogeninas analizadas, cabe destacar que no todas tienen un efecto modulador sobre el receptor KISS1R, dado que para que esto se cumpliera, tenía que tener los enlaces necesarios, así como los sustituyentes que son necesarios para llevar a cabo un acoplamiento, tomando en cuenta la energía de acoplamiento que estas presentaban y comparados con las moléculas comerciales que existen para dicho receptor como lo es la KP-10 (agonista) y la P-234 (antagonista).

De este modo tenemos a las Sp-5, 14, 23, 28, 43, 45, 47, 56, 59, 74, 75, 85, 91, 147, 148, 151 comportándose como moduladores positivos y a las Sp-10, 18, 24, 35, 38, 77, 102, 105, 110, 126, 130, 142, 146 como moduladores negativos.

La importancia de este proyecto recae en los hallazgos que se encontraron con la actividad que presenta cada sapogenina, hablando primeramente de las sapogeninas que funcionan como moduladores positivos, se sugiere que pueden actuar en patologías asociadas a enfermedades donde la maduración sexual es lenta ya que con respecto a la vía de señalización, se puede hacer una deducción del comportamiento de dicha molécula, utilizándose en la pubertad tardía por citar un ejemplo, cabe destacar que con estas sapogeninas, cambiaría totalmente el mecanismo para abordar estas enfermedades, ya que al llegar al receptor de kisspeptina, permitiría un flujo pulsátil y constante de las hormonas sexuales como lo son la LH y la FSH, a través de la estimulación del receptor de Kisspeptina, donde a futuro lo importante es conocer las dosis mínimas efectivas para que de este modo se pueda alcanzar el efecto terapéutico deseado, para esto se deben hacer más análisis a profundidad, pero se tienen moléculas potencialmente importantes para esta serie de patologías.

Por otro lado aquellas moléculas que funcionan como moduladores negativos, se sugiere que tienen la capacidad de inhibir esa secreción pulsátil de las hormonas sexuales, ya que inactiva o disminuye la actividad del receptor por como se analiza la vía de señalización y su comportamiento en la misma, por tanto el estudio ha permitido encontrar dos alternativas terapéuticas bastantes alentadoras, con las sapogeninas antagonistas, se puede tener un nuevo enfoque terapéutico en patologías como el SOP, permitiendo que exista un control y desarrollo correcto de los caracteres sexuales sin necesidad de condicionar la salud de las pacientes con los tratamientos hormonales mal regulados.

Existieron moléculas duales, aunque de esto cabe resaltar que no son seguras porque no se sabe con exactitud cómo actuarían frente a una enfermedad, donde puedes obtener una mejoría o agravar la enfermedad. Para fines de investigación, sería importante analizar esos aminoácidos que les confieren esa característica dual.

A través de este trabajo de investigación se abre una nueva brecha de investigación con el uso de estas moléculas que pueden ser una nueva alternativa terapéutica a las distintas patologías antes mencionadas y así poderlas abordar de mejor manera. Nota general de la conclusión. Re-escribir

## Referencias

- [1] Fratangelo, F., Carriero, M. V., & Motti, M. L. (2018). Controversial role of Kisspeptins/KiSS-1R signaling system in tumor development. *Frontiers in Endocrinology*, 9. doi:10.3389/fendo.2018.00192
- [2] Guzman, S., Brackstone, M., Radovick, S., Babwah, A. V., & Bhattacharya, M. M. (2018). KISS1/KISS1R in cancer: Friend or Foe? *Frontiers in Endocrinology*, 9. doi:10.3389/fendo.2018.00437
- [3] Ali Abbara., et al. (2020). Kisspeptin receptor agonist has therapeutic potential for female reproductive disorders. *J Clin Invest*. doi.org/10.1172/JCI139681.
- [4] Hu, K.-L., Et al. (2018). Kisspeptin/Kisspeptin receptor system in the ovary. *Frontiers in Endocrinology*, 8. doi:10.3389/fendo.2017.00365
- [5] Guzman, S., Brackstone, M., Radovick, S., Babwah, A., & Bhattacharya, M. (2018). KISS1/KISS1R in cancer: friend or foe?. *Frontiers In Endocrinology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00437>
- [6] Millar, R. P., & Babwah, A. V. (2015). KISS1R: Hallmarks of an effective regulator of the neuroendocrine axis. *Neuroendocrinology*, 101(3), 193–210. Doi:10.1159/000381457
- [7] National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 74412163, Kisspeptin-10, human. Retrieved August 23, 2022 from [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Kisspeptin-10\\_-human#section=2D-Structure](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Kisspeptin-10_-human#section=2D-Structure).
- [8] Depositphotos, I. (n.d.). Kisspeptin 10 . Royalty-free images, photo stock, Video & Music. Depositphotos. Recuperado de: <https://depositphotos.com/>
- [9] Flipper.diff.org. 2022. Kisspeptin. [online] Disponible en: <https://flipper.diff.org/app/pathways/info/3997>. Recuperado el 14 de septiembre de 2022. Citar el artículo original
- [10] Hu, K.-L., Zhao, H., Chang, H.-M., Yu, Y., & Qiao, J. (2018). Kisspeptin/Kisspeptin Receptor System in the Ovary. *Frontiers in Endocrinology*, 8. doi:10.3389/fendo.2017.00365
- [11] Tang, R., Ding, X., & Zhu, J. (2019). Kisspeptin and Polycystic Ovary Syndrome. *Frontiers in Endocrinology*, 10. doi:10.3389/fendo.2019.00298
- [12] Mendoza Lara, D. F., Vela Sancho, G. B., & Chama Martínez, Y. E. (2020). El potencial de la diosgenina en el área médica. *RD-ICUAP*, 6(18), 50-62. Recuperado de <http://rd.buap.mx/ojs-dm/index.php/rdicuap/article/view/244>
- [13] Ratner, B. D. (2019). Biomaterials: Been There, Done That, and Evolving into the Future. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 21(1), 171-191. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-062117-120940>. Sethi, G.; Shanmugam, M. K.; Warriar, S.; Merarchi, M.; Arfuso, F.; Kumar, A. P. y Bishayee, A. (2018). Pro-apoptotic and anti-cancer properties of diosgenin: A comprehensive and critical review. *Nutrients*, Vol. 10, 19 de mayo de 2018. <https://doi.org/10.3390/nu10050645>

- [14] Jesus, M.; Martins, A. P. J.; Gallardo, E. y Silvestre, S. (2016). Diosgenin: Recent Highlights on Pharmacology and Analytical Methodology. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/4156293>.
- [15] Chen, Y.; Tang, Y. M.; Yu, S. L.; Han, Y. W.; Kou, J. P.; Liu, B. L. y Yu, B. Y. (2015). Advances in the pharmacological activities and mechanisms of diosgenin. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 13(8), 578-587. [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(15\)30053-4](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(15)30053-4)
- [16] Azubuiké, U., Newton, C., & van den Bout, I. (2022). Lack of Oestrogen Receptor Expression in Breast Cancer Cells Does Not Correlate with Kisspeptin Signalling and Migration. *International Journal Of Molecular Sciences*, 23(15), 8744. doi: 10.3390/ijms23158744
- [17] Ballón Paucara, Wendy Guadalupe, Grados Torrez, Ricardo Enrique. (2019). Acoplamiento molecular: criterios prácticos para la selección de ligandos biológicamente activos e identificación de nuevos blancos terapéuticos. *Revista CON-CIENCIA*, 7(2), 55-72.
- [18] Gaddam Sandeep, Kurre Purna Nagasree, Muppaneni Hanisha & Muthyala Murali Krishna Kumar. (2011). AUDocker LE: A GUI for virtual screening with AUTODOCK Vina. *BMC Research Notes*, 4, 445.
- [19] Digital CSIC. Modelado comparativo de proteínas Homology modelling. (n.d.). Recuperado el 04 de diciembre de 2022 en: [https://digital.csic.es/bitstream/10261/59335/3/modelado\\_comparativo\\_BContrerasMoreira.pdf](https://digital.csic.es/bitstream/10261/59335/3/modelado_comparativo_BContrerasMoreira.pdf)
- [20] Muhammed, M. T., & Aki-Yalcin, E. (2018). Homology Modeling in Drug Discovery: Overview, Current Applications and Future Perspectives. *Chemical Biology & Drug Design*. doi:10.1111/cbdd.13388
- [21] Homology modeling. Profacgen-Homology Modeling. (n.d.). Recuperado el 03 de diciembre de 2022, en: <https://www.profacgen.com/homology-modeling.htm>
- [22] Kariyappa, G. G. (2022). Crystallite shapes and functional data analysis of silk forms using X-ray diffraction: Microwave irradiation effects. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 13(3), 241. <https://doi.org/10.33263/briac133.241>
- [23] De la Rosa J. (2022). Evaluación de los receptores Kiss1r en el útero de ratas Wistar puberales [tesis para optar al título de maestría]. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- [24] UniProt. Q969F8 · KISSR\_HUMAN. Recuperado de: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q969F8/entry>
- [25] Schrödinger. Sequence Viewer. Recuperado de: <https://www.schrodinger.com/training/videos/biologics/introducing-new-multiple-sequence-viewer>
- [26] Miller. R. L. Et alt. (2015). The crystal structure of nociceptin/orphanin FQ peptide receptor (NOP) in complex with C-35 (PSI Community Target). *PROTEIN DATA BANK-PDB*. Recuperado de: <https://www.rcsb.org/structure/5DHG>
- [27] Schrödinger. Protein Preparation Wizard. Recuperado de: <https://www.schrodinger.com/training/videos/biologics/introducing-new-multiple-sequence-viewer>
- [28] Schrödinger. LigPrep. Recuperado de: <https://www.schrodinger.com/training/videos/biologics/introducing-new-multiple-sequence-viewer>

[29] Lopez Castillo, G., Et alt. (2023). Spirostans design as novel ligands for cb1 and cb2 cannabinoid receptors, Volume 13. <https://doi.org/10.33263/BRIAC13X.000>