BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

Facultad de Ciencias Químicas
Posgrado en Ciencias Químicas

Diseño y evaluación *in silico* de ésteres de diosgenina con aminoácidos para tratar el síndrome de ovario poliquístico

Tesis para obtener el grado de
Maestro en Ciencias Químicas
En el área de Química Orgánica

Presenta:

LBT. Jesús Alberto Rojas Morales

Directores:

Dr. Jesús Sandoval Ramírez
M. C. Félix Luna Morales

LESQO
Laboratorio de Elucidación y Síntesis en Química Orgánica

Puebla, Puebla, septiembre 2022

"… considera estirpe y ascendencia:
Nacisteis no para vivir cual brutos,
sino para adquirir virtud y ciencia."
Divina Comedia, Dante Alighieri.

"… to learn is not to know.
There are the learners and the learned.
Memory makes the one, philosophy
the other."
El conde de Montecristo, Alexandre Dumas

Una vez más y siempre, a Carmen y Alberto.



El presente trabajo fue desarrollado bajo la dirección del Dr. Jesús Sandoval Ramírez y el M. en C. Félix Luna Morales en el Laboratorio de Elucidación y Síntesis en Química Orgánica con apoyo del Dr. Alan Carrasco Carballo. El trabajo fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con el número de beca 834462, periodo 2020-2022 y por la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado de la BUAP con número de proyecto 00119, periodo 2021-2022.







BUAP

A QUIEN CORRESPONDA:

Por este conducto la Comisión Revisora formada por la Dra. María Laura Asunción Orea Flores, Dr. José Luis Vega Báez, Dr. Victorino Gilberto Serafín Alatriste Bueno y el Dr. Alan Carrasco Carballo, informan haber leído y aprobado para su impresión, la tesis denominada **"Diseño y evaluación *in silico* de ésteres de diosgenina con aminoácidos para tratar el síndrome de ovario poliquístico",** que presenta el alumno **Jesús Alberto Rojas Morales** para obtener el grado de Maestro en Ciencias Químicas.

Se extiende la presente a los dos días del mes de agosto del año dos mil veintidós.

A T E N T A M E N T E

Dra. María Laura Asunción Orea Flores

Dr. José Luis Vega Báez

Dr. Victorino Gilberto Serafín Alatriste Bueno

Dr. Alan Carrasco Carballo

Agradecimientos

Al Dr. Jesús Sandoval Ramírez, al darme la oportunidad ya no de formarme, sino de poner a prueba mis capacidades y aptitudes para la investigación, así como su conocimiento y experiencia transmitida antes, durante y ansiosamente después de este posgrado.

Al M. en C. Félix Luna Morales por permitirme desarrollar este trabajo, sus valiosas observaciones y consejos no solo para el trabajo sino para mi formación como profesional

Al Dr. Alan Carrasco Carballo, por su invaluable apoyo al proyecto del cual, seguramente en su ausencia habría sido imposible de desarrollar. No solamente agradezco el apoyo a nivel técnico del proyecto, sino por enseñarme una experiencia realmente con lo mejor, lo bueno y lo malo de lo que significa ser un investigador.

A la comisión revisora integrada por la Dra. María Laura Orea Asunción Flores, Dr. José Luis Vega Báez y al Dr. Victorino Gilberto Serafín Alatriste Bueno por sus valiosas aportaciones para corregir y mejorar este trabajo, así como sus atenciones durante todo el desarrollo del proyecto.

A la I.Q. Lopez Castillo encargada del área de vinculación y al LBt. Mendoza Lara, mis mejores amigos y colegas. Saludos cordiales.

A todas las personas a las que he enseñado y que me han enseñado, las cuales no puedo enumerar y que sin embargo formaron parte de mi formación en la investigación.

Índice

Agradecimientos **6**
Abreviaturas **9**
Resumen **14**
1. Antecedentes **15**
1.1 Biología molecular del SOP **17**
1.1.1 Receptor de andrógenos 18
1.1.2 Receptores α y β de estrógenos 19
1.1.3 Receptor de progestágenos 20
1.1.4 Receptor de vitamina D 22
1.1.5 Globulina de unión a vitamina D 22
1.1.6 Receptores de mineralocorticoides y glucocorticoides 23
1.1.7 Enzima de escisión de la cadena lateral del colesterol (CYP11A1) 24
1.1.8 17α-hidroxilasa/17, 20 liasa 25
1.1.9 Aromatasa (CYP19A1) 25
1.1.10 21-Hidroxilasa 27
1.1.11 Globulina de unión a hormonas sexuales 28
1.1.12 Receptor de esteroides asociado a membrana de respuesta rápida 29
1.1.13 Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular 30
1.1.14 3-Oxo-5α-esteroide-4-deshidrogenasa tipo 2 31
1.2 Tratamientos contra SOP **32**
1.2.1 Sensibilizadores de insulina 33
1.2.2 Fármacos antidislipidémicos 33
1.2.3 Fármacos anti androgénicos 34
1.2.4 Anticonceptivos 36
1.3 Esteroides: papel fisiológico y potencial farmacológico **37**
2. Objetivos **43**
Objetivo general **43**
Objetivos particulares **43**
3. Discusión de resultados **44**
3.1 Primer nivel de análisis: energía de afinidad **47**
3.2 Segundo nivel de análisis: sitio de interacción molecular **56**
3.2.1 Enzima 5α-reductasa 57
3.2.2 CYP11A1 59
3.2.3 Globulina de unión a vitamina D 62
3.2.4 Globulina de unión a hormonas sexuales 64
3.2.5 MARRS 67
3.3 Tercer nivel de análisis: interacciones ligando-proteína **68**
3.3.1 5α-reductasa 70
3.3.2 Enzima CYP11A1 74
3.3.3 Globulina de unión a vitamina D 81
3.4 Exactitud en el diagnóstico molecular usando métodos *in silico* **85**
3.5 Estudios ADMET **88**

3.4 Análisis retrosintético.....92
4. Conclusiones 100
5. Metodología Experimental.....102
5.1 Obtención de estructuras tridimensionales.....102
5.2 Obtención de ligandos y fármacos.....102
5.3 Minimización energética y asignación de cargas 103
5.4 Docking molecular.....104
5.5 Estudios ADMET.....104
5.6 Análisis estadístico 105
Referencias.....107

Abreviaturas

aa: aminoácido

Aminoácidos:

Ala: Alanina
Arg: Arginina
Asn: Asparagina
Asp: Aspartato
Cys: Cisteína
Gln: Glutamina
Glu: Glutamato
Gly: Glicina
His: Histidina
Ile: Isoleucina
Leu: Leucina
Lys: Lisina
Met: Metionina
Phe: Fenilalanina
Pro: Prolina
Ser: Serina
Thr: Treonina
Trp: Triptófano
Tyr: Tirosina
Val: Valina

Enzimas:

5αR: 3-Oxo-5α-esteroide-4-deshidro-genasa
CYP11A1: Enzima de escisión de la cadena del colesterol
CYP17A1: 17α-hidroxilasa/17, 20 liasa
CYP19A1: Aromatasa
CYP21A2: 21-Hidroxilasa

Receptores:

AR: Receptor de andrógenos
ER, ER: Receptor de estrógenos, receptor de estrógenos
PR: Receptor de estrógenos
VDR: Receptor de vitamina D
MR: Receptor de mineralocorticoides
GR: Receptor de glucocorticoides
MARRS: Receptor de esteroides asociado a membrana de respuesta rápida
VGEFR2: Receptor del factor de crecimiento endotelial tipo 2

Globulinas:

VDB: Globulina de unión a vitamina D
SHBG: Globulina de unión a hormonas sexuales

Software

AD4: AutoDock 4
ADV: AutoDock Vina

AOC: Anticonceptivo oral combinado
AUC: Área bajo la curva
DUL: Dominio de Unión a Ligando
ADMET: Administración, Distribución, Metabolización, Excreción, Toxicidad
Dg: Diosgenina
DHT: Dihidrotestosterona
DUL: Dominio de unión a ligando
EA: Energía de acoplamiento (kcal/mol)
EDA: Ésteres de diosgenina con aminoácido
FSH: Hormona foliculoestimulante
Phth: Grupo ftalamidato
NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
RNE: Receptor nuclear esteroidal
ROC: Curva característica operativa del receptor
SOP: Síndrome de ovario poliquístico
SNP: Polimorfismo de nucleótido único

Índice de figuras

Figura 1. De izquierda a derecha: Hipócrates, Maimónides, Ambroise Paré. Publicación original de Stein y Leventhal de 1935 (5).....15
Figura 2. Vías endócrinas y metabólicas en el SOP.....17
Figura 3. Organización estructural de AR. 18
Figura 4. Interacciones proteína-ligando y estructura del DUL de AR (PDB: 2AMA)....18
Figura 5. Efectos fisiológicos de diferentes niveles de expresión en SOP de ERα y ERβ. 20
Figura 6. Estructura del DUL de PR (PDB: 3HQ5). Tejido endometrial normal e hiperplásico. 21
Figura 7. Estructura de la VDB (PDB: 1J7E). En azul el DUL con su ligando endógeno y en rojo el dominio de unión a actina.....23
Figura 8. Interacción ligando-proteína del colesterol en CYP11A1.....24
Figura 9. Efectos de la vitamina D mediado por VDR y MARRS con efectos genómicos directos e indirectos (57). 29
Figura 10. Vías de señalización e interacciones ligando-proteína de inhibidor comercial sunitinib con el receptor VGEF. 31
Figura 11. Estructuras de sensibilizadores de la insulina usados en SOP 33
Figura 12. Estructuras de estatinas usadas en SOP 34
Figura 13. Estructura de fármacos antiandrogénicos contra SOP.....35
Figura 14. Estructura de la abiraterona y la finasterida.....35
Figura 15. Estructuras de las principales familias hormonales esteroidales 38
Figura 16. Estructuras de 16α-LE2 y 8β-VE2, inhibidores de ERα y ERβ. 38
Figura 17. Estructura de la testonolactona, formestano y exemestano.....39
Figura 18. Ejemplos de un azaesteroide (4-MA), una oxima (CMP-1) y un bioconjugado (estramustina) como anticancerígenos 39
Figura 19. Complejos Pt-Conjugado aminoácido-esteroidal.....40
Figura 20. Estructura del ácido biliar funcionalizado con Val-Gly. 41
Figura 21. Conjugación de *O*-metil Tyr con un esteroide de *P. boletiformis.* 41
Figura 22. Obtención de la 26-OH diosgenina. 42
Figura 23. Esquema para el diseño, análisis y evaluación de los compuestos EDA en dianas implicadas en el SOP. 44
Figura 24. Compuestos EDA estudiados en esta tesis.....45
Figura 25. Estructura de EDA aromáticos.....55
Figura 26. Energías de acoplamiento de EDA en 5α-reductasa obtenidos con AD4 y ADV. 57
Figura 27. Superposición de EDA en 5αR obtenidos con AD4 (izquierda) y ADV (derecha).....58
Figura 28. Comparación de EA y superposición de EDA en 5αR obtenidos con Glide. .58
Figura 29. Energías de acoplamiento de EDA en CYP11A1 obtenidos con AD4 y ADV. 60
Figura 30. Estructuras de Trp-Dg sobre el grupo prostético hemo e His-Dg en CYP11A1 obtenidas por AD4 y ADV. 60
Figura 31. Comparación de EA y superposición de EDA en CYP11A1 con Glide. 61

Figura 32. Estructura de Phe-Dg y Trp-Dg. 61
Figura 33. Energías de acoplamiento de EDA en VDB obtenidos con AD4 y ADV respectivamente 62
Figura 34. Superposición de EDA en VDB obtenidos con AD4. En azul Phe-Dg, Leu-Dg y Tyr-Dg; en rojo Arg-Dg 63
Figura 35. Superposición de EDA en VDB obtenidos con ADV. En rojo está Arg-Dg... 63
Figura 36. Comparación de EA y superposición de EDA en VDB obtenidos con Glide. 64
Figura 37. Energías de acoplamiento de EDA en SHBG obtenidas con AD4 y ADV respectivamente 65
Figura 38. Superposición de EDA en el sitio activo de SHBG obtenidos con AD4 y ADV. 66
Figura 39. Comparación de EA en VDB obtenidos con Glide y superposición de EDA. 66
Figura 40. Energías de acoplamiento de EDA en MARRS obtenidas con AD4 y ADV, respectivamente 67
Figura 41. Superposición de EDA en MARRS obtenidos con AD4 y ADV. 68
Figura 42. Comparación de EA y superposición de EDA en MARRS obtenidos con Glide. 68
Figura 43. Interacciones críticas de testosterona y finasterida en 5αR. 71
Figura 44 Interacciones ligando-proteína de Trp-Dg en 5αR obtenidas con AD4. 71
Figura 45. Interacciones ligando-proteína de Trp-Dg en 5αR obtenidas con ADV. 72
Figura 46. Interacciones del derivado Trp-Dg en 5αR obtenidas con Glide. 73
Figura 47. Interacciones críticas del colesterol en la enzima CYP11A1. 75
Figura 48. Interacciones ligando-proteína de Trp-Dg en la enzima CYP11A1 obtenidas con ADV. 76
Figura 49. Interacciones ligando-proteína de Phe-Dg en la enzima CYP11A1 obtenidas con ADV. 77
Figura 50. Interacciones ligando-proteína de Trp-Dg en la enzima CYP11A1 obtenidas con AD4. 78
Figura 51. Interacciones ligando-proteína de Tyr-Dg en la enzima CYP11A1 obtenidas con AD4. 79
Figura 52. Interacciones ligando-proteína de Tyr-Dg en la enzima CYP11A1 obtenidas con Glide. 80
Figura 53 Interacciones ligando-proteína de Phe-Dg en la enzima CYP11A1 obtenidas con Glide. 81
Figura 54. Interacciones ligando-proteína de Trp-Dg y Tyr-Dg en VDB obtenidas con AD4 y ADV 82
Figura 55. Interacciones ligando-proteína de Ile-Dg y Gly-Dg en VDB obtenidas con AD4. 83
Figura 56. Interacciones ligando-proteína de Trp-Dg y Asn-Dg en VDB obtenidas con ADV. 84
Figura 57. Interacciones ligando-proteína de Trp-Dg y Asn-Dg en VDB obtenidas con ADV. 84
Figura 58. Curva ROC de EDA vs ligandos endógenos 86
Figura 59. Curva ROC de fármacos vs EDA. 87
Figura 60. Estructuras de los 4 mejores compuestos obtenidos 89

Figura 61. Radar de biodisponibilidad de los 4 mejores EDA.....89
Figura 62. Probabilidad de toxicidad de los EDA mediante PASSonline. 91
Figura 63. Estructura 3D de la hemoglobina y 2D del grupo hemo.....92
Figura 64. Retrosíntesis de EDA a partir de diosgenina. 93
Figura 65. Estructura del Boc, CBz y Fmoc. 94
Figura 66. Desprotección de bioconjugados Dg-AA.....94
Figura 67. Obtención de aminoácidos Bis-*N* Protegidos.....94
Figura 68. Intermediarios *N*-protegidos de los mejores compuestos obtenidos 95
Figura 69. Superposición de los compuestos EDA protegidos y desprotegidos en la enzima CYP11A1. 97
Figura 70. Superposición de los compuestos EDA protegidos y no protegidos en VDB. 98
Figura 71. Interacciones ligando-proteína de Phth-Trp-Dg en VDB.....98
Figura 72. Estructura de Trp-Dg y Tyr-Dg 100
Figura 73. Estructura de Trp-Dg y Tyr-Dg 101

Índice de tablas

Tabla 1. Fenotipos y manifestaciones clínicas del SOP.....16
Tabla 2. Generaciones de AOC y sus efectos metabólicos y androgénicos.....36
Tabla 3 Proteínas asociadas al SOP y el efecto deseado según el fenotipo de la enfermedad. 46
Tabla 4. Energías de acoplamiento (kcal/mol) obtenidas con AD4 en dianas cuya inhibición es favorable.....47
Tabla 5. Energías de acoplamiento (kcal/mol) obtenidas con ADV en dianas cuya inhibición es deseable. 48
Tabla 6. Energíass de acoplamiento obtenidas con Glide (kcal/mol) en dianas cuya inhibición es deseable. 49
Tabla 7. Energías de acoplamiento (kcal/mol) obtenidas con AD4 y dianas cuya inhibición es deseable.....50
Tabla 8. Energías de acoplamiento (kcal/mol) obtenidas con ADV para dianas cuya inhibición es indeseable.....51
Tabla 9. Energías de acoplamiento (kcal/mol) obtenidas con Glide para dianas cuya inhibición es indeseable.....52
Tabla 10. Energías de acoplamiento (kcal/mol) obtenidas por AD4 para dianas cuya activación es deseable. 53
Tabla 11. Energías de acoplamiento (kcal/mol) obtenidas con AD4 para dianas cuya activación es deseable. 53
Tabla 12. Energías de acoplamiento (kcal/mol) obtenidas con Glide para dianas cuya activación es deseable. 54
Tabla 13. Estadística de valor de AD4, ADV y Glide. Ligandos endógenos vs compuestos EDA.....56
Tabla 14. Diagnóstico con base en los 3 sistemas usados.....69
Tabla 15. Diagnóstico con base en los 3 sistemas evaluados.....70

Tabla 16. Interacciones esenciales y EA de los EDA en 5αR con ADV. 73
Tabla 17. Interacciones esenciales y EA de los EDA en 5αR obtenidas con AD4..... 74
Tabla 18. Interacciones esenciales y EA de los EDA en 5αR obtenidas con Glide. 74
Tabla 19. Interacciones esenciales y EA de los EDA en la enzima CYP11A1 obtenidas con ADV. 75
Tabla 20. Interacciones esenciales y EA de los EDA en la enzima CYP11A1 obtenidass con AD4. 77
Tabla 21. Interacciones esenciales y EA de los compuestos EDA en la enzima CYP11A1 obtenidas con Glide. 79
Tabla 22. Interacciones y ΔEA los compuestos EDA vs ligando de referencia de Leu-Dg y Asn-Dg. 81
Tabla 23. Interacciones esenciales y EA de los compuestos EDA en VDB obtenidas con AD4. 82
Tabla 24. Interacciones esenciales y EA de EDA en VDB obtenidas con ADV. 83
Tabla 25. Interacciones esenciales y EA de los EDA en VDB obtenidas con Glide..... 85
Tabla 26. AUC de ligandos endógenos/fármacos vs EDA..... 88
Tabla 27. Propiedades farmacocinéticas de los 4 mejores derivados EDA. 90
Tabla 28. Comparación de EA de EDA protegidos vs desprotegidos (kcal/mol). 95
Tabla 29. Comparación de EA de EDA protegidos vs desprotegidos (kcal/mol). 96
Tabla 30. Comparación de EA de EDA protegidos vs desprotegidos (kcal/mol). 96
Tabla 31. Nombre, abreviaciones, PDB ID y UniProt ID de las proteínas utilizadas. ... 102
Tabla 32. Ligandos y fármacos de referencia de las proteínas estudiadas..... 103
Tabla 33. Estados diagnósticos y condicionales 105
Tabla 34. Diagnósticos y condicionales asociados..... 106

Índice de esquemas

Esquema 1. Reacciones de biotransformación de esteroides mediados por CYP17A1.... 25

Esquema 2. Biosíntesis de esteroides en las células del ovario..... 26

Esquema 3. Biosíntesis de precursores de mineralcorticoides y glucocorticoides por CYP21A2. 28

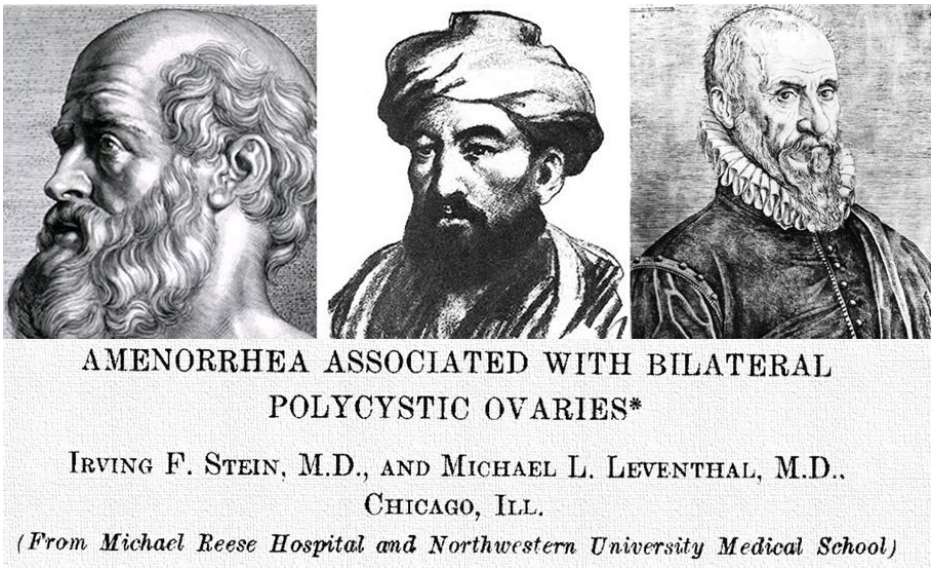
Esquema 4. Conversión de testosterona a 5-dehidrotestosterona por la 5α-reductasa..... 32

Resumen

El síndrome de ovario poliquístico (SOP) es una enfermedad con alta prevalencia en la población femenina mundial (6 al 20%), de sintomatología heterogénea y gravedad variable agrupando manifestaciones metabólicas y endócrinas que han sido agrupadas según los Criterios de Rotterdam en 3 fenotipos identificables, para los cuales existen dianas biológicas asociadas y cuyo tratamiento no las engloba como una enfermedad sistémica sino como enfermedades individuales. Se estudió el efecto de bioconjugados esteroidales a nivel *in silico* en dianas asociadas al SOP a nivel endócrino e indirectamente a nivel metabólico del SOP utilizando 3 de los softwares más importantes de docking molecular: AutoDock Vina, AutoDock 4 y Glide. Se concluyó que Glide (software comercial) asocia mejor la energía de acoplamiento con la interacción proteína-ligando; obteniendo resultados similares con los software Open-Source AutoDock Vina y AutoDock 4 4 derivados presentaron las mejores probabilidades de interacción en contra del fenotipo clásico (Trp-Dg y Tyr-Dg) y no hiperandrogénico de SOP (Leu-Dg y Asn-Dg), la predicción de propiedades farmacocinéticas no los considera aptos para su administración oral y prediciendo potencial actividad en contra de CYP50 siendo focos de atención para posteriores estudios *in vivo.*

1. Antecedentes

Hipócrates (460-377 a. c.) describió en "de las enfermedades de las mujeres" a algunas mujeres con la presencia de características masculinas, infertilidad y periodos de menstruación breves o irregulares (1). Por su parte, Sorano de Éfeso (98-138 a. c.) reportó que la falta de menstruación se presentaba en su mayoría en mujeres con "cuerpos masculinos, robustos y estériles" (2) y Maimónides (1135-1204 e. c.), oriundo de Asia Occidental refirió que "hay mujeres cuya piel es seca y dura, cuya naturaleza recuerda a la naturaleza del hombre… no resultado de medicaciones sino de una actividad menstrual intensa". Ambroise Paré (1510-1590), observó que "…muchas mujeres, cuando sus flores o lágrimas se detienen, degeneran de una manera en naturaleza varonil de donde se les llama "Viragines", es decir, robustas o varoniles, con voz fuerte y gruesa recordando a la del hombre, también desarrollan barba" (3). Todas estas características masculinas en mujeres durante mucho tiempo fueron percibidas como "curiosidades", aberraciones de la naturaleza femenina, y hasta la publicación de Stein y Leventhal en 1935 (Figura 1) en mujeres con ciclos menstruales perturbados, hirsutimo y ovarios agrandados, características que fueron formalmente reconocidas como síntomas de una enfermedad y no manifestaciones clínicas aisladas (4).



AMENORRHEA ASSOCIATED WITH BILATERAL POLYCYSTIC OVARIES*

IRVING F. STEIN, M.D., AND MICHAEL L. LEVENTHAL, M.D.,
CHICAGO, ILL.

(From Michael Reese Hospital and Northwestern University Medical School)

Figura 1. De izquierda a derecha: Hipócrates, Maimónides, Ambroise Paré. Publicación original de Stein y Leventhal de 1935 (5).

No es, hasta 1992 que la enfermedad fue formalmente reconocida como síndrome de ovario poliquístico (SOP) la cual en la actualidad ha sido ampliamente estudiada a distintos niveles, desde la etiología de la enfermedad, manifestaciones clínicas y potenciales tratamientos para la misma (6–8). Se caracteriza por presentar sintomatología heterogénea entre las pacientes, con una prevalencia mundial de alrededor del 6 al 20% en mujeres en edad premenopáusica en la que usualmente es diagnosticada. A pesar de su alta incidencia y debido a la heterogeneidad de la enfermedad, no se cuenta con un sistema de diagnóstico confiable, por lo que han surgido debates respecto a la sintomatología y la definición del SOP, lo que condujo a la sociedad americana para la medicina reproductiva (ASRM) y a su homóloga europea (ESHRE) a establecer en 2003, el acuerdo conocido como los Criterios de Rotterdam (9,10).

Tabla 1. Fenotipos y manifestaciones clínicas del SOP

Fenotipo de SOP	Clásico	Ovulatorio	No Hiper androgénico
Hiperandrogenismo (hirsutismo, acné, alopecia, seborrea)	✓	✓	✗
Oligo-ovulación (disfunción menstrual, fertilidad reducida, hiperplasia endometrial)	✓	✗	✓
Morfología Ovárica Poliquística (MOP) (Síndrome de Hiperestimulación ovárico)	✓*	✓	✓

✓Presente ✗No presente * Presente en la variante más agresiva

En éste acuerdo, se propuso que el diagnóstico del SOP se puede establecer si la paciente presenta al menos 2 de 3 síntomas: hiperandrogenismo (clínico o bioquímico), disfunción ovulatoria y morfología ovárica poliquística (MOP, Tabla 1), siendo el Criterio de Rotterdam el más ampliamente utilizado en la clasificación y diagnóstico del SOP y respaldado por la mayoría de las autoridades de salud y organizaciones científicas a pesar de las controversias con respecto a su relevancia y aplicación (11,12).

Los diferentes fenotipos de SOP están asociados a diferentes cascadas bioquímicas y rutas esteroidogénicas (Figura 2) que han sido estudiadas intensivamente en los últimos años con

el propósito de entender mejor la relación entre las manifestaciones clínicas, los diferentes niveles de expresión, funciones aberrantes o desregulaciones de estas proteínas (13).

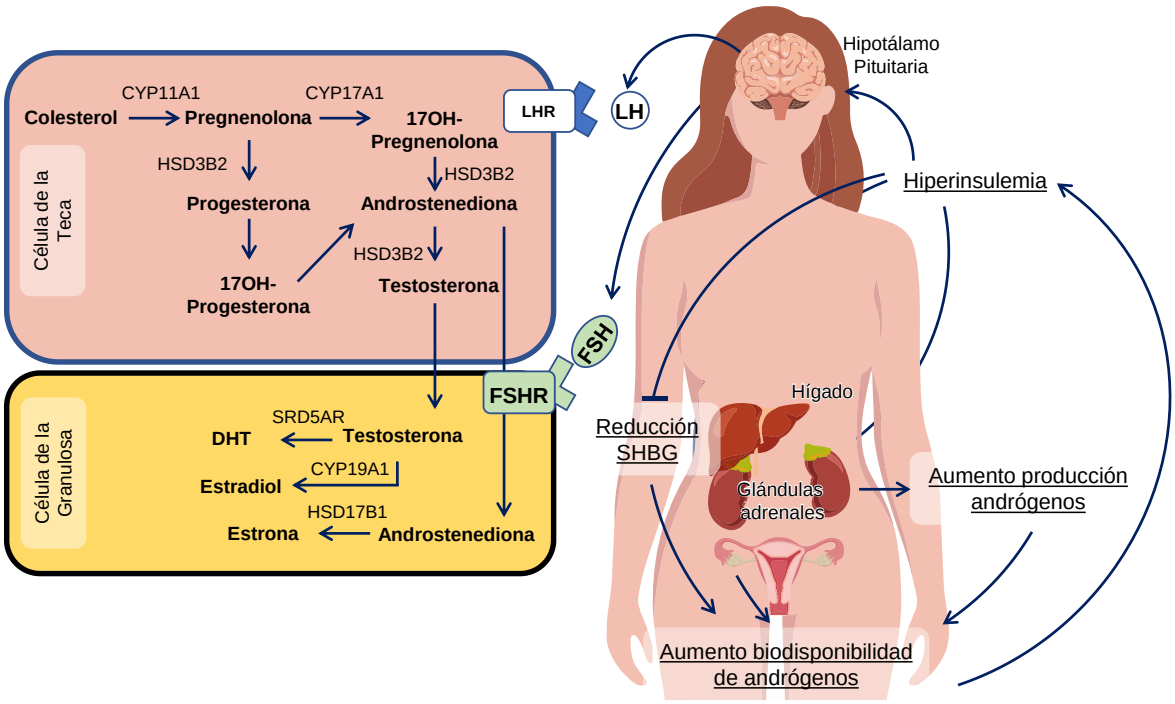


Figura 2. Vías endócrinas y metabólicas en el SOP.

1.1 Biología molecular del SOP

Para los investigadores, el estudio del SOP ha representado un reto por años ya el desarrollo de esta enfermedad depende de proteínas, cascadas de activación, manifestaciones clínicas o el papel de agentes ambientales que se presentan en un grupo de pacientes y que en en otras pueden no presentarse de la misma forma, lo que ha llevado a que muchos estudios resulten aparentemente contradictorios (14–17). Por esta razón, la revisión exhaustiva del papel que tienen las proteínas asociadas a las rutas metabólicas y endócrinas con mayor robustez en el SOP es indispensable para considerar si las proteínas asociadas son candidatas a dianas biológicas o, por el contrario, proteínas cuya interacción con resulte en efectos adversos indeseables en el sujeto de estudio, para lo cual se han seleccionado aquellas cuya regulación farmacológica sea mediada principalmente por moléculas pequeñas.

1.1.1 Receptor de andrógenos

El receptor de andrógenos (AR, del inglés androgen receptor) es una proteína de 919 aa codificada por el gen *AR* en el cromosoma Xq11-12. Pertenece a la superfamilia de receptores nucleares esteroidales (RNEs) y está compuesto por 3 dominios funcionales, el N-terminal correspondiente a la región regulatoria transcripcional, el dominio de unión a ADN y el dominio C-terminal donde ocurre la unión al ligando (Figura 3), principalmente testosterona y DHT (18).

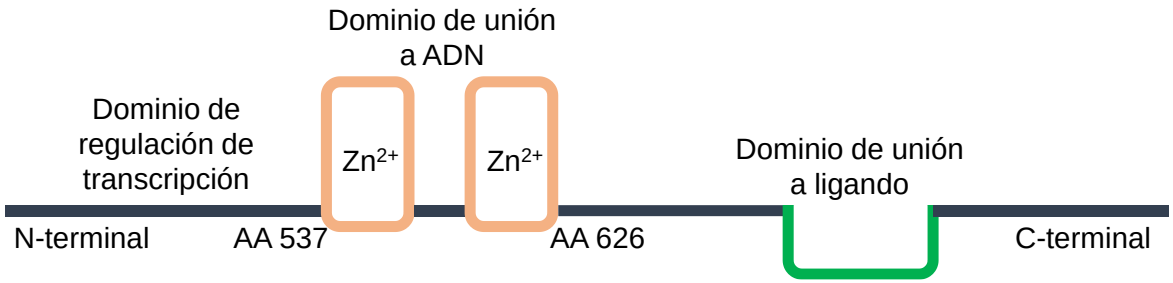


Figura 3. Organización estructural de AR.

El dominio de unión a ligando (DUL) se encuentra altamente conservado en 12 hélices α que forman un "pocket" de unión para encerrar al ligando (Figura 4)., interaccionando con los residuos Gln711, Met745 y Arg752 del anillo A esteroidal y Leu704 y Asn705 del anillo C en las hélices 4, 5 y 10 (18).

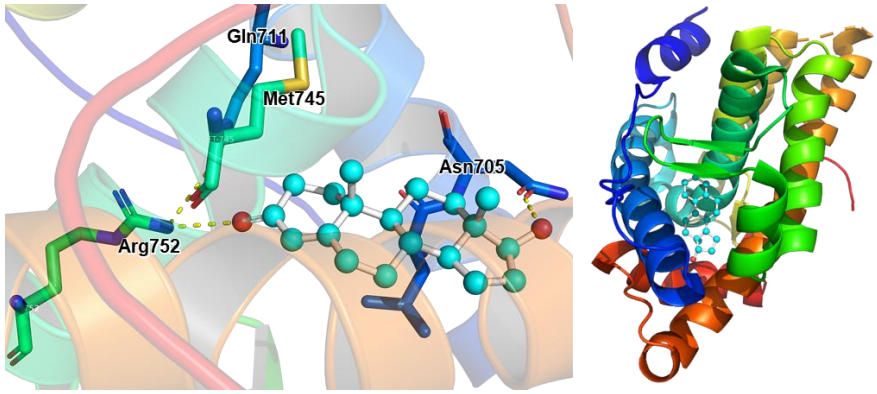


Figura 4. Interacciones proteína-ligando y estructura del DUL de AR (PDB: 2AMA).

El AR ejerce un papel importante en el desarrollo y gravedad del SOP ya que está involucrado en el desarrollo del fenotipo hiperandrogénico así como en la anovulación y en la foliculogénesis (19). Las pacientes con este fenotipo presentan niveles elevados de andrógenos como testosterona y pro-andrógenos como la androstenediona y la dehidroepiandrosterona que ejercen su efecto directamente por este receptor, el cual está correlacionado con el aumento de tejido adiposo abdominal, función aberrante de los adipocitos y resistencia a la insulina (20).

1.1.2 Receptores α y β de estrógenos

Los receptores α y β de estrógenos (ERα y ERβ) codificados por el gen *ESR1 y ESR2* respectivamente, pertenecen a la familia de receptores nucleares esteroidales (RNEs) y de manera similar a esta familia se encuentran altamente conservados en el sitio de unión a ADN y en el DUL; el dominio NH_2 terminal no está conservado presentando variabilidad en su secuencia y longitud. Es activado principalmente por estrógenos como el estradiol, estriol y estrona (21).

Además de estar crucialmente relacionados con procesos reproductivos, está involucrado en el sistema inmunológico, esquelético, cardiovascular, sistema nervioso central y morfogénesis del útero, ovario, glándulas mamarias, cerebro y pulmones (22). Dentro del SOP, los diferentes niveles de estrógenos y expresión de estos receptores están involucrados en anomalías de la función ovárica, proliferación endometrial derivando en hiperplasia y diferenciación celular aberrante con potencial cancerígeno dependiendo del sitio y nivel de expresión en los tejidos (23), como se expresa en la Figura 5.

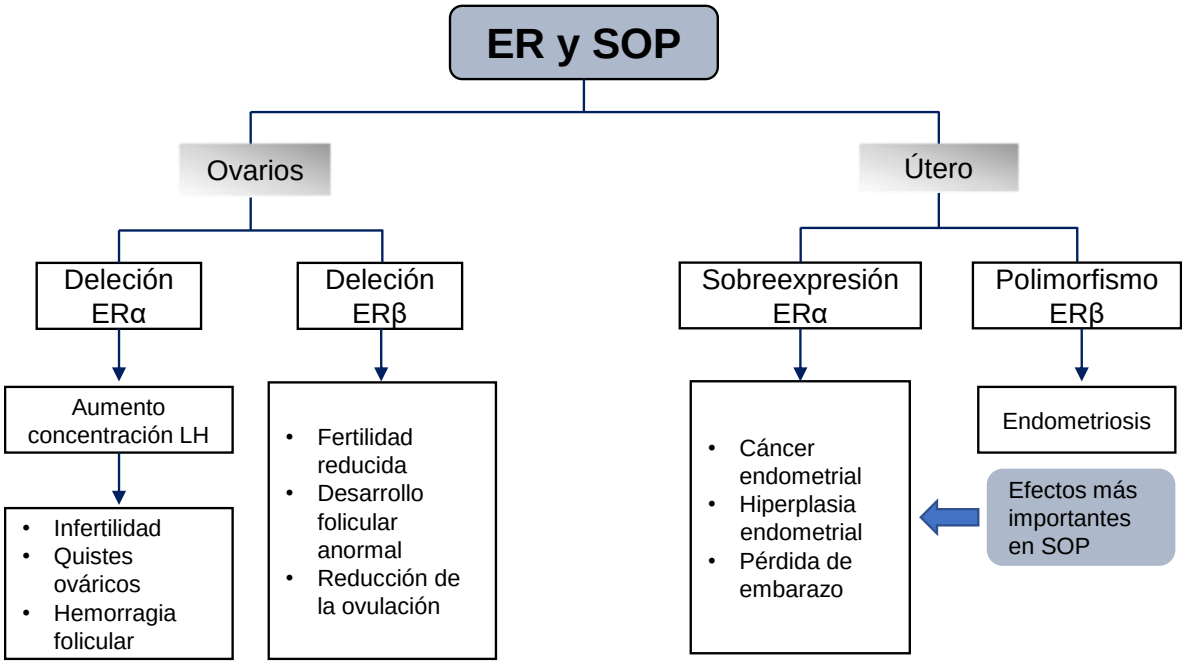


Figura 5. Efectos fisiológicos de diferentes niveles de expresión en SOP de ERα y ERβ.

1.1.3 Receptor de progestágenos

El receptor de progestágenos (PR, del inglés progesterone receptor) es miembro de la familia de RNEs y es codificado por el gen *PGR*, se encuentra expresado principalmente en tejidos reproductivos femeninos y en el sistema nervioso central el cual al unirse a su ligando endógeno progesterona lleva a cabo la regulación de una red génica involucrada en el desarrollo, diferenciación y proliferación de tejidos específicos así en procesos patológicos en algunos tipos de cáncer. La variabilidad de las acciones biológicas de la progesterona es altamente dependiente del entorno como el tipo de tejido o de células, así como de la disponibilidad de otras proteínas correguladoras y factores de transcripción cooperativos; de manera similar a los RNEs presenta 3 dominios definidos: El extremo NH_2 terminal intrínsecamente desestructurado, el dominio globular central de unión a ADN y el extremo C terminal (DUL), la unión de un ligando en el DUL induce un cambio conformacional en las hélices α del sitio, específicamente la 12 formando un "pocket" involucrado en la activación transcripcional (24). Los antagonistas conocidos de PR se

unen al sitio activo desplazando a la hélice 12 y modificando el sitio conocido como AF2, tal y como se muestra en la Figura 6 (25).

La progesterona es indispensable para la implantación uterina, decidualización y conservación del embarazo actuando directamente sobre el endometrio y, dependiendo del estado menstrual, actuando en conjunto o contrario a los estrógenos ya que se afecta a una gran cantidad de células como las epiteliales, inmunitarias, vasculares y estromales. En el SOP se reconoce un estado conocido como resistencia a la progesterona que involucra una respuesta decrecida del tejido objetivo a la progesterona biodisponible observándose sus efectos en el endometrio de las pacientes. La menstruación anormal y anovulación es resultado de la producción mínima o ausencia de progesterona como se evidencia en el esquema comparativo (Figura 6) de grosor del endometrio (hiperplasia) en mujeres enfermas vs sanas y que, sin tratamiento puede derivar en cáncer (26). Debido a que está relacionado con los receptores de estrógenos, se busca tratamientos en conjunto. La administración de progestágenos ha dado buenos resultados para revertir la hiperplasia endometrial aunque hasta el 30% de las pacientes no responden a estos tratamientos (27).

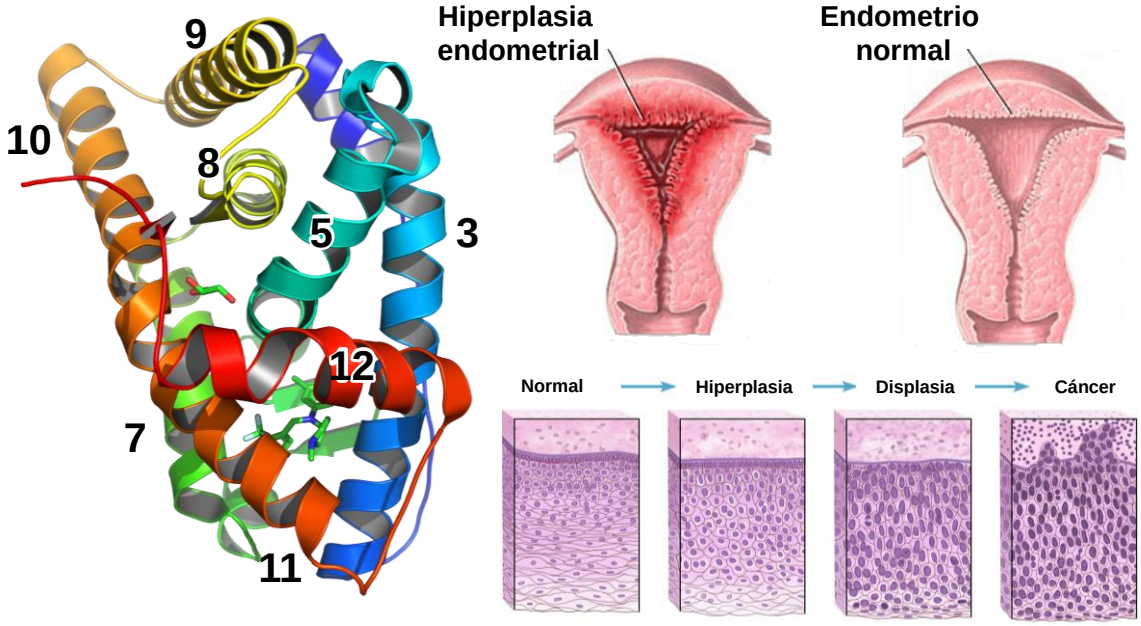


Figura 6. Estructura del DUL de PR (PDB: 3HQ5). Tejido endometrial normal e hiperplásico.

1.1.4 Receptor de vitamina D

El receptor de vitamina D (VDR, del inglés vitamin D receptor) pertenece a la familia de RNEs y es codificado por el gen *VDR*, está altamente conservado entre especies, a excepción del domino NH_2 terminal; el DUL está conformado por 250-300 aminoácidos en las hélices 11 a 13, y al momento de unirse a su ligando, la vitamina D_3 ($1\alpha, 25(OH)_2D_3$) ocurre un cambio conformacional para encerrar a la molécula. El VDR es encargado de la homeostasis e integridad esquelética por la regulación de enzimas y proteínas de transporte asociadas a Ca^{2+}, además de estar relacionado con efectos anti proliferativos contra cáncer de mama (28). La alteración de rutas metabólicas en el SOP se encuentra afectada por la vitamina D como en la señalización de insulina y la producción de hormonas sexuales mediante la regulación de la expresión de CYP19A1. La presencia de polimorfismos en el gen puede afectar su expresión y afectar a la capacidad de secreción de insulina así como una mayor probabilidad de presentar hiperandrogenismo (29,30).

1.1.5 Globulina de unión a vitamina D

El componente específico del grupo del suero, conocida como proteína o globulina de unión a vitamina D (VDB, del inglés vitamin D binding globulin) es el principal acarreador de la vitamina D y de sus metabolitos. Es codificada por el gen *GC* y es miembro de la familia de las albúminas y α-fetoproteínas séricas, altamente polimórfica, con un peso molecular de 52 a 59 kDa formado por una cadena única de 458 aminoácidos organizados en 3 dominios, uno de unión a vitamina D entre los residuos 35 a 49 y otro de unión a actina entre los residuos 373 a 403 (Figura 7); es sintetizada por el hígado y la expresión es dependiente de estrógenos. A diferencia de otras proteínas de su clase, se encuentra en concentraciones relativamente altas, posiblemente como mecanismo de protección contra la intoxicación de vitamina D (31). Se ha encontrado que la reducción de la concentración de la globulina puede afectar a la gravedad del SOP debido a los efectos sobre la señalización de insulina y de desarrollo de síndrome metabólico (32,33).

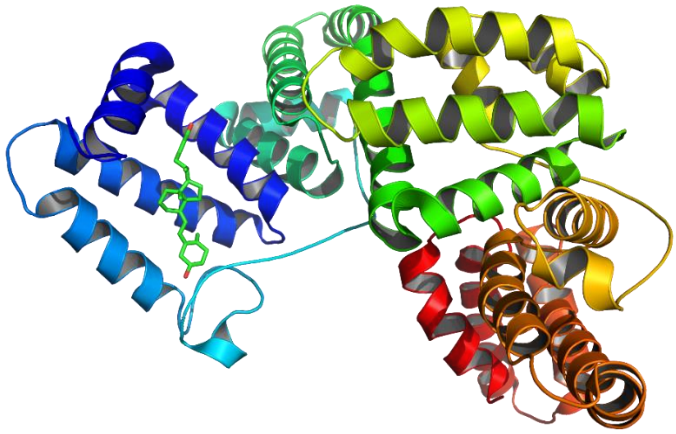


Figura 7. Estructura de la VDB (PDB: 1J7E). En azul el DUL con su ligando endógeno y en rojo el dominio de unión a actina

1.1.6 Receptores de mineralocorticoides y glucocorticoides

Los receptores de mineralocorticoides (MR, del inglés mineralocorticoid receptor) y de glucocorticoides (GR, del inglés glucocorticoid receptor) pertenecen a la familia de RNEs y son codificados por los genes *NR3C2* y *NR3C1* respectivamente que inician o suprimen la transcripción de gran diversidad de proteínas y de regulación de eventos fuera del núcleo. Ambos receptores pueden competir por los mismos ligandos, siendo expresados ubicuamente y en la misma célula para la modulación del transporte de fluidos, concentración de iones y homeostasis hemodinámica en el SNC y sistema inmunológico. La aldosterona, el cortisol y la corticosterona ejercen efectos rápidos mediados tanto por MR como por GR, aunque la activación inapropiada de MR en los centros de control hemodinámicos pueden generar especies reactivas de oxígeno derivando en inflamación, enfermedades neurodegenerativas crónicas y enfermedades cardiovasculares (34).

Diferentes variaciones de GR se han relacionado con la resistencia a la insulina y cambios en los niveles de colesterol debido a su efecto sobre el metabolismo de lípidos en tejido adiposo visceral contribuyendo a la patogénesis de los síntomas metabólicos presentes en SOP. Algunos tratamientos contra el SOP como la espironolactona pueden afectar a MR, además, los progestágenos son agonistas débiles de este receptor, por lo que el aumento de

estas hormonas puede activar a estos receptores siendo esencial en los potenciales tratamientos de SOP el no modificar la actividad de estos receptores (35–37).

1.1.7 Enzima de escisión de la cadena lateral del colesterol (CYP11A1)

La enzima de escisión de la cadena lateral del colesterol (CYP11A1), también conocida como citocromo P450 de ruptura de la cadena lateral, es una enzima mitocondrial codificada por el gen *CYP11A1* que cataliza la ruptura de la cadena lateral del colesterol para producir pregnenolona, el precursor básico de las hormonas esteroideas, en donde lleva a cabo diversas hidroxilaciones y ruptura entre C_{20} y C_{22} mediante la coordinación directa de un átomo de oxígeno con el átomo de hierro del grupo hemo. A pesar de que tiene una alta afinidad por el colesterol, se ha determinado que también puede actuar sobre otros esteroides, sobre todo con cadenas laterales con grupos funcionales polares mientras mantengan una estructura planar en la fusión de los anillos A y B como dobles enlaces entre C_5-C_6 o C_4-C_5 (38). El sitio activo está conformado por 12 residuos formando un túnel largo con diferencias en su potencial electrostático cerca del anillo A, reduciendo su polaridad cuando se acerca los anillos C y D. La cadena lateral se encuentra centrada sobre el grupo hemo y con Ile351, Thr291, Phe203 Y Met202 de las hélices I y F; el hidroxilo de C-3 del colesterol se orienta hacia una cavidad polar, tal y como se muestra en la figura 8 (39).

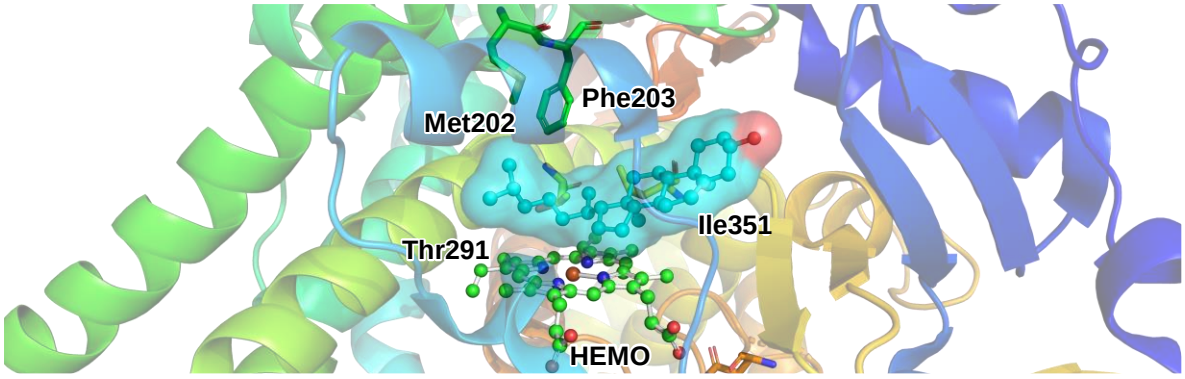
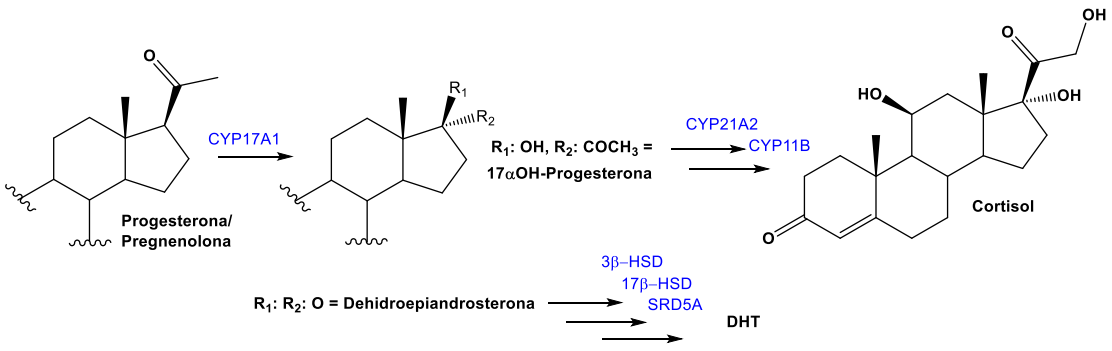


Figura 8. Interacción ligando-proteína del colesterol en CYP11A1.

Se han encontrado que las células de la teca en los ovarios de pacientes con SOP presentan sobreexpresión o polimorfismos de la CYP11A1. A pesar de ser clave en la esteroidogénesis ovárica, directamente se relaciona con hiperandrogenemia por acción de la hormona luteinizante (40,41).

1.1.8 17α-hidroxilasa/17, 20 liasa

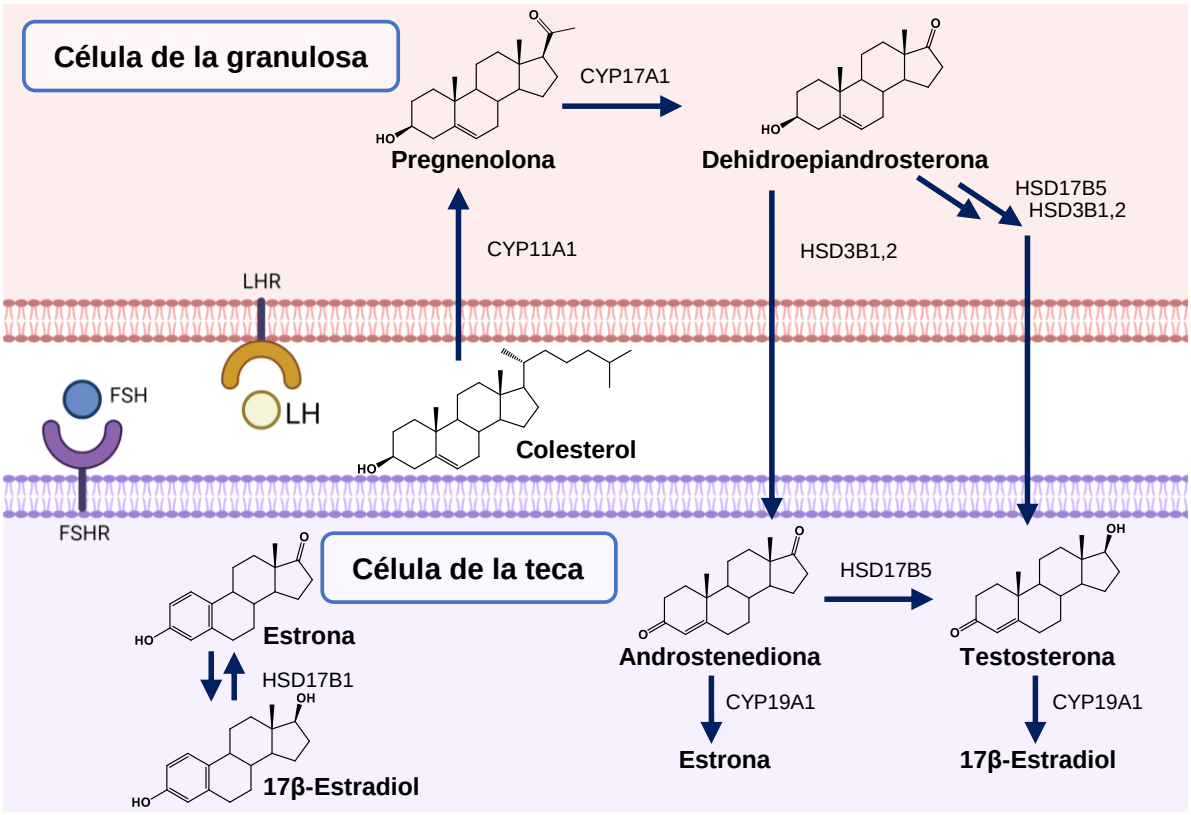
La 17α-hidroxilasa/17, 20 liasa (CYP17A1) es una enzima perteneciente a la superfamilia de citocromo P450 encargada de la producción de glucocorticoides y andrógenos por hidroxilación y ruptura de enlaces C-C, respectivamente. Codificada por el gen *CYP17A1* se expresa principalmente en las glándulas adrenales y en las gónadas, con expresión menor en cerebro, placenta y corazón. En las células de estos órganos cataliza diferentes reacciones para la formación de la androsterona la cual posteriormente puede transformarse en DHT (Esquema 1), el andrógeno endógeno más potente (42). Es por ello, que la CYP17A1 es una de las dianas terapéuticas más promisorias para el tratamiento de fenotipos androgénicos ya que es la enzima que regula la velocidad de la biosíntesis de andrógenos. Se han asociado diferentes polimorfismos de un sólo nucleótido que puede llevar al desarrollo de hiperandrogenismo adrenal en pacientes con SOP, además de que el aumento de andrógenos y la regulación incorrecta de estrógenos está asociado con un aumento en la resistencia a la insulina (41,43).



Esquema 1. Reacciones de biotransformación de esteroides mediados por CYP17A1.

1.1.9 Aromatasa (CYP19A1)

La biosíntesis de estrógenos es regulada principalmente por la aromatasa (CYP19A1), enzima perteneciente a la familia del citocromo P450 codificada por el gen *CYP19A1*, la cual utiliza para catalizar las diferentes reacciones de óxido-reducción un grupo hemo. En la aromatasa, se lleva a cabo la coordinación del C_{19} del sustrato esteroidal hacia el centro del grupo hemo para catalizar las diferentes reacciones que llevan a la aromatización del anillo A utilizando 3 moles de oxígeno y del agente reductor NADPH por cada mol de sustrato transformado (Esquema 2). Se encuentra expresado en los folículos preovulatorios y en el cuerpo lúteo en los ovarios de las mujeres en la ovulación. La expresión de CYP19A1 en las células de la granulosa del ovario está bajo el control de la hormona estimulante de los folículos (FSH) y también es expresada en tejido adiposo controlado principalmente por glucocorticoides, por lo que un aumento en el tejido y la producción de citoquinas proinflamatorias puede inhibir la expresión de la aromatasa (44).

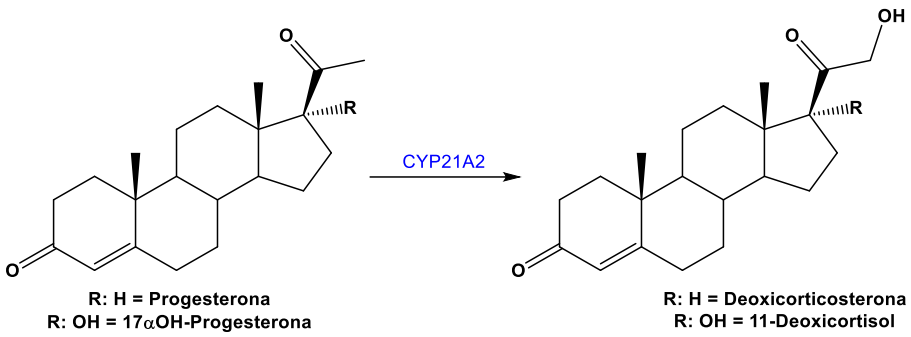


Esquema 2. Biosíntesis de esteroides en las células del ovario.

El efecto de esta enzima en personas con SOP es variable con respecto al fenotipo. Diferentes estudios han reportado actividad disfuncional de la aromatasa en pacientes con SOP, en donde se ha correlacionado que conforme aumenta el índice de masa corporal (IMC), la actividad de la aromatasa disminuye, así como en pacientes con hiperandrogenismo. En los ovarios poliquísticos, las células de la teca sintetizan más andrógenos de los niveles basales y contrariamente, las células de la granulosa, tienen menor actividad de aromatasa, lo que genera desbalance en la producción de estrógenos y andrógenos (45). Por otro lado, se ha propuesto el uso de inhibidores de la aromatasa como fármacos inductores de la ovulación en mujeres anovulatorias que no han respondido al tratamiento con citrato de ciclofeno, el fármaco de primera elección para mejorar la fertilidad inhibiendo la biosíntesis de estrógenos y favoreciendo la secreción de FSH permitiendo el crecimiento y desarrollo folicular. Este resultado es útil en fenotipos en donde no exista ninguna alteración de los niveles de andrógenos, eventualmente se generará acumulación de estrógenos en los ovarios (46).

1.1.10 21-Hidroxilasa

La enzima 21-Hidroxilasa (CYP21A2) pertenece a la familia de enzimas del citocromo P450 codificado en el gen *CYP21A2* del cromosoma 5 en el locus 6p21.3 junto a otro gen, el *CYP21A1P*. Ambos genes comparten un 98% de homología en los exones pero este último es inactivo debido a diferentes mutaciones deletéreas (47). Está expresada exclusivamente en la corteza adrenal y es esencial en la biosíntesis de aldosterona y cortisol al convertir la progesterona y 17α-OH progesterona a deoxicorticosterona y 11-deoxicortisol (48). Estructuralmente, el sitio activo de esta enzima orienta a C_{21} del sustrato en el grupo hemo coordinándose con el átomo de Fe^{2+}. El carbonilo de C_3 interactúa mediante un puente de hidrógeno con Arg234; el resto de la cara β esteroidal interactúa con una hélice hidrofóbica, específicamente con los residuos Val287, Ile291 y Gly292. Se han reportado que existen mutaciones heterocigotas en el gen que codifica para CYP21A2 y aunque los datos no son concluyentes se considera que podría haber una correlación con el desarrollo de las manifestaciones clínicas de SOP (49,50).



Esquema 3. Biosíntesis de precursores de mineralcorticoides y glucocorticoides por CYP21A2.

1.1.11 Globulina de unión a hormonas sexuales

La globulina plasmática de unión a hormonas sexuales (SHBG, del inglés sexual hormone binding globulin) es una glicoproteína homodimérica de 373 residuos, producto del gen *SHGB* localizado en el cromosoma 17 p12-13 que también codifica para la proteína de unión de andrógenos testicular (difiriendo únicamente en el patrón y tipo de oligosacáridos) la cual se une a andrógenos y estrógenos con alta afinidad y regulando su biodisponibilidad. Esta región cromosómica se considera como un "hotspot" para la recombinación e integración de genomas exógenos por lo que es susceptible de mutaciones. El sitio de unión está formado por diferentes residuos, en donde Met139 interactúa con el anillo B esteroidal; los residuos anteriores a este se encuentran muy poco conservados y son de naturaleza principalmente hidrofílica. Por otro lado, hacia el extremo carboxilo terminal, los residuos hidrofóbicos están altamente conservados. La enzima SHBG está expresada de manera ubicua en varios órganos del cuerpo, incluyendo el hígado, placenta, cerebro y endometrio (51).

Varios estudios han indicado que el IMC y la hiperinsulinemia afectan directamente la concentración de SHBG reduciendo sus niveles, y es un biomarcador para la detección del síndrome metabólico y predictor de enfermedades cardiovasculares y de diabetes tipo 2, por lo cual, su papel en SOP es crucial tanto por su asociación con el desarrollo de estas enfermedades ya que la hiperinsulinemia aumenta la producción de andrógenos, la expresión de SHBG se reduce y la biodisponibilidad de andrógenos aumenta en un ciclo repetitivo que aumenta la gravedad sobre todo de fenotipos hiperandrogénicos (52–54).

1.1.12 Receptor de esteroides asociado a membrana de respuesta rápida

El receptor ERp57/GRp58/1,25D3-MARRS o simplemente MARRS (del inglés, membrane associated, rapid response steroid-binding) es una tiol-disulfuro oxidorreductasa que ha sido últimamente estudiada como una proteína chaperona y como receptor de membrana de la vitamina D $1,25(OH)_2D_3$. El receptor MARRS pertenece a la familia de las disulfuro-isomerasas y está altamente relacionada con el receptor clásico de vitamina D (Figura 9). Está expresado en el epitelio intestinal en donde media la absorción rápida de fosfatos y calcio, siendo esencial para el transporte de estos minerales; además, modula la actividad de canales iónicos tanto en el sistema nervioso como en el sistema cardiovascular (55).

En diversos estudios se ha mostrado que la diosgenina, una sapogenina espirostánica puede activar al receptor MARRS con respuesta antitumoral y antiinflamatoria, una reacción mediada por la citoquina proinflamatoria TNF-α, en donde se ha mostrado que SOP es una enfermedad donde también ocurre inflamación. La activación de MARRS por $1,25(OH)_2D_3$, media a los segundos mensajeros RAF y MAPK que incrementan la liberación de insulina de las células β del páncreas (Figura 12) (56,57).

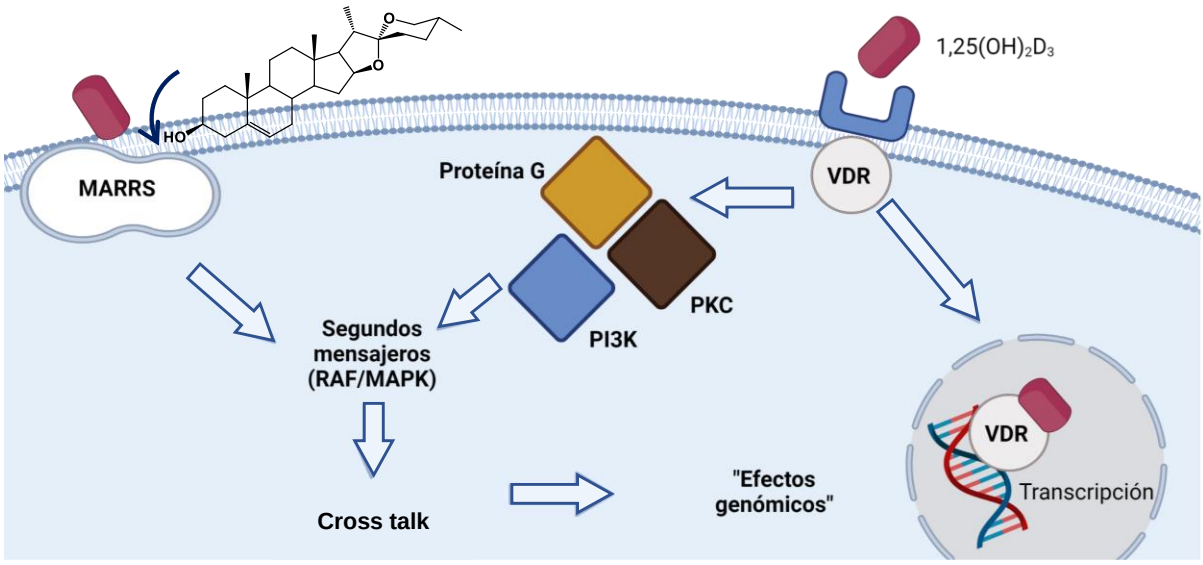


Figura 9. Efectos de la vitamina D mediado por VDR y MARRS con efectos genómicos directos e indirectos (57).

1.1.13 Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular

Los receptores del factor de crecimiento vascular (VEGFR, del inglés vascular endotelial growth factor receptor) pertenecen a una familia de proteínas que median diferentes respuestas biológicas en el organismo. Dependiendo de la isoforma de VEGF y del tipo de receptor, promueven la vasculogénesis y angiogénesis, procesos esenciales en la embriogénesis, desarrollo de órganos, regeneración de tejidos y procesos de cicatrización. No obstante, la angiogénesis anormal está asociada al desarrollo de una gran diversidad de enfermedades como en la retinopatía diabética, artritis reumatoide y neovascularización tumoral (58,59).

Estructuralmente, el VGEFR tiene 3 dominios. El primero de ellos es extracelular y está conformado por 7 dominios similares a inmunoglobulinas, el cual directamente interactúa con las diferentes isoformas de VGEF y favorece la dimerización del receptor. El segundo dominio α-helicoidal se encuentra en la región transmembranal oligomerizado dentro de la capa lipídica y cuya orientación de las hélices es esencial para la activación del receptor. Finalmente, el tercer dominio corresponde a una tirosina quinasa de tipo citoplasmática que regula directamente las rutas de transducción de señales asociadas a proliferación celular, migración, metabolismo, vasodilatación y formación y remodelado de vasos sanguíneos mediando la fosforilación de Tyr utilizando ATP. Este sitio activo se encuentra entre la unión de dos lóbulos del amino y carboxilo terminal de la proteína; el primer lóbulo está formado principalmente por una hélice α y 5 láminas β antiparalelas en donde se encuentra una región rica en Gly (841 a 846) y Phe845 que interactúan directamente con el ATP. El otro lóbulo es mucho más grande en donde la asa catalítica está formada (Figura 13) por una serie de residuos altamente conservados: His1046, Phe1047, Gly1048, Ala1073, Pro1074 y Asp1075 (58).

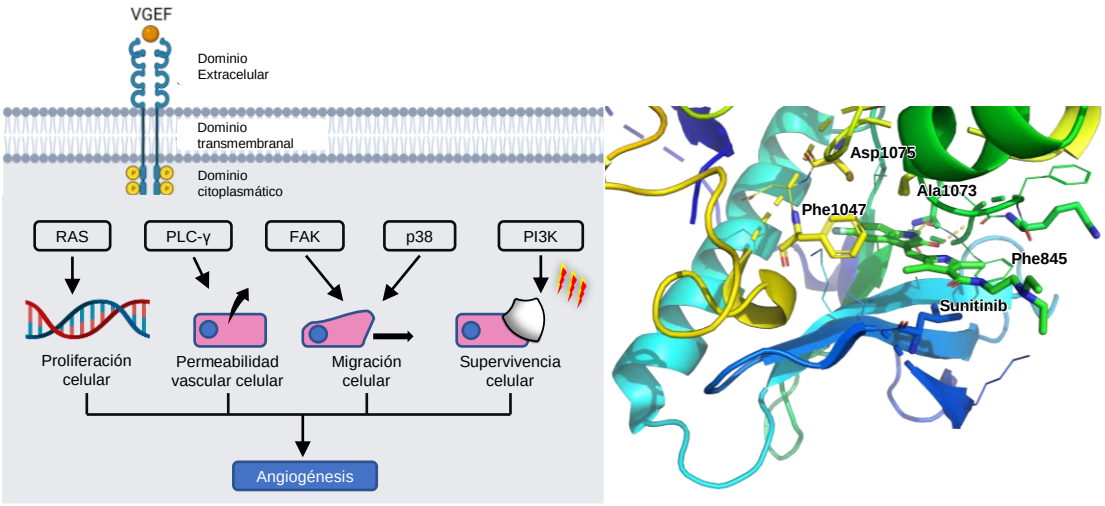


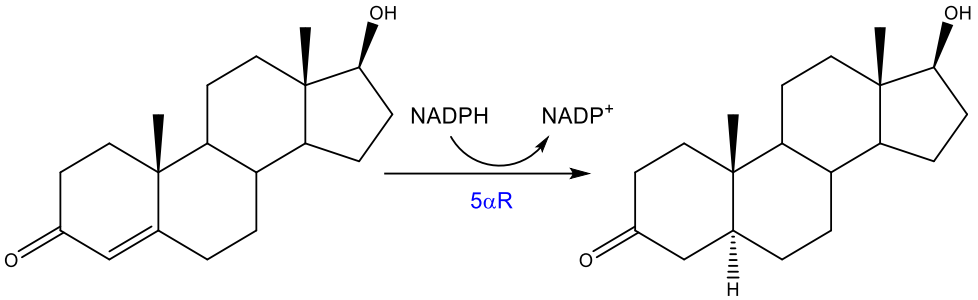
Figura 10. Vías de señalización e interacciones ligando-proteína de inhibidor comercial sunitinib con el receptor VGEF.

El papel del receptor VGEF en el SOP se ha estudiado extensivamente, su principal papel está en el desarrollo del síndrome de hiperestimulación severo (SHS), una respuesta excesiva hormonal de gravedad, ya que el receptor VGEF se encuentra expresado en las células de la granulosa y de la teca por igual. Además, en el SHS, la regulación vascular y angiogénesis son críticos en la foliculogénesis ovárica, por lo que las anormalidades también desembocan en desórdenes de la ovulación, fertilidad reducida y endometriosis (60).

1.1.14 3-Oxo-5α-esteroide-4-deshidrogenasa tipo 2

La 3-Oxo-5α-reductasa (5αR) codificada por el gen *SRD5A2* es una proteína de membrana con 259 aminoácidos y 29.5 kDa, existen dos isoformas, 5α-reductasa tipo 1 y 2 que, a pesar de catalizar la misma reacción, tienen un bajo grado de homología y se encuentran localizados en diferentes cromosomas, compartiendo una identidad en la secuencia de tan solo el 47%. Pertenece a la familia de las 5α-reductasas cuyo sustrato son esteroides con cetonas en C_3 y Δ^4 para llevar a cabo la ruptura del doble enlace y la inserción de un anión hidruro en la cara α en C_5 y un protón β en C_5 (Esquema 4). Ejemplo de ello son la progesterona, androstenediona, cortisol, aldosterona, deoxicorticosterona, epitestosterona y finalmente testosterona, la cual genera al potente andrógeno endógeno DHT. Está enzima está involucrada en la *N*-glicosilación de algunas proteínas relacionadas a defectos

neurológicos y oftalmológicos. También este tipo de esteroides 5α-H se relaciona al proceso de eritropoyesis (61).



Esquema 4. Conversión de testosterona a 5-dehidrotestosterona por la 5α-reductasa

En el SOP, la enzima 5αR está muy relacionada con el desarrollo de hiperandrogenismo e hirsutismo, se ha encontrado sobreexpresión de 5α-reductasa en células de la granulosa y fibroblastos de pacientes con SOP, además de modificación en el metabolismo del cortisol, lo que puede derivar en el desarrollo de resistencia a la insulina (62).

Todas estas dianas presentan dos particularidades esenciales para este trabajo: su relación con uno o más fenotipos de SOP y su capacidad para ser reguladas por moléculas pequeñas, esto es importante ya que prácticamente para todas las proteínas antes expuestas ya existen fármacos, pero enfocados al tratamiento de otras enfermedades, no de un tratamiento integral ni específico para el SOP (63) y algunos de ellos aún no reciben autorización para el tratamiento de SOP (64)..

1.2 Tratamientos contra SOP

Además de los efectos endócrinos, las pacientes con SOP presentan riesgo aumentado de enfermedades cardio-metabólicas y diabetes siendo el tratamiento principal un cambio en el estilo de vida del paciente incluyendo dieta y ejercicio (65–68). No obstante, dependiendo de la severidad de las manifestaciones clínicas se puede complementar el tratamiento con agentes sensibilizadores de insulina y estatinas, así como antiandrógenos y anticonceptivos.

1.2.1 Sensibilizadores de insulina

La resistencia a la insulina es una de las principales causas de los síntomas clínicos y metabólicos del SOP, se presenta en la mayoría de las pacientes con la enfermedad ya sea por predisposición genética y/o por obesidad. Las pacientes tienen producción elevada de insulina, la cual a su vez estimula la producción de andrógenos en los ovarios (hiperandrogenemia) por lo que el control de la hiperandrogenemia con fármacos ha sido una opción para el tratamiento del SOP (69). Entre los agentes más usados está la metformina, la cual reduce la secreción de glucosa y pueden mejorar la frecuencia menstrual, aunque también se ha demostrado que tiene efectos sobre el ovario por inhibición indirecta de la aromatasa (70). El inositol, un polihidroxialcano ha mostrado tener actividad como segundo mensajero de la insulina y sugerido en el tratamiento de SOP para la regulación de la tirotropina y de la FSH (71). Otros sensibilizadores utilizados como la exenatida que pertenecen a la familia de agonistas del GLP-1R usados sobre todo con pacientes intolerantes a la metformina (Figura 15) (72). Estos fármacos podrían ser útiles ya que al aumentar la sensibilidad, se reduce la producción de insulina aumentando la producción de SHBG y reduciendo los niveles de testosterona libre aunque su uso principal solamente se ha limitado a reducir los efectos metabólicos en las pacientes con SOP (73).

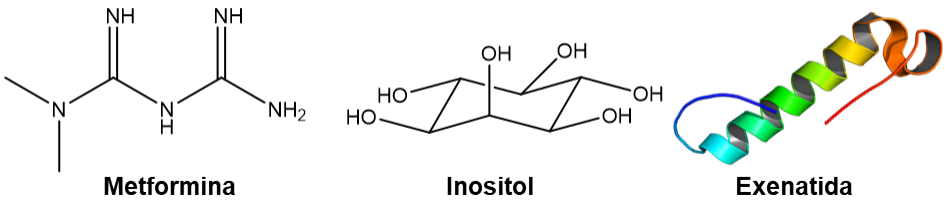


Figura 11. Estructuras de sensibilizadores de la insulina usados en SOP

1.2.2 Fármacos antidislipidémicos

Las afecciones cardiovasculares son los principales riesgos más prevalentes en las pacientes con SOP comparadas con pacientes sanas. Los principales síntomas son la calcificación de arterias coronarias, aumento en el tamaño y rigidez del ventrículo izquierdo, aumento en

la homocisteína (marcador de inflamación y daño endotelial asociado a aterogénesis), así como niveles altos de colesteroles totales y triglicéridos. Otro enfoque para tratar SOP se enfoca en este aspecto metabólico (74). Los principales fármacos utilizados para el tratamiento son las estatinas, inhibidoras selectivas de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa involucrada en los primeros pasos de la biosíntesis del colesterol, permitiendo reducir colesteroles totales y lipoproteínas de baja densidad aumentando la sensibilidad de los receptores que conlleva a la reducción en la producción, además de posibles efectos antiinflamatorios siendo la simvastatina, atorvastatina y rosuvastatina, las moléculas más utilizadas para estos fines (Figura 16) (74,75).

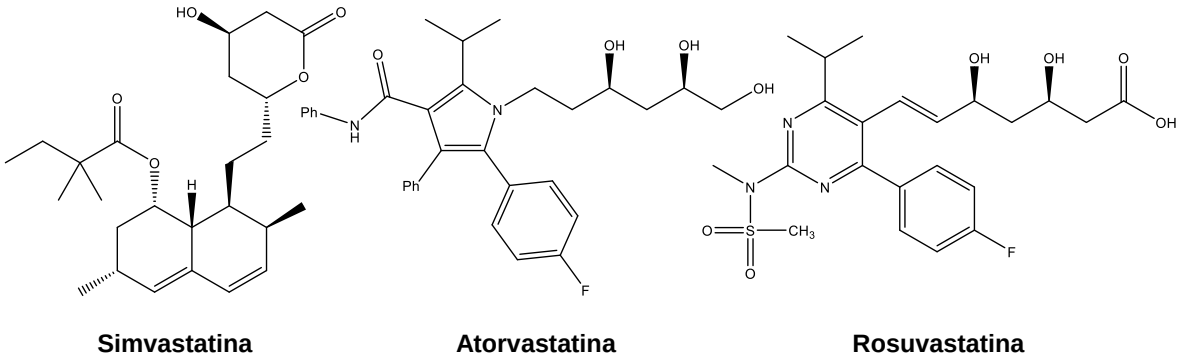


Figura 12. Estructuras de estatinas usadas en SOP

1.2.3 Fármacos anti androgénicos

La hiperandrogenemia es probablemente la manifestación clínica más frecuente e importante en el SOP por lo que el tratamiento anti androgénico está enfocado en la reducción de 3 aspectos: la biosíntesis de andrógenos, el porcentaje de andrógenos libres circulantes y la actividad androgénica mediante el bloqueo de su receptor o su regulación mediante inhibidores de la 5αR siendo los principales tratamientos empleados la flutamida y el acetato de ciproterona los más utilizados (Figura 17). La abiraterona (Figura 14), un inhibidor de la CYP17A1 ha sido útil en la reducción de la actividad androgénica sin embargo su inclusión en el tratamiento del PCOS no es común (76).

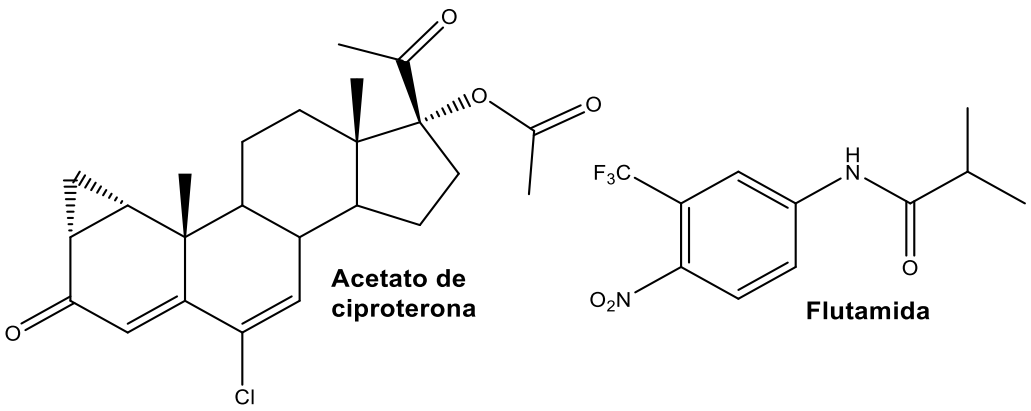


Figura 13. Estructura de fármacos antiandrogénicos contra SOP

La flutamida (Figura 14) es un antiandrógeno potente que actúa como bloqueador del receptor de andrógenos reduciendo la hiperandrogenemia y el hirsutismo. También se ha mostrado efectivo contra el acné, sin embargo, su uso es discrecional debido a su teratogenicidad; de manera similar, se utiliza el acetato de ciproterona en combinación con el etinilestradiol, un anticonceptivo de tipo progestágeno. La finasterida por su parte, es un inhibidor de la 5α-reductasa y que se ha utilizado para moderar el hirsutismo y la alopecia androgénica en combinación con anticonceptivos (77).

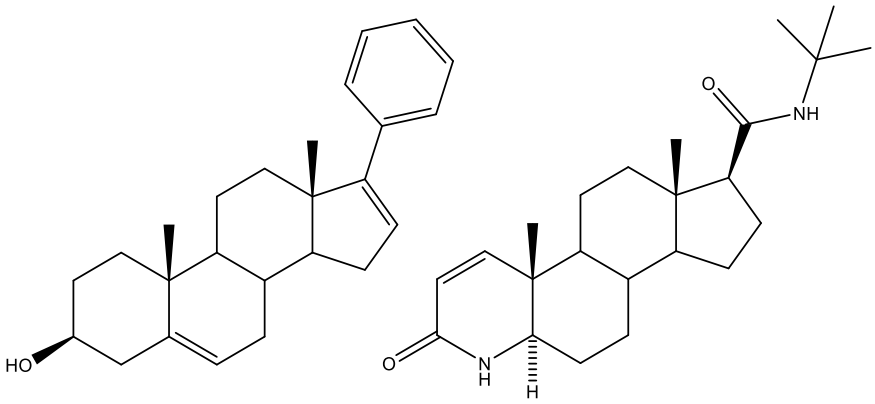


Figura 14. Estructura de la abiraterona y la finasterida

Uno de los problemas más importantes en el uso de antiandrógenos es la hepatotoxicidad lo cual supone más riesgo que los beneficios obtenidos en una enfermad considerada "no letal" además que el tratamiento no es restaurativo, únicamente paliativo además de las graves alteraciones en el metabolismo y perturbaciones en la regulación hormonal (20).

1.2.4 Anticonceptivos

El uso de anticonceptivos orales combinados (AOC) representa el principal tratamiento en pacientes que no buscan embarazarse para regular la menstruación y reducir el hiperandrogenismo (78). Los AOC son combinación de progestágenos y estrógenos en bajas dosis, su mecanismo de acción consiste en inhibir (por progestágenos) la secreción de la hormona liberadora de gonadotropina suprimiendo a la hormona luteinizante que lleva a la reducción de estradiol y en la producción ovárica de andrógenos. El componente estrogénico es sinérgico a los progestágenos, reduciendo los niveles de andrógenos libres mediante el aumento en la producción de SHBG (Tabla 2).

Tabla 2. Generaciones de AOC y sus efectos metabólicos y androgénicos

	Progestágenos	Estrógenos	Efectos Metabólicos	Efectos Androgénicos
1ra Generación	Noretindrona Diacetato de Etinodiol	Etinilestradiol	✓	✓
2da Generación	Norgestrel Levonorgestrel	Etinilestradiol	✓	✓
3ra Generación	Norgestimato Gestodeno Desogestrel	Etinilestradiol Valerato de Estradiol	−	−
4ta Generación	Drospirenona Acetato de Ciproterona Dienogest Trimegestona Nestorona	Etinilestradiol Valerato de Estradiol	−	Anti-androgénico

✓ Presente − Ausente

Las primeras generaciones de AOCs se caracterizaron por presentar altas tasas de tromboembolismo por lo que las consiguientes mejoras se enfocaron en la evolución de progestágenos, no obstante, al ser una enfermedad crónica el uso prolongado de estos fármacos siguen siendo de preocupación debido a que aumenta el riesgo de tromboembolismo venoso y arterial, derrame cerebral así como aumento en los niveles séricos de triglicéridos y colesterol LDL y HDL implicando no solo su inherente hepatotoxicidad sino su efecto integral en el metabolismo (79,80).

En resumen, hasta ahora no existe tratamientos específicos para el SOP; sólo se utilizan fármacos dirigidos a las manifestaciones clínicas, lo que ha dificultado el establecimiento de un tratamiento altamente exitoso, y debiéndose establecerse con base en las necesidades específicas de los grupos de pacientes y de los fenotipos de la enfermedad (81). Por lo anterior, la búsqueda de nuevas moléculas o modificación de otras ya existentes es esencial para la generación de nuevos tratamientos, en donde los esteroides juegan un papel esencial tanto por la similitud con los sustratos de las dianas biológicas del SOP como por su versatilidad y gran actividad biológica.

1.3 Esteroides: papel fisiológico y potencial farmacológico

Los esteroides son moléculas estructuralmente relacionadas que cumplen una amplia diversidad de funciones en el organismo, desde su participación como componentes de la membrana celular, hormonas endócrinas, hasta moduladores de una gran diversidad de eventos fisiológicos (Figura 19). Todos los esteroides endógenos humanos son derivados del colesterol y regulados por una ruta biosintética amplia ubicada específicamente en órganos endócrinos como las glándulas adrenales, ovarios y testículos. El plasma y una gran diversidad de tejidos pueden contener una gran cantidad de compuestos esteroidales, sin embargo, muchos de ellos son biológicamente inactivos, ya que las moléculas bioactivas se encuentran continuamente modificadas por diversas enzimas (principalmente hepáticas) para su inactivación y desecho, esto debido a que su interacción con sus receptores particulares es específica y ejercen su acción de manera rápida (82).

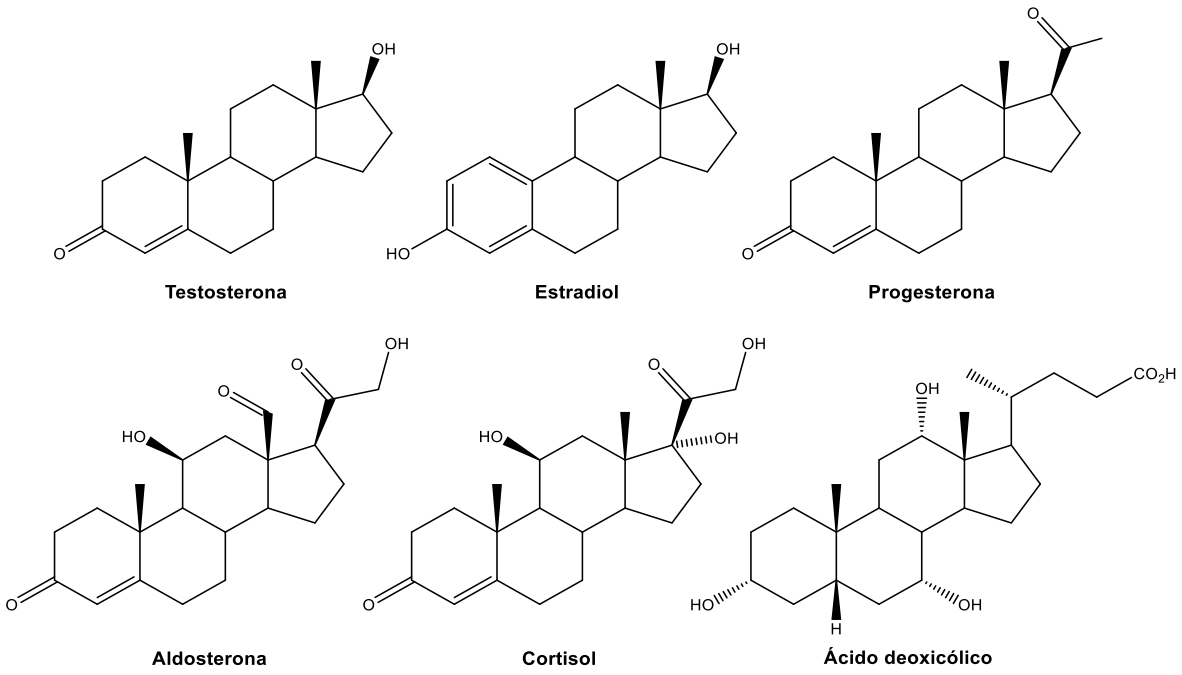


Figura 15. Estructuras de las principales familias hormonales esteroidales

Debido a su potente actividad biológica, muchos fármacos están basados en esteroides ya que los ligandos endógenos de receptores comparten el esqueleto esteroidal, por lo que el diseño de nuevos compuestos puede aprovechar esta base y hacer modificaciones puntuales para potenciar o cambiar su efecto biológico por completo. Es el caso de algunos inhibidores del receptor a estrógenos, los cuales mediante modificaciones e inserción de heteroátomos como modificación del ligando original puede pasar de activadores a inhibidores, e incluso generando especificidad entre isoformas como es el caso de 16 α-LE2, molécula con mayor afinidad por ERα y el inhibidor 8β-VE2 hacia ERβ (83) (Figura 21).

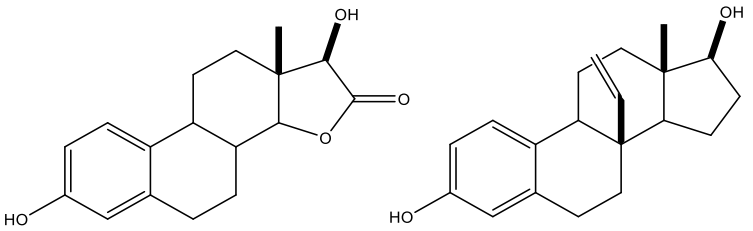


Figura 16. Estructuras de 16α-LE2 y 8β-VE2, inhibidores de ERα y ERβ.

La actividad anticancerígena ha sido una de las más promisorias en la investigación de estructuras esteroidales y con más de 50 años de investigación relacionada; el acetato de ciproterona () fue el primer fármaco de relevancia con efectos antitumorales en 1968 y desde ahí las publicaciones relacionadas han ido en aumento (84). Los inhibidores de la aromatasa (CYP19A1) son promisorios contra el cáncer de mama hormona-dependiente, en gran parte, por su capacidad de inhibir la síntesis de estrógenos (85). Actualmente se cuenta con 3 generaciones de inhibidores de naturaleza esteroidal para aumentar su afinidad o reducir sus efectos adversos (Figura 17)

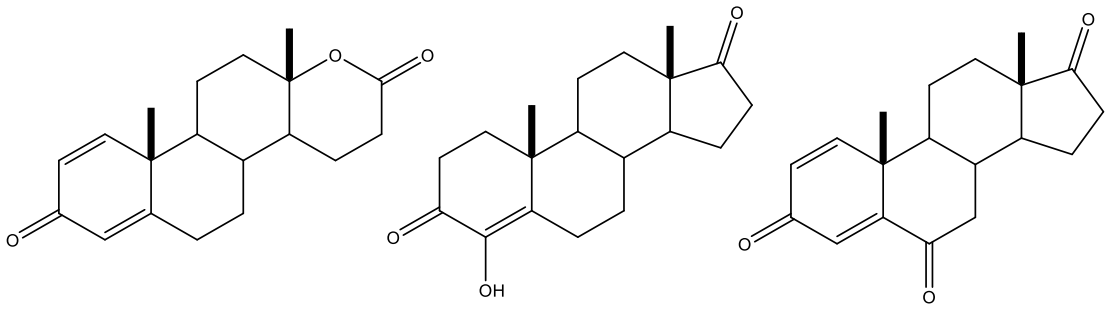


Figura 17. Estructura de la testonolactona, formestano y exemestano.

La inserción o funcionalización de heteroátoamos en el esqueleto esteroidal ha sido importante en la obtención de compuestos con propiedades citotóxicas significativas como en el caso de la obtención de azaesteroides, oximas, o más recientemente de bioconjugados esteroidales (Figura 18) en contra de cáncer de próstata y leucemia (86–88).

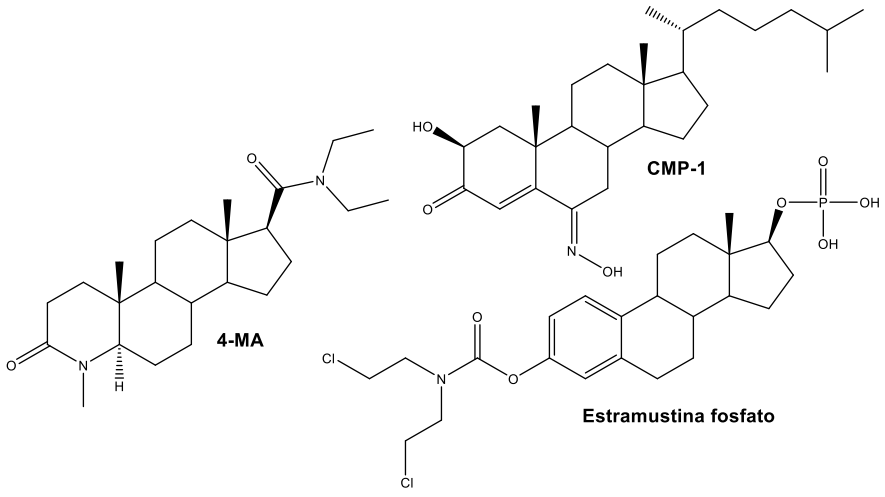


Figura 18. Ejemplos de un azaesteroide (4-MA), una oxima (CMP-1) y un bioconjugado (estramustina) como anticancerígenos

La conjugación de dos moléculas bioactivas para la formación de compuestos híbridos ha mostrado ser de gran utilidad en las ramas de la biología, medicina, microelectrónica, así como en la ciencia de los materiales, en donde las bases estructurales esteroidales presentan una gran diversidad de efectos fisiológicos debido a la habilidad del esteroide para penetrar membranas biológicas y de unirse de manera específica a receptores de hormonas endógenas. Dentro de los diferentes conjugados, los conjugados aminoacídicos esteroidales (CAE) han resultado muy atractivos por la posibilidad de modificar el coeficiente de partición de la molécula dependiendo de la posición, configuración y naturaleza de los aminoácidos (89). Con respecto a la actividad anticancerígena de CAEs; Kvasnica y cols. aprovecharon los heteroátomos de las cadenas laterales de ésteres de L-Met y L-His (Figura 19) para la coordinación de complejos de platino, utilizando una base esteroidal (colesterol, testosterona, diosgenina, entre otros) como un sistema de transporte para su translocación en células tumorales de mama (90).

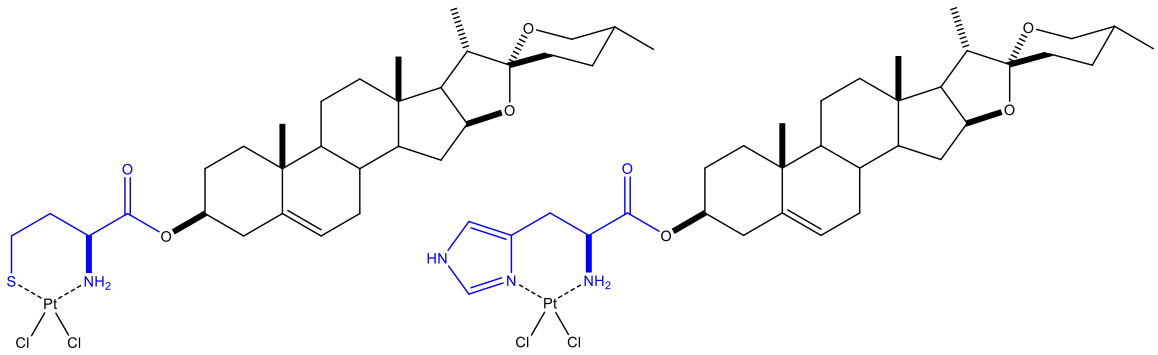


Figura 19. Complejos Pt-Conjugado aminoácido-esteroidal.

El conjugado de ácido cólico y del dipéptido Val-Gly (Figura 20) obtenido por Bajaj y colaboradores en 2019, funcionalizado en las 3 posiciones donde naturalmente se encuentran los hidroxilos de dicho esteroide mostraron excelente actividad antibacteriana para bacterias Gram negativas; *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia* y *Acitenobacter baumannii* con concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de 8, 16 y 16 µM, respectivamente. Se consideró el efecto bactericida mediado por degradación de

lipopolisacáridos, además de haber actividad degradadora de "biofilm" en *Staphylococcus aureus y Candida albicans* (91).

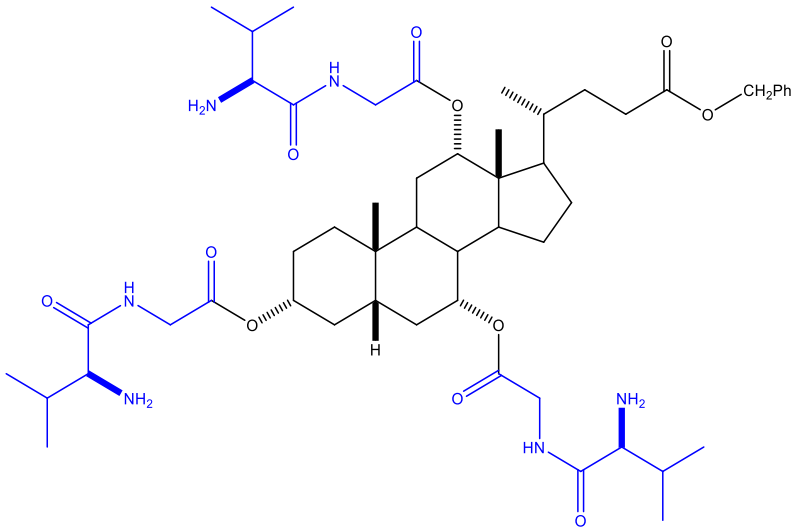


Figura 20. Estructura del ácido biliar funcionalizado con Val-Gly.

Ejemplo de otro CAE es el descubierto por Kong y cols. (Figura 21), en la esponja marina *Polymastia boletiformis* que inhibe a *S. aureus, C. albicans y Pythium ultimum* con CMI de 100, 75 y 25 µg, respectivamente (92).

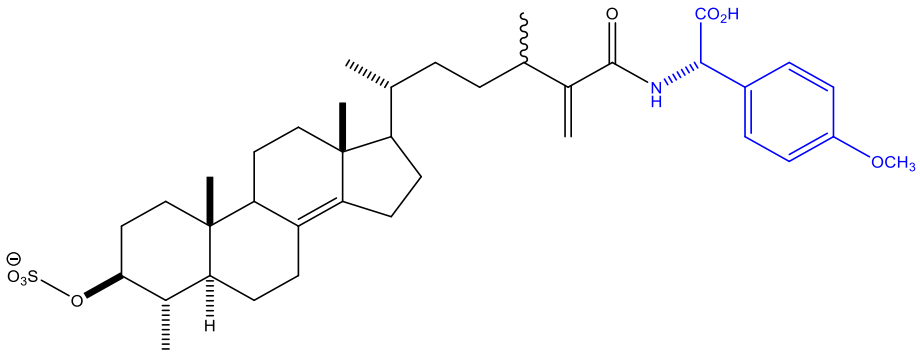


Figura 21. Conjugación de *O*-metil Tyr con un esteroide de *P. boletiformis.*

Otros ejemplos de la importancia de la inserción de heteroátomos en el esqueleto esteroidal es el de Fernández-Herrera y colaboradores que sintetizaron (Figura 26) y evaluaron la actividad de la (26*R*)-26-hidroxidiosgenina en ratas, la cual a dosis de 0.1 mg/kg estimuló el desarrollo folicular en los ovarios de ratas (93).

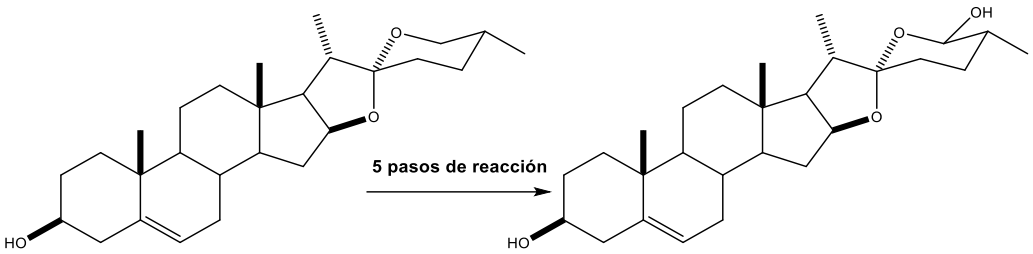


Figura 22. Obtención de la 26-OH diosgenina.

En contexto, los tratamientos actuales para el SOP se enfocan en aminorar o reducir la sintomatología, utilizando tratamientos combinados que se deben ajustar a cada paciente, por lo que surge el interés de la evaluación *in silico* de conjugados aminoacídicos esteroidales contra dianas biológicas asociadas al SOP, y determinar el fenotipo para el cual podrían ser útiles. Posteriormente se llevará a cabo su análisis retrosintético y evaluar su potencial terapéutico como tratamientos para SOP.

2. Objetivos

Objetivo general

Diseñar y evaluar *in silico* ésteres de diosgenina con aminoácidos y establecer su análisis retrosintético.

Objetivos particulares

1) Seleccionar dianas biológicas para relacionadas al síndrome de ovario poliquístico
2) Determinar la energía de acoplamiento e interacciones proteína-ligando de ésteres de diosgenina con aminoácidos con dianas implicadas en el síndrome de ovario poliquístico.
3) Seleccionar los mejores ésteres de diosgenina con aminoácidos por su interacción con dianas relacionadas a los fenotipos del síndrome de ovario poliquístico.
4) Conocer el potencial farmacológico de los ésteres de diosgenina con aminoácidos para el síndrome de ovario poliquístico mediante sus propiedades farmacocinéticas de absorción, distribución, metabolización, excreción y toxicidad.
5) Establecer la ruta retrosintética para los compuestos EDA con más alto potencial biológico.

3. Discusión de resultados

Las herramientas *in silico* han sido fundamentales para la investigación del SOP durante la última década, desde el estudio de SNPs en genes asociados a PCOS (94), fenómenos evolutivos (95), hasta la evaluación de productos naturales y diseño de moléculas bioactivas (96) enfocándose en las diferentes vías y proteínas asociadas a las manifestaciones clínicas que se pueden presentar en las pacientes, es por lo que este proyecto se enfocó en dos análisis bioinformáticos: docking molecular y predicción de las propiedades ADMET.

Se dividió en 3 etapas, la primera correspondiente a la comparación de EA de los compuestos EDA vs el control de referencia, siendo éstos los ligandos endógenos, así como fármacos ya utilizados para SOP. La segunda etapa es complementaria al análisis energético, ya que por sí mismo, la EA no permite saber si el ligando interactúa dentro del sitio activo de las dianas, permitiendo hacer el descarte de aquellas moléculas que no se encontraran espacialmente favorecidas. La última etapa fue dirigida al estudio interaccional para determinar el papel de las moléculas sobre las dianas, ya que existen interacciones específicas para cada una de estas proteínas que puede indicar su comportamiento como inhibidores, agonistas, antagonistas o activadores (Figura 27).

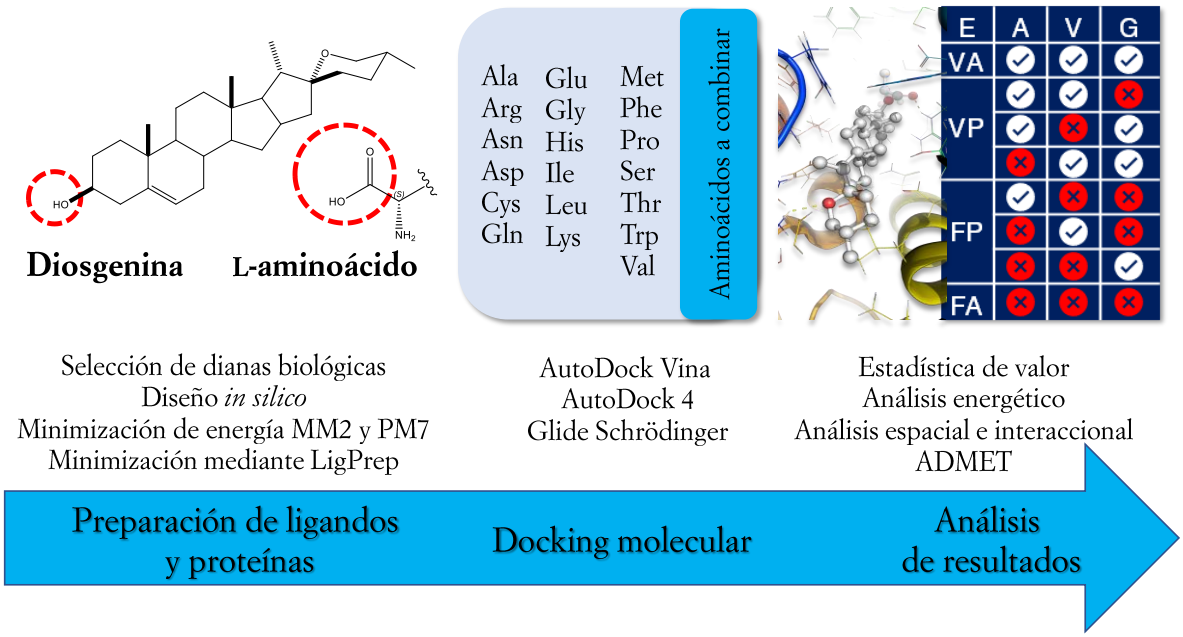


Figura 23. Esquema para el diseño, análisis y evaluación de los compuestos EDA en dianas implicadas en el SOP.

Previamente se ha mencionado que la funcionalización de esteroides con aminoácidos puede derivar en actividades biológicas diversas y potentes, por lo que fue de interés el diseño de compuestos esteroidales conjugados con aminoácidos proteinogénicos vía éster, utilizando como base esteroidal a la diosgenina, un espirostano con amplia actividad biológica. Se estudiaron 20 compuestos EDA que se muestran en la Figura 24.

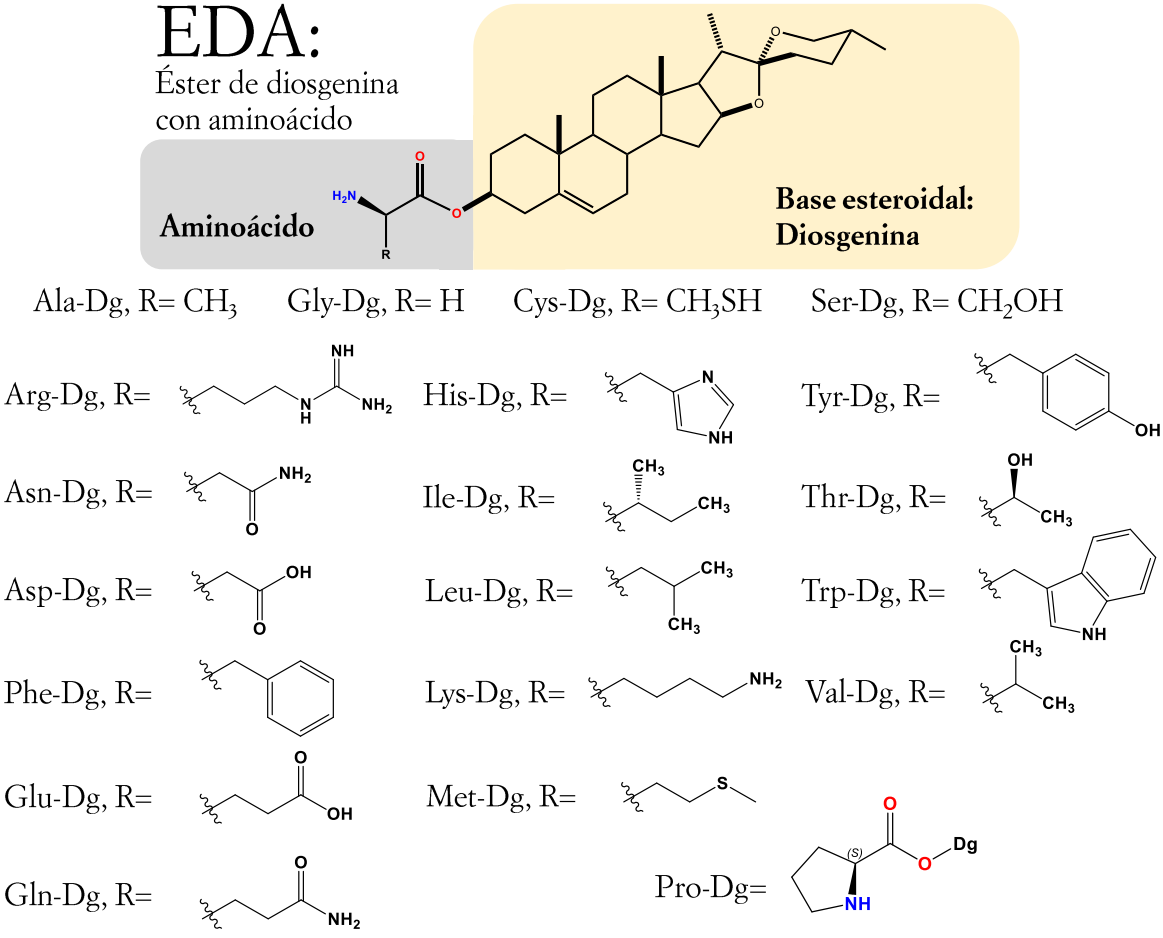


Figura 24. Compuestos EDA estudiados en esta tesis.

También se ha hecho énfasis que el tratamiento del SOP resulta complicado por las diversas manifestaciones clínicas de las pacientes, efectos adversos o resistencia a los fármacos que terminan repercutiendo en la calidad de vida de las pacientes. Además, se ha mencionado que el SOP presenta diferentes fenotipos asociados en mayor o menor medida a dianas biológicas, resultando imperante la búsqueda de nuevas moléculas que puedan

tratar a un fenotipo en particular y mejor aún, obtener moléculas con la capacidad de tratar más de un fenotipo de esta enfermedad.

En orden de determinar si las moléculas evaluadas podrían cumplir este cometido, se procedió a clasificar las proteínas para el estudio:

1. Grupo relacionado a proteínas cuya inhibición es deseable en al menos uno de los fenotipos de SOP
2. Grupo de proteínas cuya inhibición o bloqueo es indeseable ya que están involucrada en procesos fisiológicos esenciales y que se ha encontrado expresión reducida, mutaciones o que los fármacos utilizados pueden inhibir los efectos adversos.
3. Grupo involucrado de proteínas cuya activación es deseable para el tratamiento (Ver Tabla 3).

Tabla 3 Proteínas asociadas al SOP y el efecto deseado según el fenotipo de la enfermedad.

	Proteína/fenotipo	**SOP clásico**	**SOP ovulatorio**	**SOP no hiper androgénico**
Inhibir/Bloquear	5αR	Inhibir	Inhibir	No inhibir
	AR	Bloquear	Bloquear	No bloquear
	ERα	Bloquear	Bloquear	No bloquear
	ERβ	Bloquear	No bloquear	No bloquear
	PR	Bloquear	No bloquear	No bloquear
	VGEFR2	Inhibir	Inhibir	Inhibir
	CYP17A1	Inhibir	Inhibir	Inhibir
	CYP19A1	No inhibir	Inhibir	Inhibir
	VDB	Inhibir	Inhibir	Inhibir
No inhibir	CYP11A1	bloquear	No bloquear	No bloquear
	CYP21A2	No bloquear	No bloquear	No bloquear
	GR	No bloquear	No bloquear	No bloquear
	MR	No bloquear	No bloquear	No bloquear
	SHBG	No bloquear	No bloquear	No bloquear
Activar	MARRS	Activar	Activar	Activar
	VDR	Activar	Activar	Activar

3.1 Primer nivel de análisis: energía de afinidad

En el primer nivel de análisis se comparó la energía de acoplamiento (EA) de los compuestos EDA con dianas específicas. Considerando que cada sistema tiene diferentes métodos de cálculo de EA (97,98) no es posible comparar directamente las EA entre sí, por lo que se compararon las diferencias de EA entre los ligandos endógenos de cada diana y fármacos relacionados en cada sistema vs los resultados obtenidos para los compuestos EDA. Con el sistema AutoDock 4 (AD4) se obtuvo que los derivados EDA superaron energéticamente al ligando de referencia en las dianas 5αR, VGEFR2, y VDB como se observa en la Tabla 4.

Tabla 4. Energías de acoplamiento (kcal/mol) obtenidas con AD4 en dianas cuya inhibición es favorable.

Compuestos vs ligandos endógenos											
Proteína/ molécula	Ala-Dg	Cys-Dg	Asp-Dg	Glu-Dg	Phe-Dg	Gly-Dg	His-Dg	Ile-Dg	Lys-Dg	Leu-Dg	Met-Dg
5αR	-12.2	-11.3	-11.9	-12.2	-13.2	-11.7	-11.9	-12.7	-11.4	-14.0	-11.5
AR	-9.5	-9.6	-9.0	-9.2	-10.5	-9.7	-9.3	-9.8	-10.3	-9.7	-9.0
ERα	-9.1	-9.4	-9.1	-9.1	-9.6	-9.0	-10.1	-10.2	-10.0	-9.8	-9.2
ERβ	-8.7	-9.2	-8.2	-8.3	-9.6	-9.2	-9.7	-9.5	-9.3	-8.6	-8.5
PR	-9.6	-8.6	-6.7	-7.1	-7.6	-8.5	-7.7	-8.9	-7.6	-7.3	-6.9
VGEFR2	-8.9	-9.3	-9.5	-9.2	-9.8	-9.6	-9.2	-9.4	-9.7	-10.1	-9.1
CYP17A1	-7.6	-7.5	-5.3	-4.8	-5.5	-7.3	-5.4	-5.6	-5.6	-5.0	-4.3
CYP19A1	-4.9	-5.4	-4.6	-4.4	-5.8	-5.3	-6.0	-5.5	-5.6	-5.1	-4.2
VDB	-9.5	-9.1	-9.0	-8.9	-9.9	-9.3	-10.1	-10.4	-10.1	-9.6	-9.4
Proteína/ molécula	Asn-Dg	Pro-Dg	Gln-Dg	Arg-Dg	Ser-Dg	Thr-Dg	Val-Dg	Trp-Dg	Tyr-Dg	Ligando endógeno	Fármaco
5αR	-12.2	-12.3	-12.1	-12.2	-12.8	-11.8	-12.0	-14.5	-13.5	-11.2	-10.3
AR	-9.6	-10.3	-9.2	-10.3	-10.1	-9.1	-9.4	-8.0	-10.6	-11.3	-8.0
ERα	-9.5	-9.3	-9.5	-9.7	-9.4	-9.6	-1.5	-10.1	-10.5	-10.3	-9.7
ERβ	-8.3	-9.6	-9.0	-8.5	-9.2	-8.6	-8.9	-9.2	-8.5	-10.8	-9.8
PR	-6.5	-8.6	-6.5	-6.9	-8.3	-6.3	-7.1	-8.6	-8.0	-10.7	-10.6
VGEFR2	-9.3	-9.9	-8.8	-9.0	-9.3	-8.9	-9.2	-9.5	-10.0	-8.7	-8.6
CYP17A1	-6.4	-5.6	-4.7	-4.4	-7.7	-5.9	-5.0	-4.9	-5.0	-7.9	-9.0
CYP19A1	-5.7	-5.8	-5.3	-4.1	-5.9	-5.0	-4.9	-5.7	-6.1	-9.6	-7.6
VDB	-9.1	-10.1	-9.3	-9.3	-10.0	-9.7	-9.6	-10.5	-10.3	-9.5	-10.5

En amarillo están los valores de energías superiores al ligando endógeno de cada diana.

Adicionalmente, los resultados sugieren que el derivado Tyr-Dg tiene mayor potencial para inhibir a ERα al superar por 0.2 kcal/mol al estradiol, ligando endógeno del receptor (Tabla 4).

Por AutoDock Vina (ADV) se obtuvieron resultados similares a AD4 para 5αR y VDB. Además, hubo energías superiores a la del ligando de referencia en PR con Phe-Dg, His-Dg y Pro-Dg. Particularmente, Trp-Dg presentó EA superior a la de los ligandos endógenos en AR, PR, VGEFR2 y CYP17A1 (Tabla 5).

Tabla 5. Energías de acoplamiento (kcal/mol) obtenidas con ADV en dianas cuya inhibición es deseable.

Compuestos vs ligandos endógenos											
Proteína/ molécula	Ala-Dg	Cys-Dg	Asp-Dg	Glu-Dg	Phe-Dg	Gly-Dg	His-Dg	Ile-Dg	Lys-Dg	Leu-Dg	Met-Dg
5αR	-12.4	-11.6	-11.7	-11.7	-12.4	-12	-12.6	-12.3	-11.5	-11.4	-11.4
AR	-7.7	-8.1	-9.0	-8.6	-10.2	-8	-9.3	-8.3	-8.4	-8.2	-8.1
ERα	-7.9	-7.7	-8.0	-8.1	-9.0	-7.8	-8.5	-8.3	-8.0	-7.9	-7.3
ERβ	-7.7	-7.8	-8.4	-8.2	-8.8	-7.2	-7.9	-7.4	-8.0	-7.2	-7.6
PR	-8.4	-8	-8.4	-8.4	-10.2	-8.2	-9.2	-8.7	-8.1	-8.2	-7.9
VGEFR2	-8.2	-7.6	-7.9	-8.1	-9.4	-8.3	-8.7	-8.2	-8	-8.4	-7.7
CYP17A1	-9.1	-9.6	-9.9	-9.8	-10.5	-10.2	-10.4	-9.7	-9.3	-9.3	-9.3
CYP19A1	-8.1	-8.6	-9.3	-8.6	-8.9	-8.5	-8.6	-8.8	-10.2	-9.7	-8.1
VDB	-9.2	-8.7	-9.5	-9.1	-9.8	-9.7	-9.4	-9.2	-8.8	-9.5	-8.4
Proteína/ molécula	Asn-Dg	Pro-Dg	Gln-Dg	Arg-Dg	Ser-Dg	Thr-Dg	Val-Dg	Trp-Dg	Tyr-Dg	Ligando endógeno	Fármaco
5αR	-12.1	-13.3	-11.8	-12.2	-11.1	-11.4	-11.5	-13.5	-12.3	-10.3	-11.6
AR	-8.7	-9.1	-8.4	-8.9	-8.2	-8.5	-8.2	-11.4	-9.8	-11.0	-8.0
ERα	-8.3	-9.0	-8.0	-8.5	-8.2	-8.0	-8.0	-9.0	-9.1	-10.4	-6.1
ERβ	-8.5	-8.7	-8.3	-7.6	-7.7	-8.1	-8.5	-9.7	-8.3	-11.0	-8.9
PR	-8.7	-8.9	-8.0	-8.3	-7.9	-8.3	-8.5	-10.5	-8.6	-8.8	-9.7
VGEFR2	-8.3	-9.3	-8.1	-8.7	-8.6	-7.9	-8.4	-10.9	-9.5	---	-11.0
CYP17A1	-9.5	-10.5	-9.4	-9.5	-10.7	-9.3	-9.1	-11.1	-10.7	-10.8	-12.1
CYP19A1	-8.6	-9.3	-8.6	-8.9	-8.5	-8.6	-8.8	-10.2	-9.7	-12.8	-9.2
VDB	-10.1	-10.0	-8.9	-8.8	-9.3	-9.7	-9.7	-11.0	-10.0	-7.7	-8.5

En amarillo están las energías superiores al ligando endógeno.

Estos resultados comparados entre estas dos plataformas (dos de las más utilizadas de software libre) sobre PR pueden parecer controversiales a este nivel, ya que se sabe que el levonorgestrel, fármaco de referencia de este receptor tiene una afinidad muy superior a la de la progesterona (99); los resultados de EA en ADV muestran una clara diferencia donde el fármaco superó por 0.9 kcal/mol a la referencia, y en el caso de AD4 el fármaco tuvo una menor energía a la del ligando. Para todos los sistemas evaluados, se espera una alta correlación entre la actividad biológica y la EA obtenida sin embargo esto no siempre es posible, por lo que se requiere un análisis más fino de la interacción proteína-ligando, obtenida en los siguientes niveles de análisis.

Con Glide se obtuvo que la mayoría de los compuestos EDA tiene energías de afinidad comparables con las de los ligandos endógenos en cada diana en estudio. La excepción fue VDB con valores de EA positivos e incluso con ausencia de interacción con CYP19A1 (Tabla 6).

Tabla 6. Energías de acoplamiento obtenidas con Glide (kcal/mol) en dianas cuya inhibición es deseable.

Compuestos vs ligandos endógenos											
Proteína/ molécula	Ala-Dg	Cys-Dg	Asp-Dg	Glu-Dg	Phe-Dg	Gly-Dg	His-Dg	Ile-Dg	Lys-Dg	Leu-Dg	Met-Dg
5αR	-6.3	-6.2	-5.5	-5.7	-6.5	-5.4	-6.6	-5.5	-6.8	-5.9	-6.2
AR	1.0	-1.6	-2.0	-1.6	-2.3	0.9	-2.3	-1.5	-0.5	-0.3	-1.4
ERα	-3.4	-1.9	-2.3	-3.2	-4.1	-3.3	-3.6	-2.6	-5.2	-3.0	NI
ERβ	-2.4	-2.1	-1.9	-2.0	-2.9	-2.4	-2.4	-2.3	-3.4	-2.3	-2.0
PR	-1.9	-2.7	-2.4	-2.6	-3.2	-2.9	-2.8	-3.1	1.3	-2.4	-2.1
VGEFR2	-3.7	-2.5	-2.7	-3.8	-4.9	-2.6	-3.6	-3.4	NI	-3.4	-2.0
CYP17A1	-2.7	-2.0	-2.7	-3.1	-3.6	-2.2	-3.5	-2.8	-3.6	-3.1	-2.4
CYP19A1	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
VDB	-4.5	-4.4	-5.2	-4.4	-3.8	-5.6	-4.9	-4.3	-3.9	-3.5	-3.7
Proteína/ molécula	Asn-Dg	Pro-Dg	Gln-Dg	Arg-Dg	Ser-Dg	Thr-Dg	Val-Dg	Trp-Dg	Tyr-Dg	Ligando endógeno	Fármaco
5αR	-6.5	-5.5	-5.6	-7.3	-4.8	-5.7	-4.9	-6.2	-6.6	-11.2	-10.3
AR	-2.8	0.2	-2.3	-2.8	-1.5	-2.4	-1.0	-3.4	-1.9	-11.1	-7.3
ERα	-2.9	-3.2	-2.9	-3.2	-2.9	-4.1	-2.5	-3.9	-3.7	-10.4	-9.3

ERβ	-3.0	-2.7	-3.0	-1.4	-2.4	-2.5	-2.2	-1.7	-3.6	-10.0	-4.6
PR	-3.6	-3.3	-3.7	-3.0	-4.1	-4.1	-2.6	-0.6	-3.3	-8.8	-9.1
VGEFR2	-3.4	-4.0	NI	NI	-3.2	-3.7	-4.0	-4.1	-5.9	-10.0	-5.6
CYP17A1	-3.6	-2.5	-3.5	-4.0	-3.1	-3.6	-2.8	-4.5	-3.8	-8.3	-9.7
CYP19A1	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	-10.5	-6.0
VDB	-5.5	-4.8	-5.2	-4.5	-4.4	-5.6	-4.2	-4.7	-4.9	-5.0	-5.9

En amarillo están las energías superiores al ligando endógeno. NI, no interacciona.

Estos resultados se pueden justificar mediante la comparación de los métodos por los que se obtienen los "docking score" de cada software, Glide ocupa un sistema "jerárquico" de búsqueda y perfilamiento, es decir que lleva a cabo un análisis del sitio y del tamaño, mientras que AD4 y ADV utilizan un "scoring function" híbrido entre mecánica molecular y regresión estadística para ajustar los resultados con resultados experimentales de IC_{50} y/o Ki (100,101). Esto explica a este nivel, que probablemente los EDA evaluados no se encuentran en la pose y con la interacción más favorable y que Glide es el único sistema que devuelve un valor de EA más ajustado con este fenómeno y que se ha corroborado en los siguientes niveles de análisis, detallados más adelante. En el caso de la globulina de unión a vitamina D (VDB) se obtuvo que los derivados Asp-Dg, Gly-Dg, Asn-Dg, Glu-Dg y Thr-Dg son los que presentaron EA superiores al ligando endógeno, en donde la mayoría de las moléculas comparten cadenas laterales polares, y serán foco de atención en los siguientes niveles de estudio.

El segundo grupo de dianas evaluadas está involucrado a proteínas cuya inhibición es indeseable seleccionadas según los reportes de la literatura en la que se ha reportado baja expresión en algún fenotipo de SOP, en donde los tratamientos tienen como efecto secundario la interacción con estas dianas, o por la similitud de la base esteroidal con los ligandos endógenos de estas proteínas y por lo cual EA superiores a sus ligandos endógenos puedan desembocar en potenciales efectos adversos en las pacientes.

Mediante AD4, varios compuestos EDA tuvieron energías de afinidad superiores a los de los ligandos endógenos para CYP11A1, CYP21A2 y GR. Particularmente, los derivados aromáticos Trp-Dg y Tyr-Dg presentaron diferencias energéticas más grandes contra los ligandos de las proteínas en las que interactúan (Tabla 7).

Tabla 7. Energías de acoplamiento (kcal/mol) obtenidas con AD4 y dianas cuya inhibición es deseable.

Compuestos vs ligandos endógenos											
Proteína/ molécula	Ala-Dg	Cys-Dg	Asp-Dg	Glu-Dg	Phe-Dg	Gly-Dg	His-Dg	Ile-Dg	Lys-Dg	Leu-Dg	Met-Dg
CYP11A1	-9.9	-9.6	-10.1	-9.1	-10.5	-9.6	-7.8	-9.5	-9.3	-9.3	-8.9
CYP21A2	-8.6	-8.5	-8.6	-8.5	-10.2	-8.5	-9.8	-8.7	-8.8	-9.0	-7.9
GR	-12.0	-12.6	-11.0	-10.2	-10.5	-12.8	-9.1	-10.5	-10.4	-11.3	-10.2
MR	-10.1	-10.3	-10.4	-10.4	-10.0	-8.9	-9.4	-10.7	-12.2	-10.7	-9.6
SHBG	-9.3	-9.9	-9.5	-9.3	-11.1	-9.3	-9.6	-9.9	-9.2	-10.5	-10.0
Proteína/ molécula	Asn-Dg	Pro-Dg	Gln-Dg	Arg-Dg	Ser-Dg	Thr-Dg	Val-Dg	Trp-Dg	Tyr-Dg	Ligando endógeno	Fármaco
CYP11A1	-8.4	-9.4	-8.6	-8.3	-9.6	-9.2	-9.7	-10.8	-10.7	-9.3	-6.2
CYP21A2	-8.9	-9.4	-8.2	-7.1	-8.3	-7.8	-8.7	-10.0	-9.1	-8.4	-6.9
GR	-10.3	-11.2	-10.5	-9.7	-11.2	-10.1	-12.2	-9.6	-13.2	-11.0	-9.6
MR	-9.8	-10.0	-9.1	-11.0	-10.0	-9.7	-10.3	-11.7	-11.8	-11.0	-14.9
SHBG	-9.8	-10.9	-9.5	-10.1	-9.0	-9.3	-9.8	-11.1	-10.9	-11.4	-9.8

En amarillo están las energías superiores al ligando endógeno.

Los resultados de ADV determinaron que todos los EDA presentaron energías de afinidad superiores a la del ligando endógeno con CYP11A1. En particular, Phe-Dg presentó energías de afinidad superiores en MR y los otros EDA aromáticos en MR y en la SHBG. Estos datos sugieren que los EDA aromáticos son los que, además de presentar energías de afinidad superiores a las de los otros aminoácidos evaluados, también presentaron energías considerables en las diferentes dianas evaluadas.

Tabla 8. Energías de acoplamiento (kcal/mol) obtenidas con ADV para dianas cuya inhibición es indeseable.

Compuestos vs ligandos endógenos											
Proteína/ molécula	Ala-Dg	Cys-Dg	Asp-Dg	Glu-Dg	Phe-Dg	Gly-Dg	His-Dg	Ile-Dg	Lys-Dg	Leu-Dg	Met-Dg
CYP11A1	-13.1	-12.2	-12.6	-12.7	-14	-12.7	-13.5	-13.2	-12.3	-12.9	-12.3
CYP21A2	-9.5	-9.4	-9.6	-10.3	-10.7	-10.1	-11.1	-10.2	-10.2	-9.8	-9.9
GR	-7.7	-7.4	-7.8	-8.0	-9.0	-7.7	-8.3	-7.9	-7.6	-7.5	-7.2
MR	-8.7	-8.3	-8.9	-9.2	-10.5	-8.6	-9.5	-8.8	-8.6	-8.7	-8.2

SHBG	-8	-7.6	-8.2	-8.7	-10.7	-7.9	-8.6	-8.6	-8.4	-9	-8
Proteína/ molécula	Asn-Dg	Pro-Dg	Gln-Dg	Arg-Dg	Ser-Dg	Thr-Dg	Val-Dg	Trp-Dg	Tyr-Dg	Ligando endógeno	Fármaco
CYP11A1	-13	-13.8	-12.8	-13	-12.3	-12.8	-12.6	-15.2	-13.9	-11.7	-8.2
CYP21A2	-9.8	-9.7	-9.4	-9.7	-9.5	-9.2	-9.3	-11.9	-11	-12.3	-9.6
GR	-8.1	-8.9	-7.5	-8	-8.3	-7.6	-7.9	-9.6	-9.0	-9.7	-8.8
MR	-9.6	-9.5	-9.6	-9.7	-9.5	-9.1	-8.7	-10.6	-9.8	-9.7	-11.6
SHBG	-8.3	-8.7	-8.5	-9.1	-8.2	-8	-8.7	-11.2	-10.3	-11	-11.1

En amarillo están las energías superiores al ligando endógeno.

Finalmente, con Glide se obtuvo que la mayoría de los compuestos EDA presentaron altas energías de afinidad con CYP11A1 confirmando que los derivados superaron energéticamente al ligando endógeno en los 3 sistemas evaluados. Este resultado es de particular interés dado que CYP11A1 es una de las enzimas más importantes en la biosíntesis de esteroides y los derivados pueden ser potenciales inhibidores. Con este resultado, es posible establecer un criterio de selección, ya que, si los derivados interfieren con la esteroidogénesis, existe la posibilidad de interferencia en toda la señalización de síntesis, y por tanto su utilización podría estar condicionada únicamente a fenotipos hiperandrogénicos, específicamente al SOP clásico excluyendo a los fenotipos en donde la producción de andrógenos es secundaria.

Tabla 9. Energías de acoplamiento (kcal/mol) obtenidas con Glide para dianas cuya inhibición es indeseable.

Compuestos vs ligandos endógenos											
Proteína/ molécula	Ala-Dg	Cys-Dg	Asp-Dg	Glu-Dg	Phe-Dg	Gly-Dg	His-Dg	Ile-Dg	Lys-Dg	Leu-Dg	Met-Dg
CYP11A1	-9.1	-8.9	-8.6	-9.5	-12.0	-9.6	-9.6	-7.8	-11.2	-7.8	-10.2
CYP21A2	-6.1	-5.8	NI	NI	-6.0	-5.7	-6.3	NI	NI	-5.7	NI
GR	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
MR	-1.6	-2.6	-2.4	-4.1	-2.8	-1.0	-3.6	-3.4	-5.4	-2.4	-2.7
SHBG	-4.3	-4.1	-3.8	-5.0	-5.3	-3.6	-4.2	-4.0	-4.9	-4.6	-4.0

Proteína/ molécula	Asn-Dg	Pro-Dg	Gln-Dg	Arg-Dg	Ser-Dg	Thr-Dg	Val-Dg	Trp-Dg	Tyr-Dg	Ligando endógeno	Fármaco
CYP11A1	-8.9	-9.4	-10.3	-10.3	-9.4	-10.0	-9.7	NI	-9.9	-9.0	-6.8
CYP21A2	-3.7	-3.5	-1.3	NI	-5.9	-6.3	-2.8	NI	NI	-9.4	-7.9
GR	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	-10.2	-10.9
MR	-3.8	-4.5	-3.2	-4.8	-1.4	-3.4	-0.6	-3.7	-4.1	-9.9	-11.2
SHBG	-4.2	-4.3	-4.6	-4.2	-4.1	-3.7	-3.6	-6.4	-6.3	-10.3	-9.5

En amarillo están las energías superiores al ligando endógeno. NI, no interacciona.

Finalmente, para la última clasificación de proteínas, los resultados de AD4 mostraron que los EDA aromáticos Phe-Dg, Tyr-Dg presentaron alta afinidad con MARRS, así como Leu-Dg, Ser-Dg y Val-Dg por el receptor de vitamina D, VDR (Tabla 10).

Tabla 10. Energías de acoplamiento (kcal/mol) obtenidas por AD4 para dianas cuya activación es deseable.

Compuestos vs ligandos endógenos											
Proteína/ molécula	Ala-Dg	Cys-Dg	Asp-Dg	Glu-Dg	Phe-Dg	Gly-Dg	His-Dg	Ile-Dg	Lys-Dg	Leu-Dg	Met-Dg
MARRS	-11.1	-11.9	-11.2	-12.0	-12.5	-11.5	-12.2	-12.4	-13.4	-12.2	-10.6
VDR	-10.3	-9.5	-9.0	-9.7	-14.1	-9.5	-10.3	-10.4	-10.5	-12.9	-8.9
Proteína/ molécula	Asn-Dg	Pro-Dg	Gln-Dg	Arg-Dg	Ser-Dg	Thr-Dg	Val-Dg	Trp-Dg	Tyr-Dg	Ligando endógeno	Fármaco
MARRS	-11.7	-11.9	-11.9	-11.8	-10.6	-11.0	-11.7	-13.2	-12.5	-8.8	---
VDR	-9.3	-9.8	-9.9	-8.5	-12.0	-10.6	-12.5	-11.1	-13.9	-11.4	-13.3

En amarillo están las energías superiores al ligando endógeno.

Con respecto a los resultados de ADV, también se obtuvo que los derivados EDA tuvieron alta afinidad con MARSS aunque ningún derivado superó las EA del ligando endógeno de VDR (Tabla 11).

Tabla 11. Energías de acoplamiento (kcal/mol) obtenidas con AD4 para dianas cuya activación es deseable.

Compuestos vs ligandos endógenos											
Proteína/ molécula	Ala-Dg	Cys-Dg	Asp-Dg	Glu-Dg	Phe-Dg	Gly-Dg	His-Dg	Ile-Dg	Lys-Dg	Leu-Dg	Met-Dg

MARRS	-9.7	-9.4	-9.5	-9.4	-10.7	-9.7	-10.2	-9.7	-9.3	-8.8	-9.1
VDR	-8.3	-8.1	-8.1	-8.1	-10.7	-8.3	-8.6	-8.5	-8.2	-9.4	-7.7
Proteína/ molécula	Asn-Dg	Pro-Dg	Gln-Dg	Arg-Dg	Ser-Dg	Thr-Dg	Val-Dg	Trp-Dg	Tyr-Dg	Ligando endógeno	Fármaco
MARRS	-9.3	-10.2	-9.6	-9.4	-9.4	-9.7	-9.7	-10.6	-10.5	-9.6	---
VDR	-7.9	-9.5	-7.9	-8.2	-8.7	-7.9	-8	-9.4	-8.8	-10.7	-13.2

En amarillo están las energías superiores al ligando endógeno.

Finalmente, con Glide ninguno de los compuestos superó energéticamente a los ligandos endógenos de MARRS o de VDR (Tabla 12)

Tabla 12. Energías de acoplamiento (kcal/mol) obtenidas con Glide para dianas cuya activación es deseable.

Compuestos vs ligandos endógenos											
Proteína/ molécula	Ala-Dg	Cys-Dg	Asp-Dg	Glu-Dg	Phe-Dg	Gly-Dg	His-Dg	Ile-Dg	Lys-Dg	Leu-Dg	Met-Dg
MARRS	-5.2	-4.8	-4.5	-5.1	-5.2	-5.3	-5.5	-5.0	-6.6	-4.7	-4.9
VDR	-2.8	-2.5	-2.4	-3.2	-3.3	NI	-4.0	-2.1	NI	-1.6	NI
Proteína/ molécula	Asn-Dg	Pro-Dg	Gln-Dg	Arg-Dg	Ser-Dg	Thr-Dg	Val-Dg	Trp-Dg	Tyr-Dg	Ligando endógeno	Fármaco
MARRS	-6.1	-5.1	-6.1	-7.2	-4.9	-5.9	-5.0	-5.8	-5.7	-8.2	---
VDR	-2.9	NI	-3.7	-3.1	-2.6	-3.1	-2.1	-3.8	-3.0	-11.4	-11.3

NI: No interacciona

Los resultados obtenidos con AD4 reportaron que los compuestos superaron energéticamente a los controles en 8 dianas, de las cuales AutoDock Vina no concuerda en varias de ellas y Glide de Schrödinger sólo devuelve valores de EA superiores en 1 proteína, la CYP11A1.

En resumen, se obtuvo que la mayoría de los compuestos superaron la energía de acoplamiento del colesterol, sustrato endógeno de la enzima CYP11A1. Resultado similar se obtuvo con la aminoglutetimida, un inhibidor de la misma enzima. Con AD4, los compuestos esteres de diosgenina con His, Met, Asn, Gln y Arg presentaron energías de acoplamiento inferiores al ligando endógeno. Es importante observar que los derivados

aromáticos EDA son los compuestos con energías superiores, convirtiéndolos en inhibidores potenciales (Figura 25).

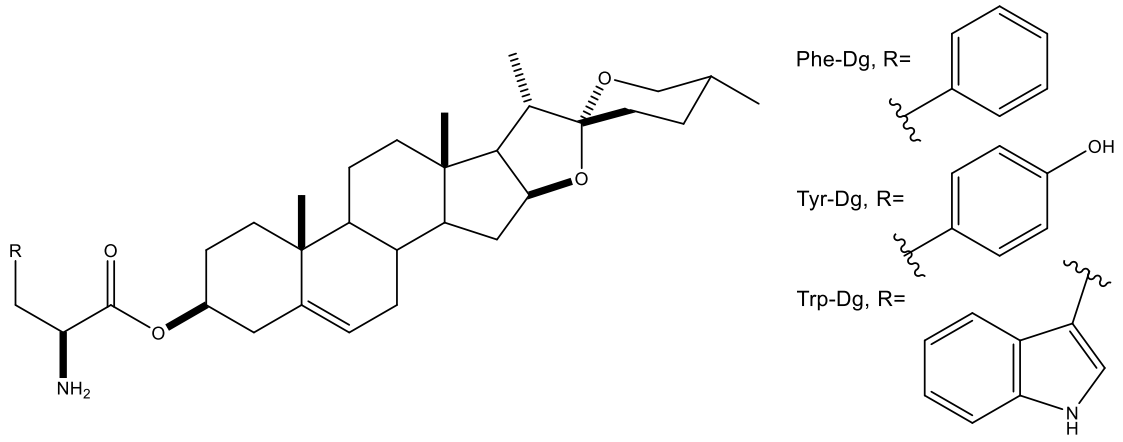


Figura 25. Estructura de EDA aromáticos

Con AutoDock Vina todos los EDA estudiados superaron al colesterol. En este caso, también los derivados aromáticos de Trp, Tyr y Phe fueron los compuestos que tuvieron mayores energías de activación. Finalmente, Glide Schrödinger devolvió menor cantidad de compuestos con potencial inhibitorio, fueron los esterificados con Asp, Ile, Leu, Asn y Phe. El compuesto con la mayor ΔEA vs colesterol fue el derivado aromático Phe-Dg. Es importante enfatizar que Glide Schrödinger no reportó interacción con Trp-Dg.

La comparación directa de las EA entre los sistemas evaluados no es metodológicamente posible, sin embargo, la comparación de los resultados en donde se determina si son inhibidores/activadores, sí es posible, por lo que se procedió al análisis estadístico de valor para comparar a los 3 sistemas entre sí utilizando como criterio si superan o no la EA reportada de los ligandos endógenos o de los fármacos de referencia para cada diana y dividiendo la comparación ligando endógeno/compuesto y fármaco/compuesto ya que no son equiparables entre sí.

Tabla 13. Estadística de valor de AD4, ADV y Glide. Ligandos endógenos vs compuestos EDA

	Ala-Dg	Cys-Dg	Asp-Dg	Glu-Dg	Phe-Dg	Gly-Dg	His-Dg	Ile-Dg	Lys-Dg	Leu-Dg	Met-Dg	Asn-Dg	Pro-Dg	Gln-Dg	Arg-Dg	Ser-Dg	Thr-Dg	Val-Dg	Trp-Dg	Tyr-Dg
5αR	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP
AR	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NP	NA
CYP17A1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NP	NA
CYP19A1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
ERα	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NP
ERβ	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PR	NA	NA	NP	NP	NP	NA	NP	NA	NA	NA	NA	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NA	NP	NP
VDB	PP	NP	PP	NP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	NP	PP	PP	PP	NP	PP	PA	PP	PP	PP
VGEFR2	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	PP	NP
GR	PP	PP	PA	PA	PA	PP	PA	PA	PA	PP	PA	PA	PP	PA	PA	PP	PA	PP	PA	PP
CYP11A1	NA	NP	NP	NP	NA	NA	NP	NP	NP	PP	NP	PP	NA	NP	NP	NA	NP	NA	NP	NA
CYP21A2	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PP	PA	PP	PP	PA	PA	PA	PA	PP	PP	PP
MR	PA	PA	PA	PA	PP	PA	PA	PA	PP	PA	PA	PA	PA	PA	PA	PA	PA	PA	NP	NP
SHBG	PA	PA	PA	PA	PA	PA	PA	PA	PA	PA	PA	PA	PA	PA	PA	PA	PA	PA	PP	PA
MARRS	PP	NP	NP	NP	PP	PP	PP	PP	NP	NP	NP	NP	PP	NP	NP	NP	PP	PP	PP	PP
VDR	NA	NA	NA	NA	NP	NA	NA	NA	NA	NP	NA	NA	NA	NA	NA	NP	NA	NP	NA	NP

PA: Positivo Absoluto; PP: Positivo Parcial; NA: Negativo Absoluto; NP: Negativo Parcial

3.2 Segundo nivel de análisis: sitio de interacción molecular

Los software de docking molecular fundamentalmente obtienen dos elementos: la energía de acoplamiento y la pose de unión (binding pose, en inglés), es decir la orientación relativa y conformación del ligando dentro de la proteína (102). La energía de acoplamiento es evaluada en el primer nivel de análisis, aunque a este nivel no existe certeza de que la molécula en cuestión esté dentro del sitio activo de interés, ya que pueden existir cavidades, estructuras secundarias o motivos estructurales con mayor afinidad por la molécula estudiada que pueda derivar en falsos positivos.

Se procedió a determinar la posición de las estructuras dentro de las moléculas evaluadas comparadas contra los ligandos endógenos y las estructuras cristalizadas reportadas en la literatura, lo que permitió integrar los resultados y proponer criterios diagnósticos para comparar la precisión de los 3 sistemas de interacción molecular "docking". Los resultados se compararon de la siguiente manera: 1) si la energía de afinidad fue superior o inferior al

control para la inhibición, activación o no afectar a las dianas biológicas, 2) si las moléculas se encuentran dentro del sitio activo.

A continuación, se discutirán las dianas en las que se busca inhibición o activación y se calificaron como "verdaderos positivos" para la enzima CYP11A1 cuya inhibición es útil en casos hiperandrogénicos graves del SOP.

3.2.1 Enzima 5α-reductasa

La 5α-reductasa cataliza la conversión de testosterona a dihidrotestosterona (DHT), metabolito que es 100 veces más activo que la testosterona y que es la encargada de los efectos androgénicos y metabólicos del SOP, lo cual la convierte en una de las dianas más importantes para el tratamiento de esta enfermedad buscando su inhibición (20,103). Podemos observar que en 2 de los 3 sistemas evaluados coinciden en que la mayoría de los compuestos presentan EA superiores al sustrato de esta enzima (Figura 26).

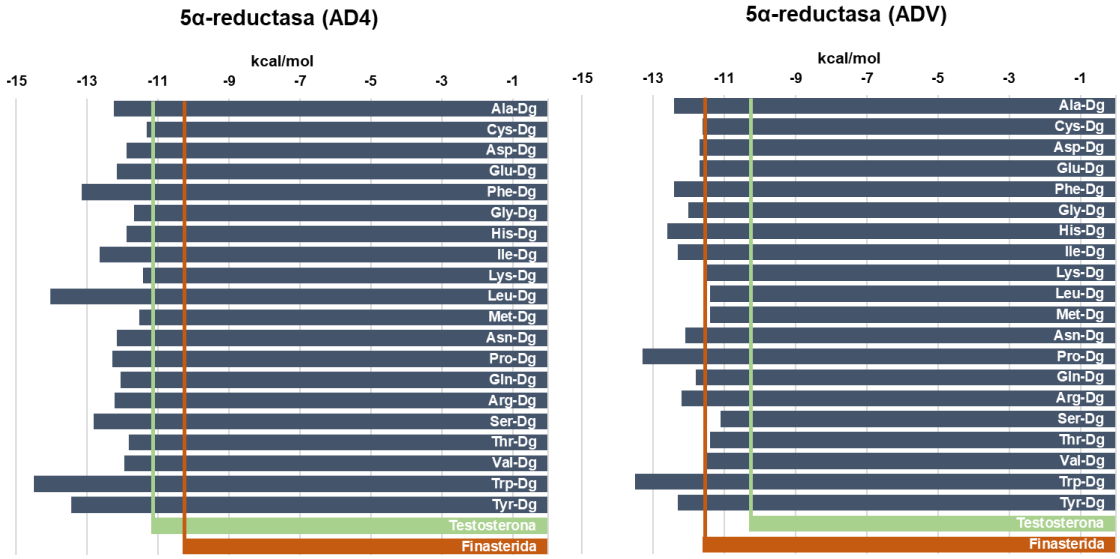


Figura 26. Energías de acoplamiento de EDA en 5α-reductasa obtenidos con AD4 y ADV.

La superposición de los ligandos dentro de este receptor formado por hélices, por los sistemas AD4 y ADV se obtuvo que los EDA resultaron superiores a la testosterona, también coinciden en el posicionamiento dentro del sitio activo de la enzima (Figura 30).

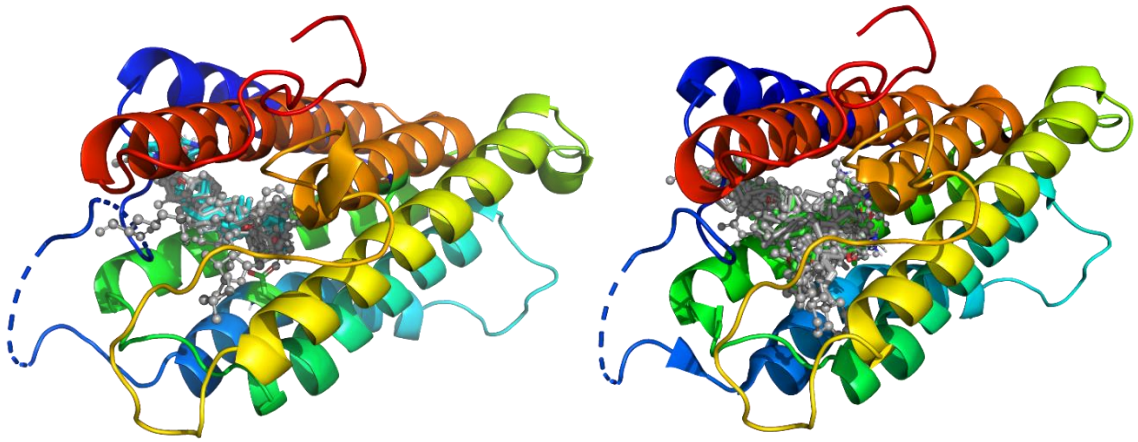


Figura 27. Superposición de EDA en 5αR obtenidos con AD4 (izquierda) y ADV (derecha).

Por su parte, con Glide se determinó que los derivados EDA no son comparables a la testosterona, no obstante, todos los derivados se estuvieron dentro del sitio activo de la enzima.

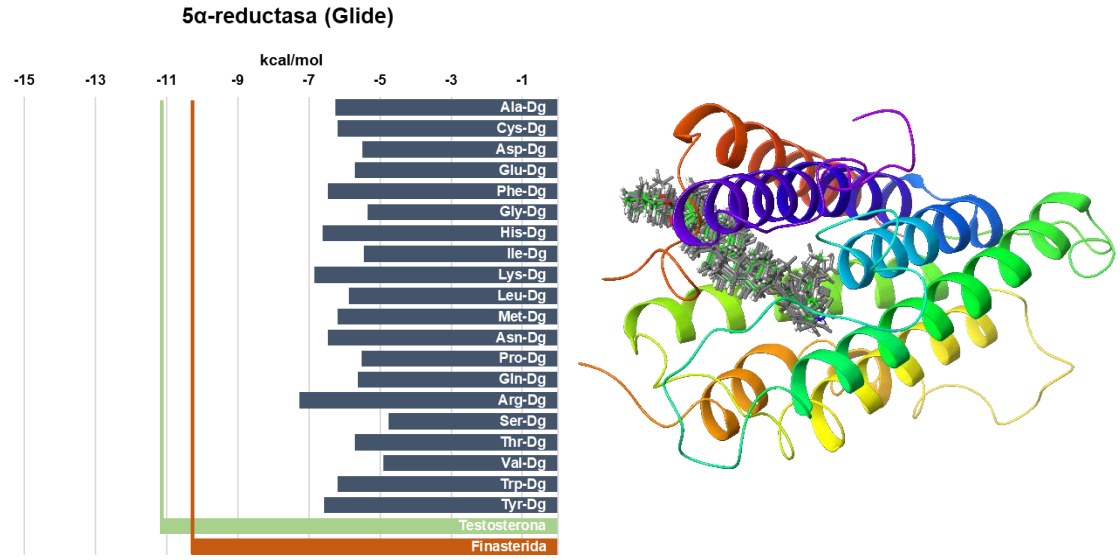


Figura 28. Comparación de EA y superposición de EDA en 5αR obtenidos con Glide.

Esta información se agrega a los datos energéticos ya que las evaluaciones pasan de ser "positivos parciales" a "verdaderos positivos". Aquellos resultados en donde se observó VP se considerarán como buenos candidatos a inhibidores de esta enzima, siendo de interés particular para los fenotipos con síntomas clínicos de hiperandrogenismo. Con respecto al rendimiento del software también se observa que entre los 2 sistemas AD4 y

ADV existe una buena conservación de la "binding pose" de los EDA obtenido, mientras que existe una diferencia significativa con Glide, ya que los derivados se orientaron sobre una de las hélices α más externas de la proteína a pesar de encontrarse dentro del sitio activo, pudiendo explicar la reducción en la EA obtenidas. Esto, por supuesto deberá corroborarse en el último nivel de análisis para determinar su configuración espacial de los EDA y las interacciones especificas con la proteína.

3.2.2 CYP11A1

En el caso de la enzima de escisión de la cadena lateral del colesterol (CYP11A1), es una diana perteneciente a la superfamilia citocromo P450 que se encarga de la ruptura de la cadena lateral del colesterol mediante 3 oxidaciones secuenciales involucrando a un grupo prostético hemo, para la obtención de la pregnenolona, componente principal en la ruta esteroidogénica y, por tanto, una enzima clave para la obtención de cualquier hormona esteroidea. Debido a su decisivo papel en la regulación de la biosíntesis de hormonas esteroideas, se busca no inhibir a dicha enzima, por lo que es deseable que los compuestos EDA no superen energéticamente al sustrato endógeno ni a un fármaco de referencia.

Los resultados energéticos en AD4 y ADV muestran que la mayoría de los compuestos son superiores al ligando endógeno e incluso a una molécula de referencia, la aminoglutetimida. Al llevar a cabo la superposición de ligandos, se encontró que todos los compuestos EDA, a excepción de His-Dg se encontraron en el sitio activo de la enzima (Figura 30).

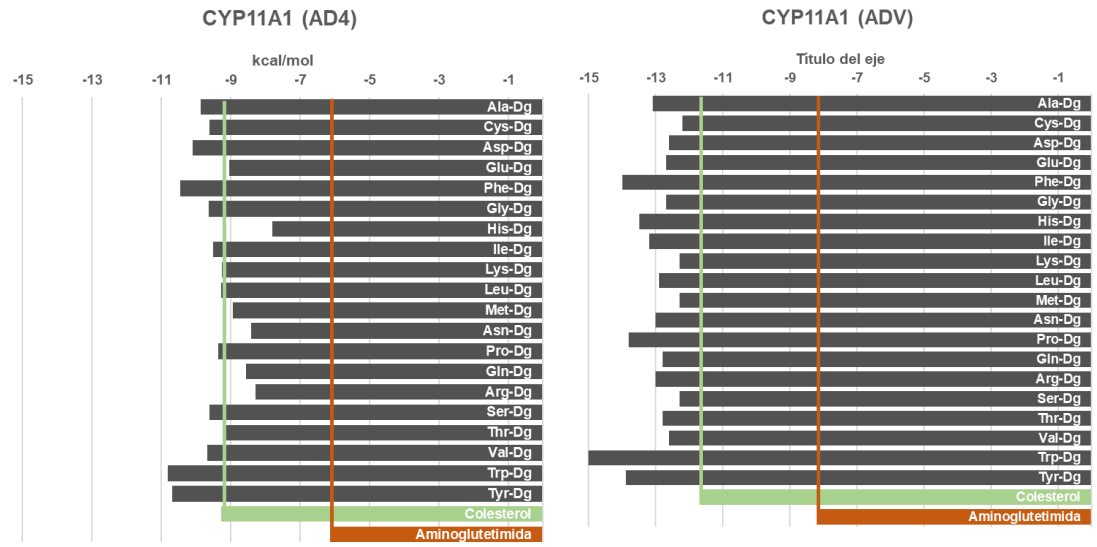


Figura 29. Energías de acoplamiento de EDA en CYP11A1 obtenidos con AD4 y ADV.

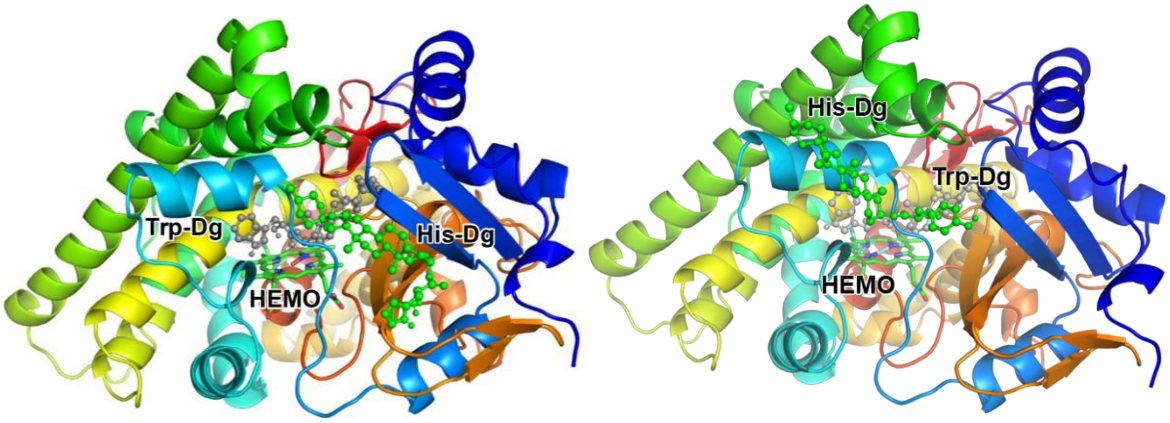


Figura 30. Estructuras de Trp-Dg sobre el grupo prostético hemo e His-Dg en CYP11A1 obtenidas por AD4 y ADV.

Trp-Dg en AD4 y ADV presentó una ΔEA con respecto al colesterol de 1.6 y 3.5 kcal/mol respectivamente, siendo el compuesto con la mayor diferencia de energía de todos los compuestos evaluados. Además, se situó en el sitio activo de la enzima con interacción con el grupo prostético. Todos los compuestos se situaron dentro del sitio activo, a excepción de His-Dg. En ambos sistemas, este derivado no se encontró sobre el grupo hemo (Figura 30), fue sobre la cadena I y F de la diana y no dentro del sitio activo. Se obtuvo que AD4 estimó mejor el comportamiento de la molécula en CYP11A1 ya que el colesterol superó a His-Dg por 1.5 kcal/mol pero ADV indicó que el EDA es superior en 1.8 kcal/mol. El

resultado de AD4 obtenido como PP pasó a “verdadero positivo” VP y en ADV de PP a un “falso positivo” FP.

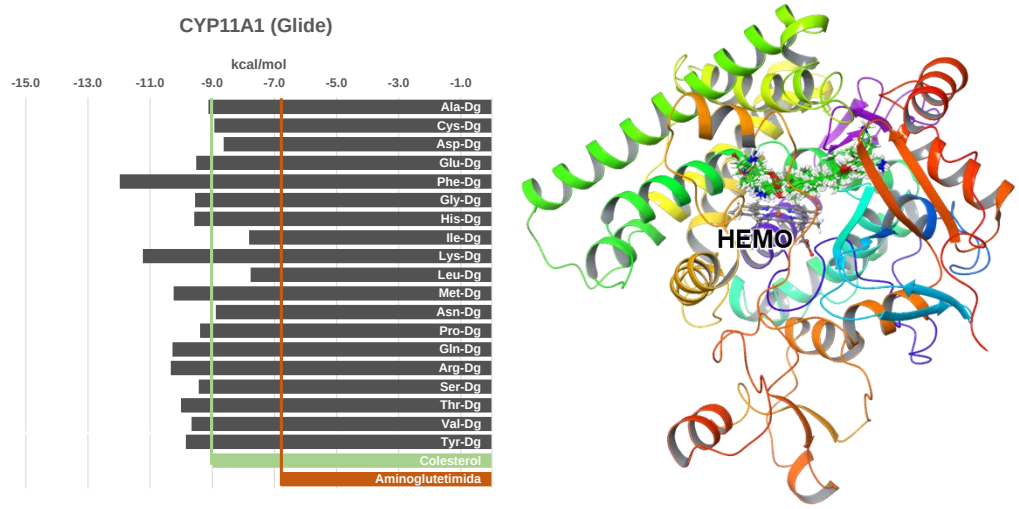


Figura 31. Comparación de EA y superposición de EDA en CYP11A1 con Glide.

Glide devolvió los siguientes resultados: el EDA con mejor energía de interacción fue Phe-Dg con una ΔEA con respecto al colesterol de -3.0 kcal/mol. El mejor compuesto con AD4 y ADV fue Trp-Dg (Figura 35), sin embargo, por Glide se obtuvo que no existe ninguna interacción con la diana. A pesar de que ambos EDA son aromáticos, el grupo indol tiene mayor volumen para el sitio activo, el colesterol se une a una cadena lateral larga, mientras que una fracción de aminoácido del derivado se concentró en un sistema heteroaromático.

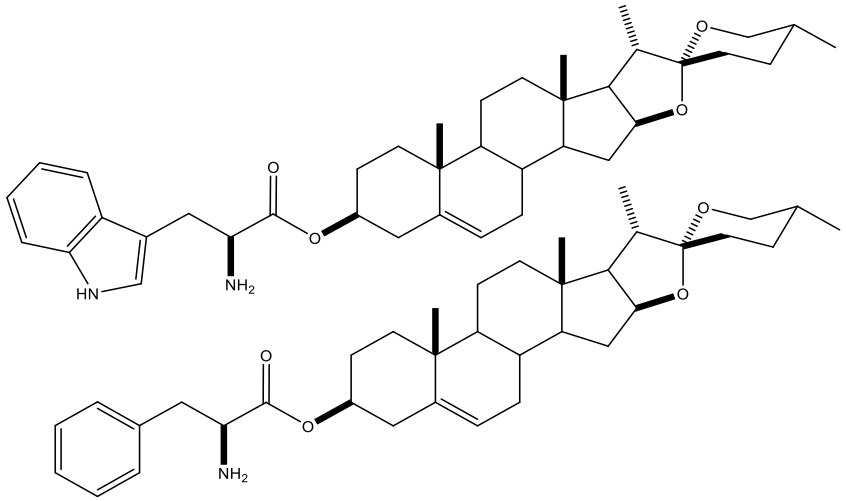


Figura 32. Estructura de Phe-Dg y Trp-Dg.

3.2.3 Globulina de unión a vitamina D

La subexpresión de la globulina de unión a vitamina D (VDB) en pacientes con SOP se ha asociado directamente a la gravedad de la enfermedad ya que regula la biodisponibilidad de vitamina D. La inhibición de esta proteína podría aumentar la biodisponibilidad de este ligando, además, al haber regulación genética mediada indirectamente por ligando podría aumentar su expresión.

Con AD4 se observó que no todos los compuestos superaron energéticamente al calcitriol, ninguno de ellos superó al TEI9647. Por su parte, con ADV únicamente Met-Dg no superó al fármaco de referencia. Todos los EDA restantes superaron energéticamente a ambos ligandos.

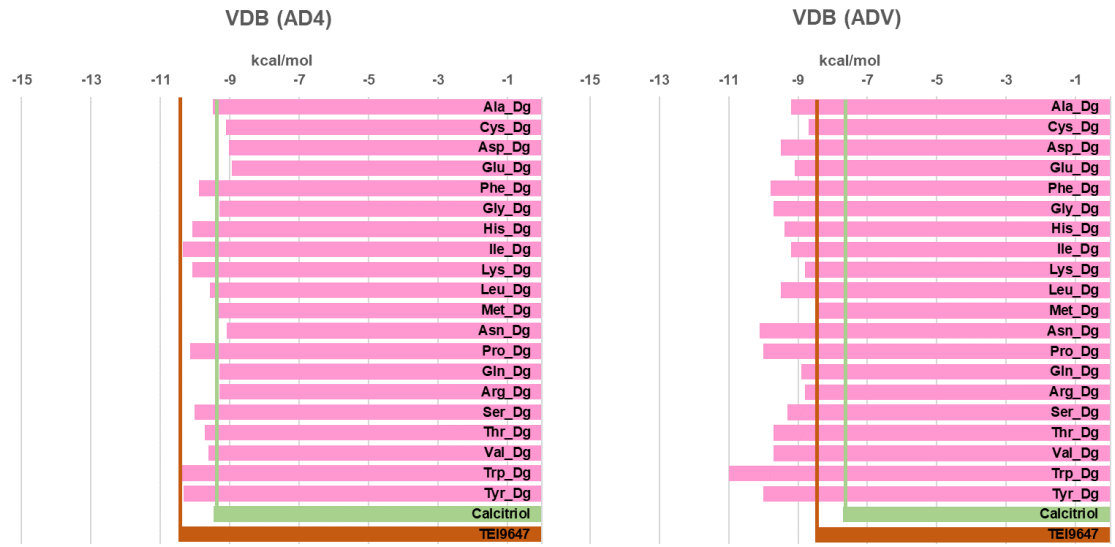


Figura 33. Energías de acoplamiento de EDA en VDB obtenidos con AD4 y ADV respectivamente.

La superposición de las moléculas dentro del sitio activo de la proteína demostró que la mayoría de los compuestos EDA se encontraron en el sitio de unión del calcitriol. La excepción fueron los derivados Phe-Dg, Leu-Dg y Tyr-Dg que se encontraron ubicados entre dos pequeñas hélices α del sitio activo. Los EDA aromáticos fueron los que presentaron las energías más altas, con al menos ΔEA= 1 kcal/mol, lo que sugiere que esa región (Figura 37) podría ser esencial para el transporte del ligando, lo cual se corroborará en el siguiente nivel de estudio. Por su parte, el derivado de Arg-Dg se encontró por fuera

de este sitio, en la periferia de la proteína formada por dos hélices α lejos del sitio activo de la diana.

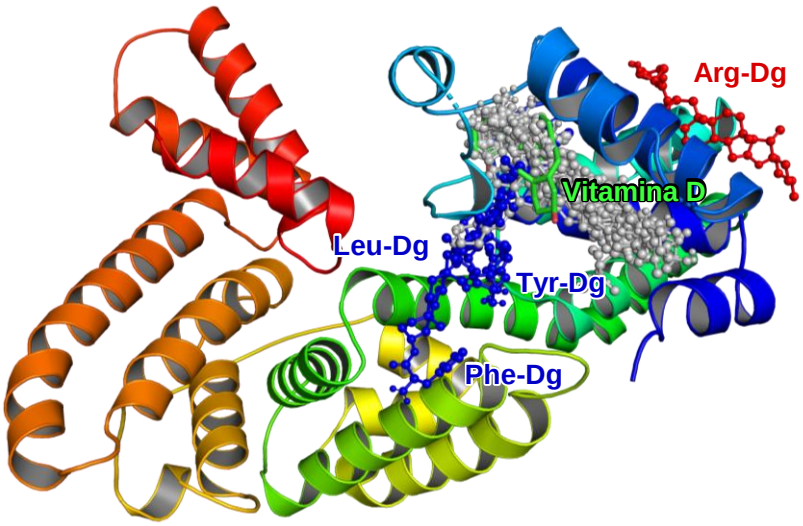


Figura 34. Superposición de EDA en VDB obtenidos con AD4. En azul Phe-Dg, Leu-Dg y Tyr-Dg; en rojo Arg-Dg

Con ADV se estimó que todas las moléculas eran potenciales bloqueadores de la VDB y se confirmó que los derivados se encontraron dentro del sitio activo. El derivado Arg-Dg también se encontró alejado del sitio de unión, aunque interaccionando entre las dos hélices como en el caso previo.

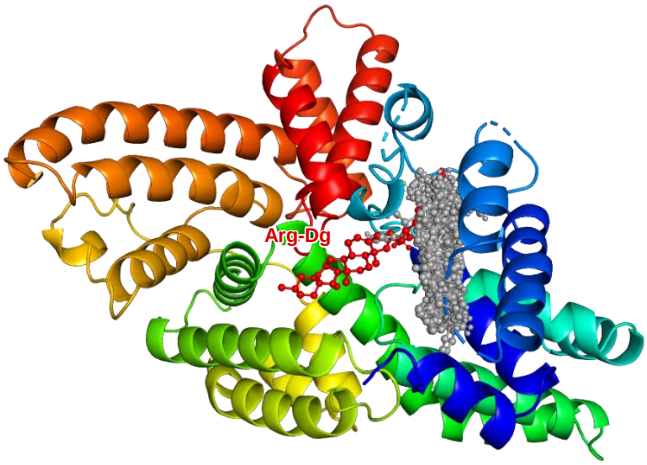


Figura 35. Superposición de EDA en VDB obtenidos con ADV. En rojo está Arg-Dg.

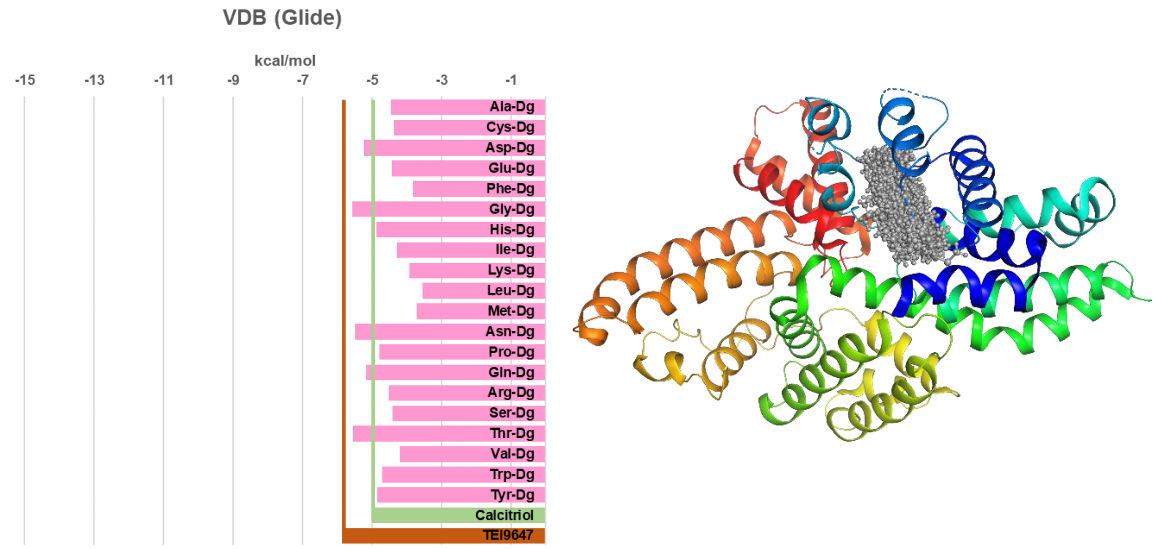


Figura 36. Comparación de EA y superposición de EDA en VDB obtenidos con Glide.

Finalmente, Glide devolvió que energéticamente los derivados Asp-Dg, Gly-Dg, Asn-Dg, Gln-Dg y Thr-Dg resultaron superiores al calcitriol y se confirmó la superposición de los EDA en el sitio activo de la diana. A comparación de los dos sistemas anteriores, el derivado Arg-Dg se sitúo dentro del sitio activo de la diana lo que también permitió corroborar la relación entre la energía de afinidad y la interacción espacial de la molécula en la diana.

3.2.4 Globulina de unión a hormonas sexuales

La globulina de unión a hormonas sexuales (SHBG) es una proteína globular sérica que se encarga del transporte y biodisponibilidad de estrógenos y andrógenos en el organismo y lleva a cabo actividades duales en el aumento de estas hormonas sexuales. Esta diana resulta de interés ya que la fuerza con la que los ligandos se unen a esta proteína es lo que regula su biodisponibilidad, y los andrógenos son los que tienen mayor afinidad por esta diana.

Los resultados obtenidos con AD4 y ADV fueron mixtos y es congruente con lo reportado en la literatura sobre la preferencia de la proteína por la DHT, andrógeno por excelencia en el sistema de AD4 y el estradiol con una energía menor. Por el contrario, la diferencia energética entre la DHT y el estradiol con ADV es de 100 cal/mol, contrariamente a la diferencia de afinidad ya reportada en la literatura científica. Aquí existe nuevamente un

elemento de discusión importante sobre la correlación que existe entre las afinidades reportadas (IC_{50} o K_d) y los valores devueltos por los sistemas ya que solamente AD4 y Glide parecen coincidir con los valores experimentales, la explicación por la cual ADV sobreestima la energía se puede explicar precisamente por su sistema de análisis, el cual generalmente devuelve las mejores poses y el estradio, al ser un ligando común para esta proteína y que efectivamente tiene buena afinidad, el sistema no tiene la capacidad de discernir entre la DHT y el estradiol, para lo cual el tercer nivel de análisis dará más información sobre este fenómeno.

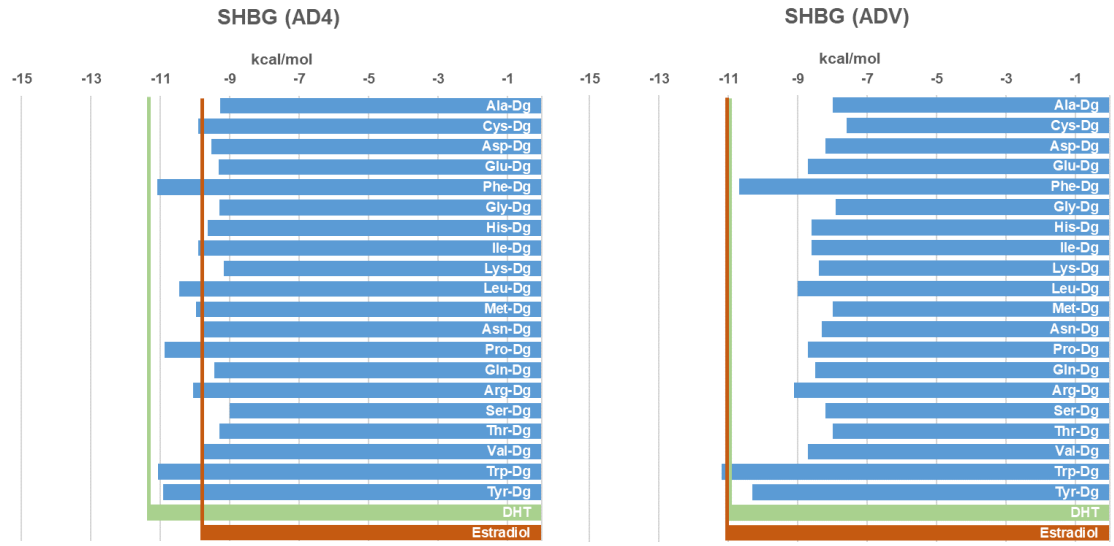


Figura 37. Energías de acoplamiento de EDA en SHBG obtenidas con AD4 y ADV respectivamente.

La superposición de los ligandos muestra que todos los EDA evaluados se situaron dentro del sitio activo de la proteína, soportando la hipótesis de que los derivados con energías superiores deberían de funcionar como bloqueadores de la proteína de transporte.

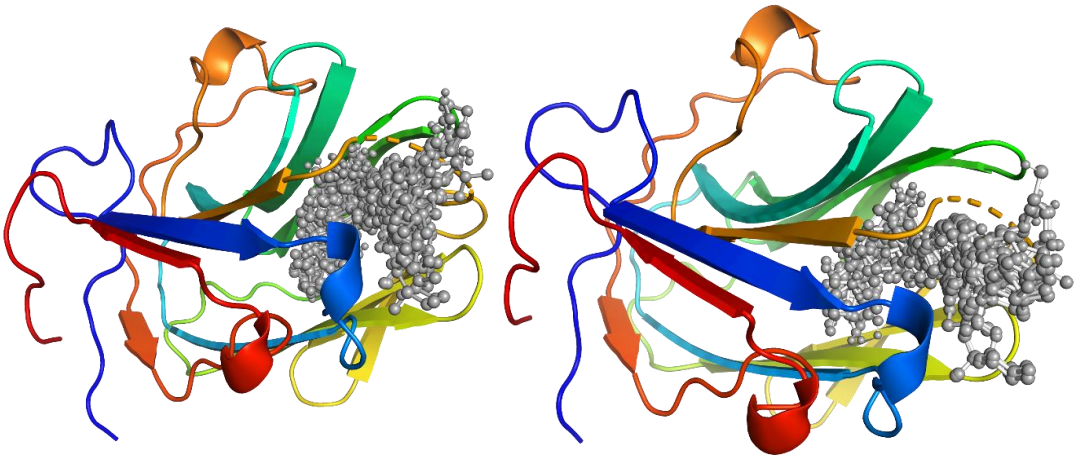


Figura 38. Superposición de EDA en el sitio activo de SHBG obtenidos con AD4 y ADV.

Con AD4 ningún EDA superó a la DHT, pero sí al estradiol, lo que podría indicar que habría selectividad de los derivados por estrógenos y no por andrógenos. Solamente inhibiría la unión de estrógenos haciéndolos más biodisponibles y no aumentando los andrógenos.

Con Glide y AD4 se obtuvieron resultados similares, mayor EA para DHT vs estradiol y ninguno de los derivados superó a las moléculas de referencia. La superposición de los ligandos es evidencia que todas las moléculas se estuvieron en el sitio de unión a ligando, no obstante, las EA no suponen que los derivados son candidatos a bloqueadores de esta proteína de transporte y por lo tanto no interfiriendo con la biodisponibilidad natural de hormonas sexuales (Figura 39).

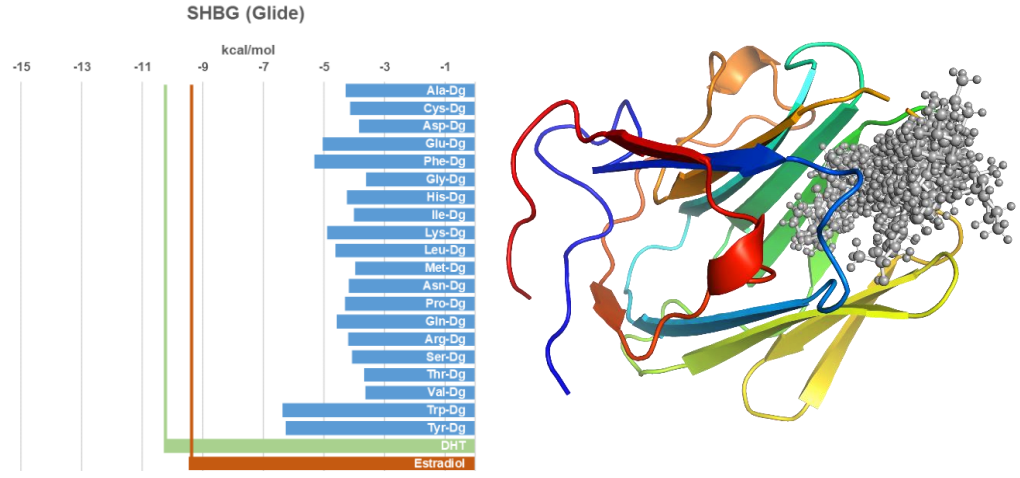


Figura 39. Comparación de EA en VDB obtenidos con Glide y superposición de EDA.

3.2.5 MARRS

Con MARRS, en AD4 y ADV se obtuvo que los compuestos EDA tienen energías superiores a la diosgenina, una molécula de referencia que se ha reportado activa a MARRS. Se comparó el efecto de la conjugación de aminoácidos con la parte esteroidal de los EDA ya que la molécula control es la base de los derivados EDA estudiados aquí.

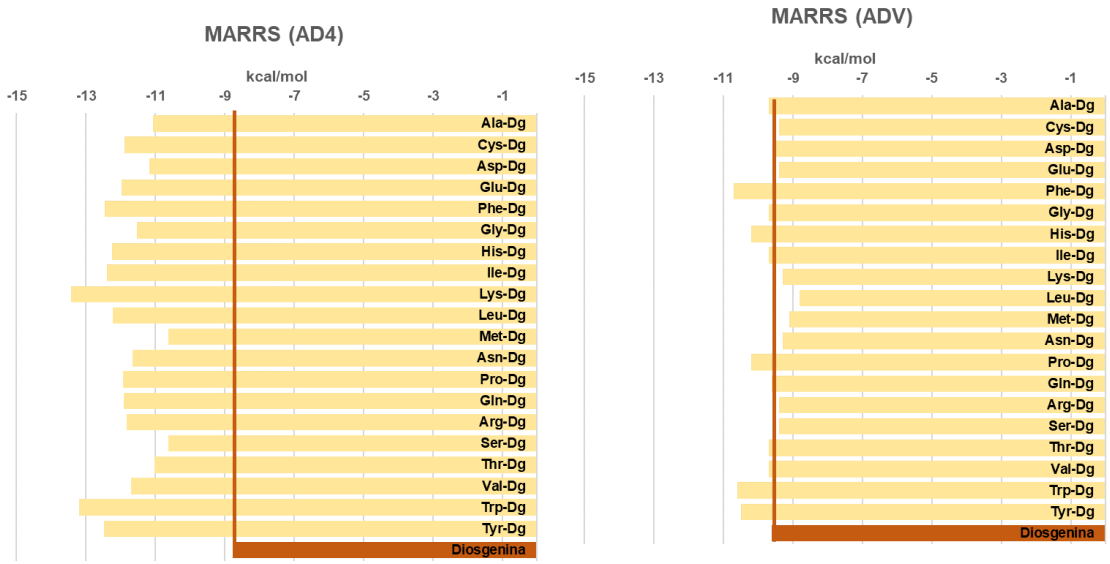


Figura 40. Energías de acoplamiento de EDA en MARRS obtenidas con AD4 y ADV, respectivamente.

La superposición de los ligandos sugiere que todos los derivados están en el sitio activo de MARRS lo que sugiere que podrían funcionar en contra de esta diana. Sin embargo, los resultados energéticos son claros, a pesar de que todos los resultados se encuentran situados prácticamente en el sitio activo, ADV no considera que todos los derivados son superiores a la diosgenina, AD4 sugiere que Lys-Dg es el mejor candidato y ADV que Phe-Dg lo es.

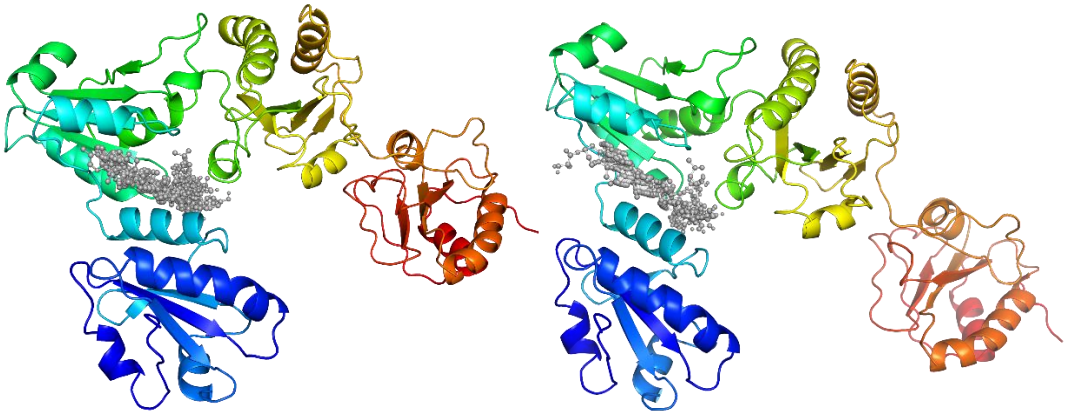


Figura 41. Superposición de EDA en MARRS obtenidos con AD4 y ADV.

A nivel energético, Glide mostró que ninguno de los derivados fue superior a pesar de que todos los derivados se encontraron en el sitio activo. Se obtuvo que Glide estimó mejor la relación entre el sitio activo y la afinidad de la molécula por la diana por lo que se concluye que tan solo algunos derivados logran la categoría de VP

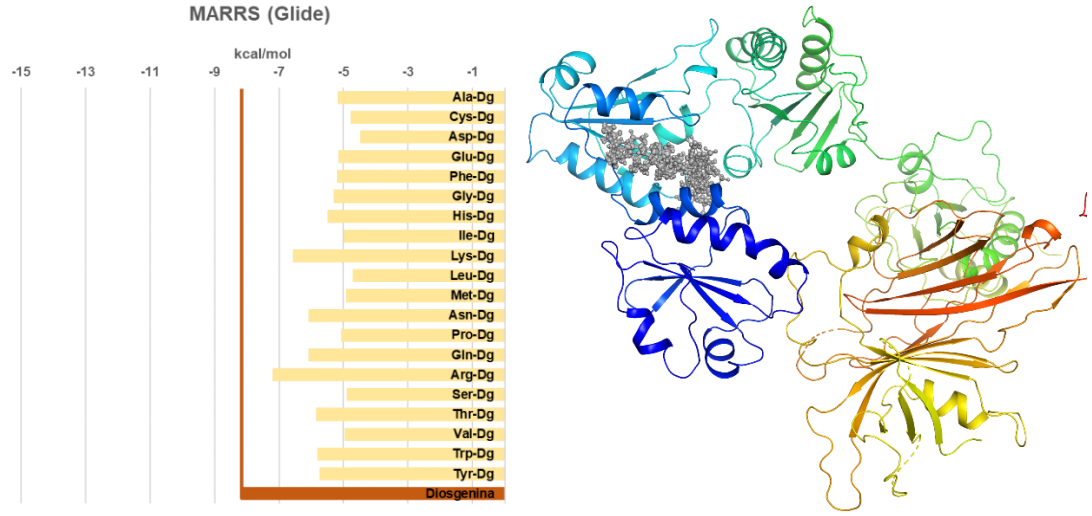


Figura 42. Comparación de EA y superposición de EDA en MARRS obtenidos con Glide.

3.3 Tercer nivel de análisis: interacciones ligando-proteína

Las moléculas dentro del sitio activo sugieren que existe interacción de la molécula con la diana, sin embargo, no da información con respecto a su activación, inhibición,

antagonismo, agonismo entre todas las actividades posibles que puede ejercer una molécula en la diana. Se requieren análisis de las interacciones particulares entre el ligando y la proteína y determinar el potencial de las moléculas en sus dianas biológicas. Los resultados energéticos y posicionales, además de los criterios diagnósticos establecidos sugieren que las mejores moléculas a analizar son las siguientes (tabla 14).

Tabla 14. Diagnóstico con base en los 3 sistemas usados.

	Ala-Dg	Cys-Dg	Asp-Dg	Glu-Dg	Phe-Dg	Gly-Dg	His-Dg	Ile-Dg	Lys-Dg	Leu-Dg	Met-Dg	Asn-Dg	Pro-Dg	Gln-Dg	Arg-Dg	Ser-Dg	Thr-Dg	Val-Dg	Trp-Dg	Tyr-Dg
5αR	VP	VP	VP	VP	VP	VP	VP	VP	VP	VP	VP	VP	VP	VP	VP	VP	VP	VP	VP	VP
AR	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN
CYP17A1	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN
CYP19A1	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN
ERα	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN
ERβ	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN
PR	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN
VDB	VP	VN	VP	VN	VP	VP	VP	VP	VP	VP	VN	VP	VP	VP	VN	VP	VP	VP	VP	VP
VGEFR2	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VP	VN
GR	VP	VP	VP	VP	VP	VP	VP	VP	VP	VP	VP	VP	VP	VP	VP	VP	VP	VP	VP	VP
CYP11A1	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VP	VN	VP	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN
CYP21A2	VP	VP	VP	VP	VP	VP	VP	VP	VP	VP	VP	VP	VP	VP	VP	VP	VP	VP	VP	VP
MR	VP	VP	VP	VP	VP	VP	VP	VP	VP	VP	VP	VP	VP	VP	VP	VP	VP	VP	FN	FN
SHBG	VP	VP	VP	VP	VP	VP	VP	VP	VP	VP	VP	VP	VP	VP	VP	VP	VP	VP	VP	VP
MARRS	VP	VN	VN	VN	VP	VP	VP	VP	VN	VN	VN	VN	VP	VN	VN	VN	VP	VP	VP	VP
VDR	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN

VP: Verdadero Positivo VN: Verdadero Negativo FP: Falso Positivo FN: Falso Negativo

Comparado con los ligandos endógenos, los EDA tienen potencial acción en la 5αR, VDB y SHBG para aumentar la biodisponibilidad de estrógenos y en contra del receptor MARRS. En el caso de CYP11A1, los derivados que no inhiben a esta enzima son los de Leu-Dg y Asn-Dg, todos los demás son potenciales inhibidores (Tabla 15).

Tabla 15. Diagnóstico con base en los 3 sistemas evaluados.

	Ala-Dg	Cys-Dg	Asp-Dg	Glu-Dg	Phe-Dg	Gly-Dg	His-Dg	Ile-Dg	Lys-Dg	Leu-Dg	Met-Dg	Asn-Dg	Pro-Dg	Gln-Dg	Arg-Dg	Ser-Dg	Thr-Dg	Val-Dg	Trp-Dg	Tyr-Dg
5αR	VP	VN	VP	VP	VP	VP	VP	VP	VN	VN	VN	VP	VP	VP	VP	VN	VN	VN	VP	VP
AR	VN	FP	FP	FP	FP	VN	FP	FP	FP	FP	FP	FP	FP	FP	FP	FP	FP	FP	VN	FP
CYP17A1	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN
CYP19A1	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN
ERα	VN	VN	VN	VN	VN	VN	FP	FP	FP	FP	VN	VN	VN	VN	FP	VN	VN	VN	FP	FP
ERβ	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN
PR	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN
VDB	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN
GR	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN
CYP11A1	VP	VP	VP	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VP	VN	VP	VP	VP	VN	VN
CYP21A2	VP	VP	VP	VP	FN	VP	VP	VP	VP	VP	VP	VP	FN	VP	VP	VP	VP	VP	VP	FN
MR	VP	VP	VP	VP	VP	VP	VP	VP	VP	VP	VP	VP	VP	VP	VP	VP	VP	VP	VP	VP
VDR	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN	VN

VP: Verdadero Positivo VN: Verdadero Negativo FP: Falso Positivo FN: Falso Negativo

Para que una nueva molécula sea candidato a fármaco, no solamente debe de funcionar de manera similar (o mejor) a las moléculas endógenas que interactúan con la diana, también deberían superar a estas moléculas. Para este caso, de las dianas evaluadas, la menor cantidad de compuestos superaron la energía de finasterida, el fármaco de referencia de la 5αR; en VDB ninguna molécula superó al análogo sintético de vitamina D, TEI9647.

3.3.1 5α-reductasa

El sitio activo de la 5α-reductasa está conformado por un "pocket" hidrofóbico (esencial en la unión de los ligandos androgénicos de dicha naturaleza) y residuos catalíticos involucrados en la transferencia de hidruro en el C_2 del inhibidor y la formación de un enlace covalente entre el cofactor NADPH y el inhibidor. El primer residuo esencial en la inhibición es Phe118**,** el cual actúa directamente en la unión de la testosterona, así como los residuos Glu57 y Arg114 con interacciones polares en la unión de la finasterida. El sitio de unión del cofactor es conservado, mientras que el sitio de unión al ligando esteroidal

no. La Tyr91 interactúa directamente con el carbonilo C_3 de la testosterona que polariza al carbonilo y facilita la transferencia de hidruro del NADPH hacia el C_5 (104).

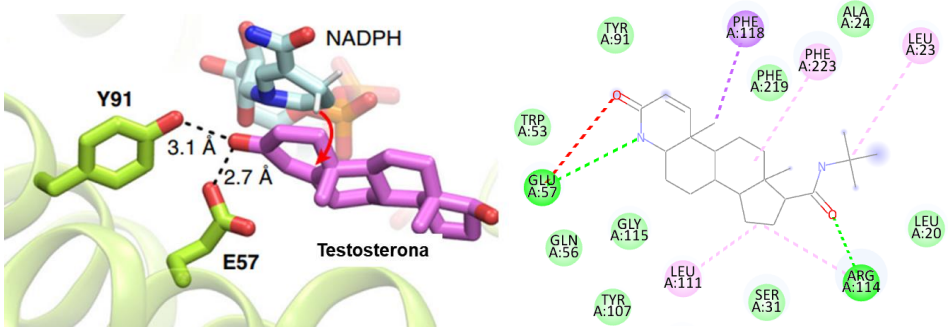


Figura 43. Interacciones críticas de testosterona y finasterida en 5αR.

Se procedió a evaluar los mejores resultados energéticos situados dentro del sitio activo, en donde se observó con AD4 que Trp-Dg interactúa directamente con el residuo catalítico Glu57 por puente de hidrógeno con el grupo amino del fragmento aminoacídico del compuesto EDA, interacción similar a la que se encuentra en el inhibidor de referencia. También, Tyr91 interactúa con el carbonilo del éster mediado por un puente de hidrógeno, el cual está involucrado en la unión del carbonilo de C_3 de testosterona. La Arg 114 se encuentra ausente en la interacción, pero Phe118 se encuentra principalmente entre la unión del núcleo esteroidal con el aminoácido, esto debido a la conformación que toma el derivado dentro del sitio activo, explicada en parte, por la interacción **π-π** "T-shaped" entre el anillo aromático del indol y el C-19 de la diosgenina.Escriba aquí la ecuación.

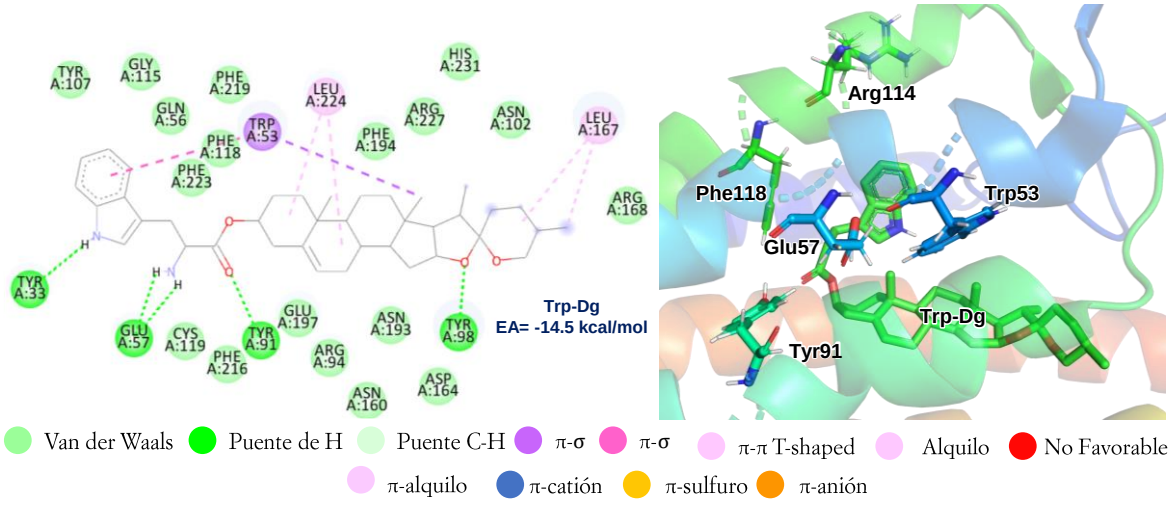


Figura 44 Interacciones ligando-proteína de Trp-Dg en 5αR obtenidas con AD4.

Por su parte, ADV no muestra interacciones directas con ninguno de los aminoácidos involucrados en la inhibición de la actividad enzimática de la proteína estudiada. Por los residuos Phe118, Glu57 protonado por el sistema de evaluación, además la Arg114 y Tyr91 confirmó que el derivado se encuentra en el sitio activo, aunque el espiroacetal de la diosgenina se orienta hacia los residuos catalíticos. Estructuralmente se observó que el fragmento aminoacídico se encontró orientado hacia las hélices α exteriores de la proteína sin sufrir el plegamiento del indol sobre la cara β del esteroide.

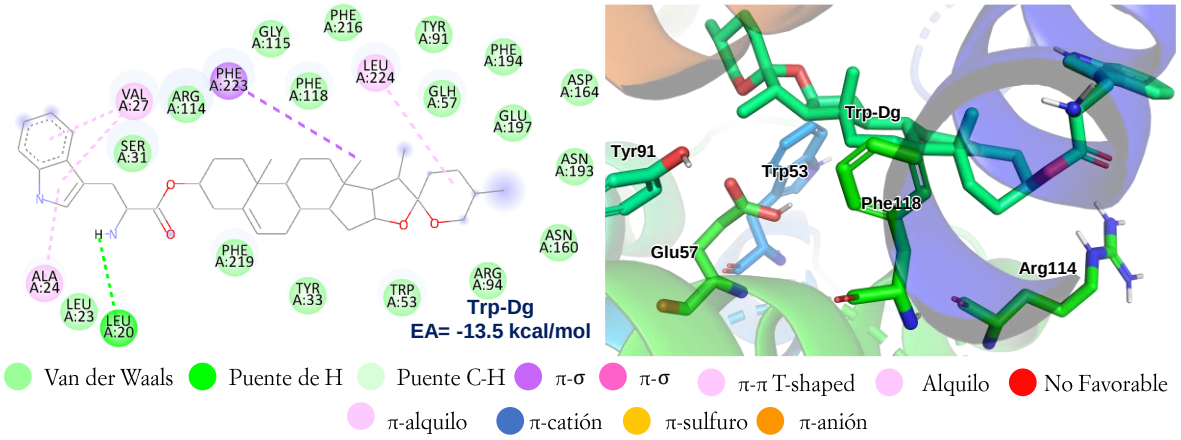


Figura 45. Interacciones ligando-proteína de Trp-Dg en 5αR obtenidas con ADV.

Por Glide se obtuvo que Trp-Dg, sin ser el compuesto más energético, el residuo catalítico Glu57 interaccionó por puente salino entre el grupo amino del fragmento de aminoácido del EDA. Es importante el análisis de este resultado ya que Glide también evalúa potenciales confórmeros y estados de protonación, considerando que, al pH probado el grupo amino se encontrará protonado causando la interacción electrostática de carga opuesta que se observó. Por su parte, Arg114 tiene interacción directa con el anillo piránico de la diosgenina mediante puente de hidrógeno con el grupo guanidino del residuo.

El resto de los residuos catalíticos no tienen interacción directa con el compuesto, sin embargo, se encontraron cerca del EDA. Tyr91 se encontró cerca del grupo amino y Trp53 del indol del fragmento de aminoácido. Phe118 también se encontró en cercanía del anillo A y B de la diosgenina por la cara β del aminoácido.

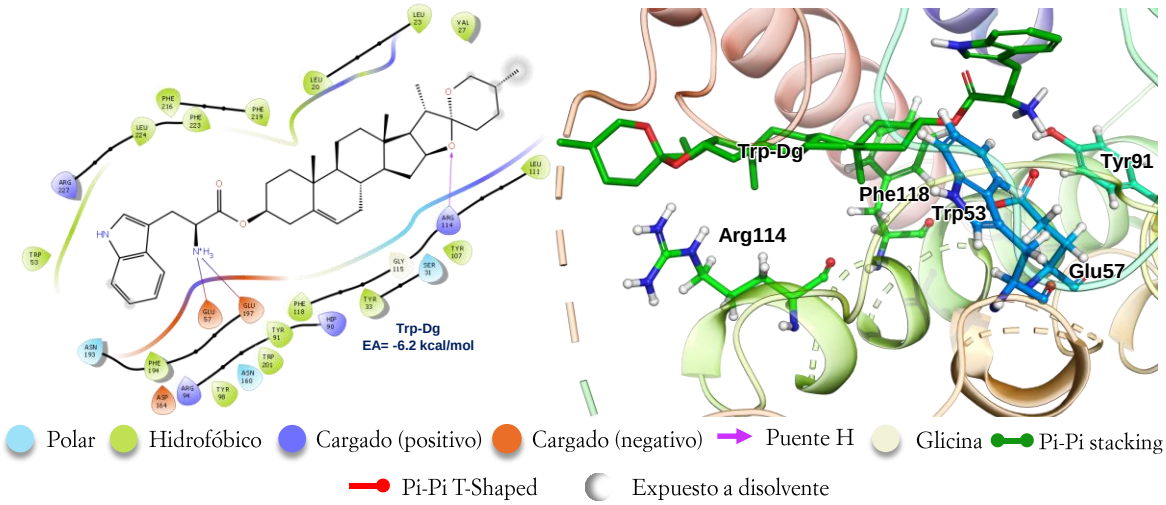


Figura 46. Interacciones del derivado Trp-Dg en 5αR obtenidas con Glide.

También se llevó a cabo la comparación de todos los derivados, resumiendo en la Tabla 16. Se muestra la cantidad de aminoácidos catalíticos importantes que interactúan en cada sistema.

Tabla 16. Interacciones esenciales y EA de los EDA en 5αR con ADV.

EDA	Interacción ligando-proteína	EA	EDA	Interacción ligando-proteína	EA	EDA	Interacción ligando-proteína	EA	EDA	Interacción ligando-proteína	EA
Ala-Dg	Arg114	-12.4	Gly-Dg	Arg114	-12	Met-Dg	Arg114	-11.4	Ser-Dg	Phe118, Trp53, Arg114	-11.1
Cys-Dg	Arg114	-11.6	His-Dg	Arg114	-12.6	Asn-Dg	Arg114	-12.1	Thr-Dg	Arg114	-11.4
Asp-Dg	Arg114	-11.7	Ile-Dg	Arg114	-12.3	Pro-Dg	Arg114	-13.3	Val-Dg	Glu57, Trp53, Arg114	-11.5
Glu-Dg	Arg114	-11.7	Lys-Dg	Arg114	-11.5	Gln-Dg	Arg114, Phe 118, Glu57, Tyr91	-11.8	Trp-Dg	---	-13.5
Phe-Dg	Arg114, Trp53, Phe118, Glu57	-12.4	Leu-Dg	Phe118, Glu57	-11.4	Arg-Dg	Arg114	-12.2	Tyr-Dg	Arg114	-12.3

Tabla 17. Interacciones esenciales y EA de los EDA en 5αR obtenidas con AD4.

EDA	Interacción ligando-proteína	EA	EDA	Interacción ligando-proteína	EA	EDA	Interacción ligando-proteína	EA	EDA	Interacción ligando-proteína	EA
Ala-Dg	Trp53	-12.2	Gly-Dg	Tyr91	-11.7	Met-Dg	Trp53, Tyr91, Glu57, Phe118	-11.5	Ser-Dg	Phe118	-12.8
Cys-Dg	---	-11.3	His-Dg	Trp53, Glu57	-11.9	Asn-Dg	Trp53, Glu57, Tyr91	-12.2	Thr-Dg	Arg114	-11.8
Asp-Dg	Arg114	-11.9	Ile-Dg	Trp53,	-12.7	Pro-Dg	Arg114	-12.3	Val-Dg	Arg114, Glu57, Trp53	-12.0
Glu-Dg	Trp53, Phe118	-12.2	Lys-Dg	Trp53, Arg114, Tyr91, Phe118, Glu57	-11.4	Gln-Dg	Arg114, Phe118, Glu57, Trp53	-12.1	Trp-Dg	Glu57, Tyr91, Trp53	-14.5
Phe-Dg	Trp53, Arg114	-13.2	Leu-Dg	Tyr91, Trp53	-14.0	Arg-Dg	Glu57, Tyr91, Arg114, Trp53	-12.2	Tyr-Dg	Arg114, Trp53, Glu57	-13.5

Tabla 18. Interacciones esenciales y EA de los EDA en 5αR obtenidas con Glide.

EDA	Interacción ligando-proteína	EA	EDA	Interacción ligando-proteína	EA	EDA	Interacción ligando-proteína	EA	EDA	Interacción ligando-proteína	EA
Ala-Dg	Glu57, Arg114	-6.3	Gly-Dg	Arg114	-5.4	Met-Dg	Glu57	-6.2	Ser-Dg	Arg114	-4.8
Cys-Dg	Glu57, Tyr91	-6.2	His-Dg	Glu57	-6.6	Asn-Dg	Arg114, Tyr91	-6.5	Thr-Dg	Glu57, Arg114	-5.7
Asp-Dg	Arg114	-5.5	Ile-Dg	Glu57	-5.5	Pro-Dg	Glu57	-5.5	Val-Dg	Glu57	-4.9
Glu-Dg	Arg114	-5.7	Lys-Dg	Glu57, Arg114	-6.8	Gln-Dg	Arg114	-5.6	Trp-Dg	Glu57, Arg114	-6.2
Phe-Dg	Glu57, Arg114	-6.5	Leu-Dg	Glu57, Arg114	-5.9	Arg-Dg	Glu57, Arg114, Trp53	-7.3	Tyr-Dg	Glu57, Arg114	-6.6

3.3.2 Enzima CYP11A1

La enzima CYP11A1 utiliza 3 pasos catalíticos secuenciales para la ruptura de la cadena lateral del colesterol y su transformación a pregnenolona. La cadena lateral alifática se

encuentra centrada sobre el grupo hemo además de interaccionar directamente con los residuos Ile351, Thr291, Met201 y Phe202. La cara α del sustrato colestánico está rodeada por Trp87. Por su parte, la cara β la rodean Gln356, Thr354, Val353 y Ser352 (39).

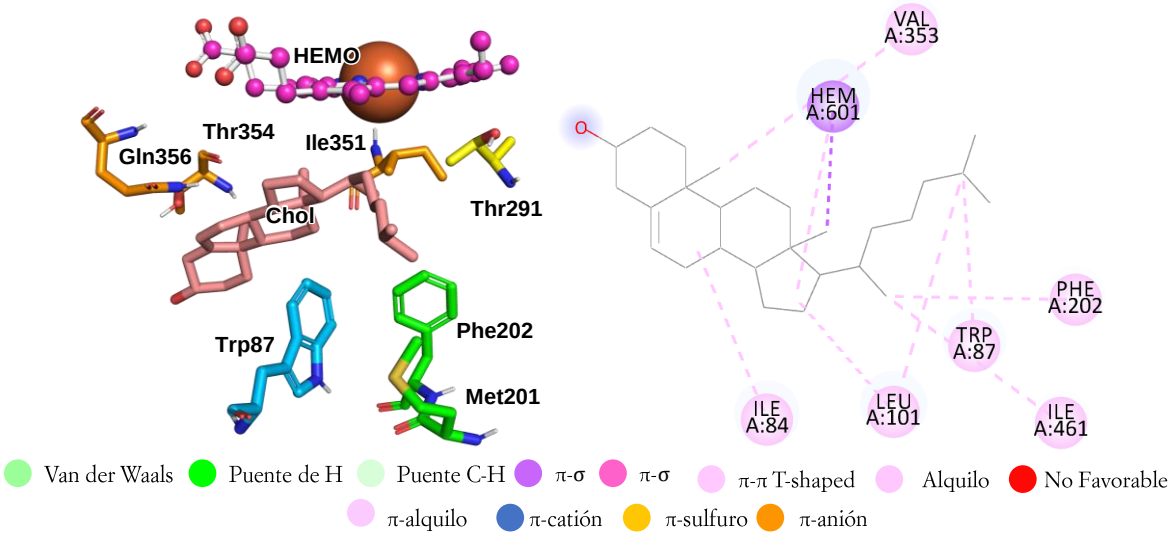


Figura 47. Interacciones críticas del colesterol en la enzima CYP11A1.

La mayoría de las interacciones son de tipo no polares o covalentes, por lo que, si los derivados EDA interactúan con mayor fuerza con estos residuos o directamente con el grupo hemo, estarán actuando como inhibidores.

Tabla 19. Interacciones esenciales y EA de los EDA en la enzima CYP11A1 obtenidas con ADV.

EDA	Interacción ligando-proteína	EA	EDA	Interacción ligando-proteína	EA	EDA	Interacción ligando-proteína	EA	EDA	Interacción ligando-proteína	EA
Ala-Dg	Val353, hemo	-13.1	Gly-Dg	Val353, hemo	-12.7	Met-Dg	Phe202, Trp87, hemo	-12.3	Ser-Dg	Val353, hemo	-12.3
Cys-Dg	hemo	-12.2	His-Dg	Met201, hemo	-13.5	Asn-Dg	Val353, hemo	-13	Thr-Dg	Val353, hemo	-12.8
Asp-Dg	Met201, hemo	-12.6	Ile-Dg	hemo	-13.2	Pro-Dg	hemo	-13.8	Val-Dg	hemo	-12.6
Glu-Dg	Trp87, hemo	-12.7	Lys-Dg	Phe202, Trp87, hemo	-12.3	Gln-Dg	hemo	-12.8	Trp-Dg	Met201, Phe202 hemo	-15.2

Phe-Dg	hemo	-14.0	Leu-Dg	Trp87, hemo	-12.9	Arg-Dg	hemo	-13	Tyr-Dg	hemo	-13.9

Los dos derivados con mayor energía de afinidad en la proteína interactúan directamente con el grupo hemo pero con diferente tipo de interacción. Trp-Dg presentó varias interacciones polares y no polares con residuos claves del sitio activo y con aminoácidos cercanos a este. El grupo hemo se encontró posicionado sobre el fragmento de triptófano del EDA por medio de unión π-σ y tipo alquilo entre el CH_2 contiguo al C-α del aminoácido y el anillo A junto al anillo del indol del compuesto EDA. El otro aminoácido esencial en el sitio activo fue Met201, con el ligando endógeno tuvo interacciones no polares, mientras que con Trp-Dg se presentó uniones π-azufre en el anillo indólico y la cadena lateral de la Met. Otras interacciones con este anillo de tipo alquilo fueron con Ala286 y en el espiroacetal fueron con Leu209, Phe82 y Val57 (Figura 48).

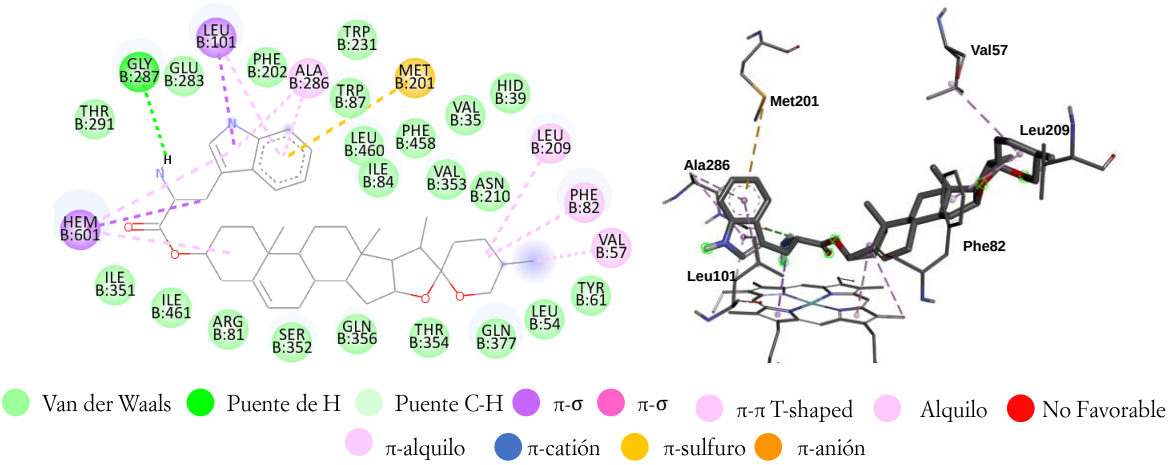


Figura 48. Interacciones ligando-proteína de Trp-Dg en la enzima CYP11A1 obtenidas con ADV.

Phe-Dg presentó una interacción hemo-ligando de naturaleza alquilo entre el anillo A del fragmento esteroidal y el metilo y con el anillo pirrólico del grupo prostético. Por otro lado, Leu101 y Ala286 tuvieron enlaces tipo π-σ y tipo alquilo, respectivamente entre el anillo aromático del fragmento aminoacídico con estos dos aminoácidos polares.

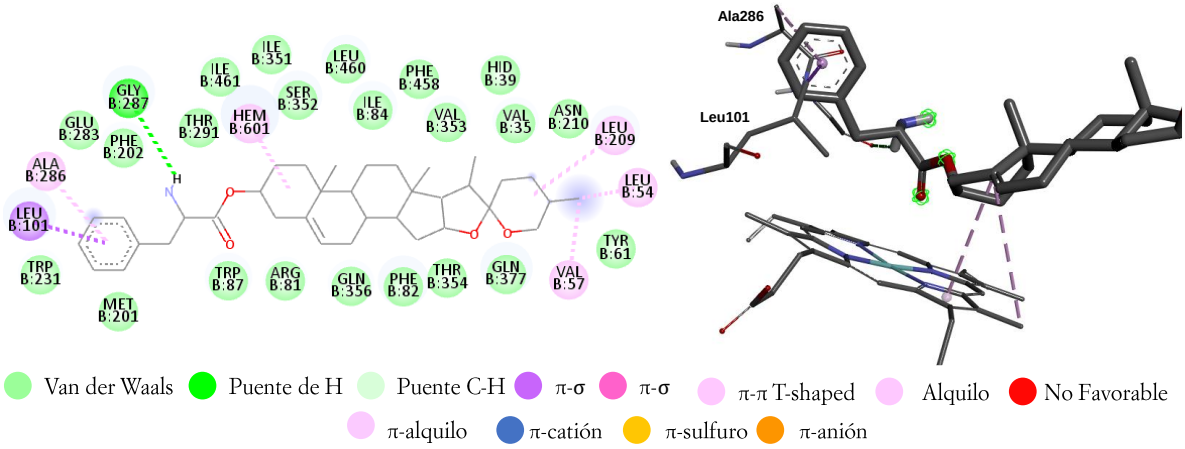


Figura 49. Interacciones ligando-proteína de Phe-Dg en la enzima CYP11A1 obtenidas con ADV.

Tabla 20. Interacciones esenciales y EA de los EDA en la enzima CYP11A1 obtenidas con AD4.

EDA	Interacción ligando-proteína	EA	EDA	Interacción ligando-proteína	EA	EDA	Interacción ligando-proteína	EA	EDA	Interacción ligando-proteína	EA
Ala-Dg	Val353, hemo	-9.9	Gly-Dg	Val353, hemo	-9.6	Met-Dg	Val353, hemo	-8.9	Ser-Dg	Val353, hemo	-9.6
Cys-Dg	Val353, Thr354, hemo	-9.6	His-Dg	---	-7.8	Asn-Dg	Val353, hemo	-8.4	Thr-Dg	Ile84, hemo	-9.2
Asp-Dg	Val353, hemo	-10.1	Ile-Dg	hemo	-9.5	Pro-Dg	Val353, hemo	-9.4	Val-Dg	hemo	-9.7
Glu-Dg	*Thr291, hemo	-9.1	Lys-Dg	Val353, hemo	-9.3	Gln-Dg	hemo	-8.6	Trp-Dg	*Thr291, Trp87, hemo	-10.8
Phe-Dg	Phe202, hemo	-10.5	Leu-Dg	Trp87, hemo	-9.3	Arg-Dg	hemo	-8.3	Tyr-Dg	Ile351, hemo	-10.7

* no favorable, ---: no interacciona

Por medio de AD4 se tuvo diferencia energética con el control mucho menor que con ADV. Con el análisis interaccional se observó que este sistema no plegó el fragmento de Trp sobre la cara β del esteroide, esto influyó en la interacción de la molécula con la proteína, ya que una interacción de residuos importante para la inhibición es Thr291, la cual devolvió que hubo interacción no favorable por la cercanía de 2.53 Å de los protones

polares de la Thr con el NH_2 del EDA. No obstante, hay interacciones fuertes con Gly287 mediado por puente de hidrógeno y, esencial para la interacción del carbonilo del éster con el átomo de Fe^{2+} de hemo y π-π "T-shaped" con el indol indicando que Trp-Dg tiene muy altas probabilidades de funcionar como un inhibidor potente al interactuar con el sitio catalítico y que la funcionalización con Trp es esencial. Otras interacciones importantes son los de Trp87 y Leu101 π-π "stacked" y π-σ con el sistema de indol. Por su parte, el espiroacetal también interactúa en los residuos que forman la cavidad de la enzima por Phe82, Leu209 y Val57 con interacciones de tipo no polar.

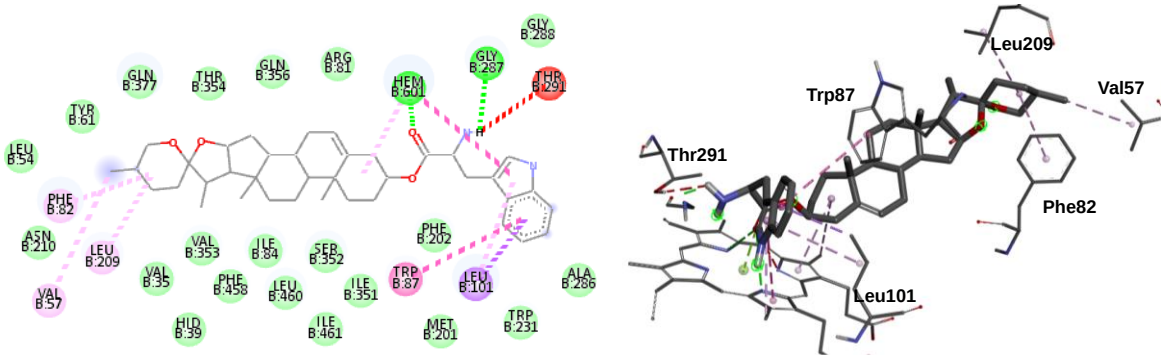


Figura 50. Interacciones ligando-proteína de Trp-Dg en la enzima CYP11A1 obtenidas con AD4.

El segundo mejor compuesto fue Tyr-Dg por tener mayor cantidad de interacciones fuertes mediadas por puentes de hidrógeno. El hidroxilo aromático de la molécula interaccionó con Glu283 y con el NH_2 de Gly287. La interacción más importante fue con el grupo hemo interaccionando de manera similar con el carbonilo del éster tanto por puente de hidrógeno con el heteroátomo del pirrol y directamente con el átomo de Fe^{2+} coordinándose con el par electrónico del carbono, así como con el anillo aromático mediada por unión π-π "T-shaped" indicando que el EDA podría ser un potencial inhibidor de esta enzima. Otras interacciones no polares están mediadas por Leu209, Val57, Phe82 e Ile351 (Figura 54).

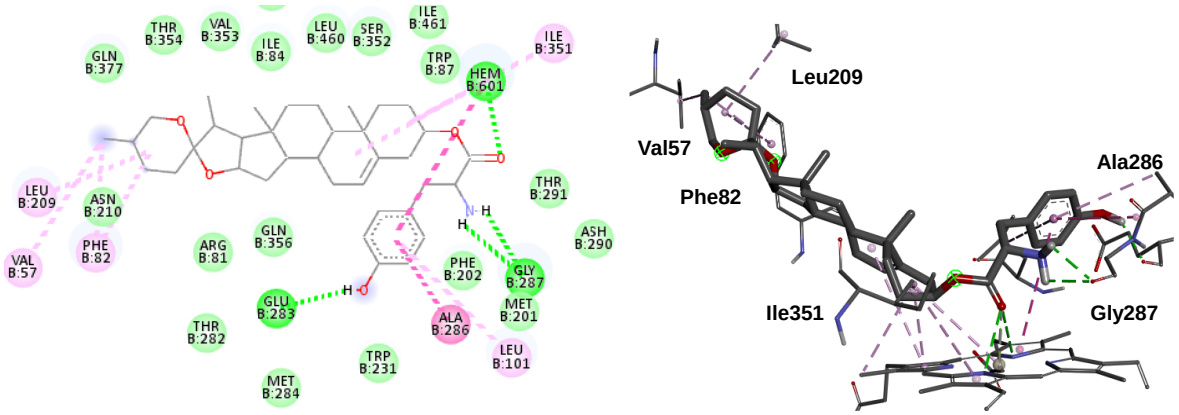


Figura 51. Interacciones ligando-proteína de Tyr-Dg en la enzima CYP11A1 obtenidas con AD4.

Finalmente, para corroborar si los resultados obtenidos concuerdan con la posición de los compuestos en los sitios de interés y con los aminoácidos esenciales se construyeron curvas ROC. Se calculó el área bajo la curva AUC que permitió determinar la sensibilidad y especificidad de estos 3 sistemas.

El análisis particular de las interacciones devueltas por el sistema Glide permitieron determinar cuántos residuos críticos estaban interactuando directamente con las moléculas evaluadas. La principal diferencia con los dos sistemas anteriores es la que podemos observar con la ausencia de interacción del EDA que AD4 y ADV había demostrado como mejor candidato, esto posiblemente debido al tamaño de la cadena lateral del fragmento aminoacídico.

Tabla 21. Interacciones esenciales y EA de los compuestos EDA en la enzima CYP11A1 obtenidas con Glide.

EDA	Interacción ligando-proteína	EA	EDA	Interacción ligando-proteína	EA	EDA	Interacción ligando-proteína	EA	EDA	Interacción ligando-proteína	EA
Ala-Dg	---	-9.1	Gly-Dg	hemo	-9.6	Met-Dg	hemo	-10.2	Ser-Dg	hemo	-9.4
Cys-Dg	hemo	-8.9	His-Dg	---	-9.6	Asn-Dg	---	-8.9	Thr-Dg	---	-10.0
Asp-Dg	---	-8.6	Ile-Dg	---	-7.8	Pro-Dg	---	-9.4	Val-Dg	---	-9.7
Glu-Dg	hemo	-9.5	Lys-Dg	Trp87, hemo	-11.2	Gln-Dg	---	-10.3	Trp-Dg	---	---

Phe-Dg	hemo	-12.0	Leu-Dg	---	-7.8	Arg-Dg	hemo	-10.3	Tyr-Dg	---	-9.9

---: no interacciona

El EDA con la mayor diferencia de EA con la molécula de control es la Lys-Dg que presentó interacción electrostática mediada por los electrones π de Trp87 contra el grupo amino de la cadena lateral del EDA. La interacción más importante para determinar el potencial inhibitorio del derivado Lys-Dg fue la interacción con el átomo de Fe^{2+}.

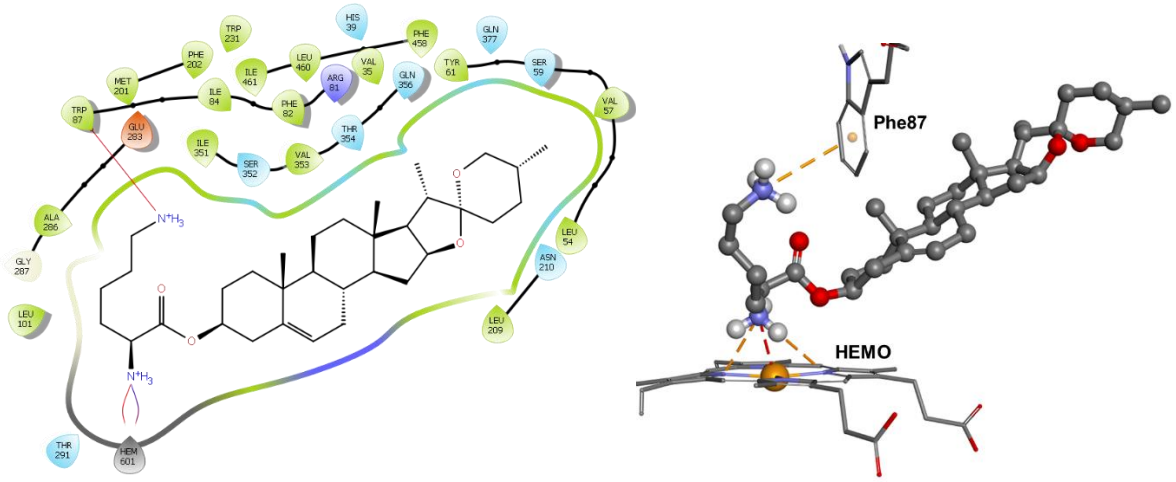


Figura 52. Interacciones ligando-proteína de Tyr-Dg en la enzima CYP11A1 obtenidas con Glide.

El grupo amino del carbono α se orientó directamente sobre el centro del grupo prostético uniéndose por 2 tipos de enlace, la de tipo π-catión sobre los protones del $R\text{-}NH_3^+$ con el sistema π de la porfirina y el "salt bridge" entre el nitrógeno y el átomo de hierro. Es importante mencionar que en Glide, es el único derivado que interacciona con un residuo de todos los considerados e importante para la inhibir la enzima. El derivado Phe-Dg por su parte, es el segundo derivado con mejor energía.

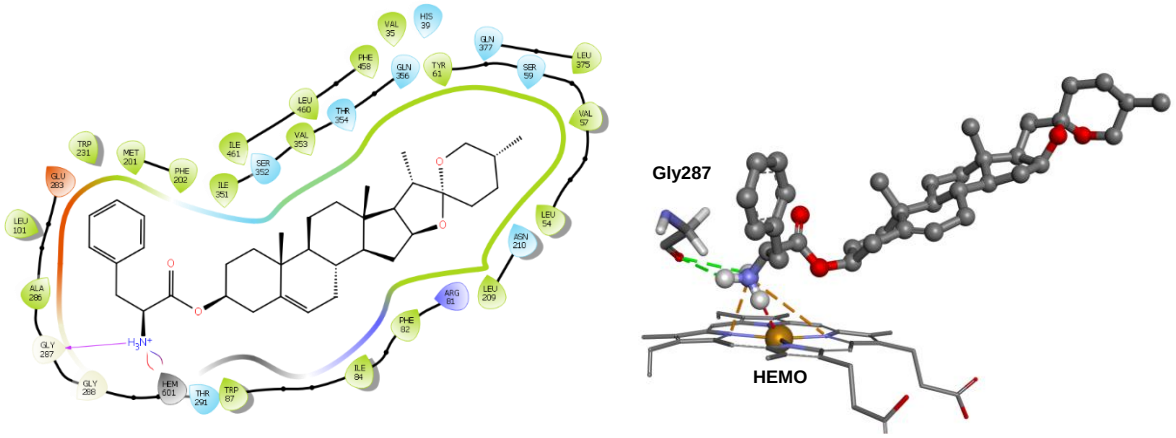


Figura 53 Interacciones ligando-proteína de Phe-Dg en la enzima CYP11A1 obtenidas con Glide.

Se observaron dos interacciones, la mediada por un puente de hidrógeno entre el carbonilo del enlace peptídico de Gly287 y los protones del grupo amino del EDA. Además, y de manera similar al de Lys-Dg se encontraron interacciones de tipo π-catión sobre los protones del NH_3^+ con el sistema π de la porfirina y el "salt bridge" entre el nitrógeno y Fe^{2+}.

El análisis previo indicó que dos compuestos podrían no ser inhibidores de esta enzima (Tabla 14). Sin embargo, los derivado Leu-Dg y Asn-Dg estuvieron dentro del sitio activo con energías de afinidad que no superaron al ligando endógeno, por lo que el análisis de la interacción puede dar más información de la posibilidad de los compuestos de ser inhibidores o no.

Tabla 22. Interacciones y ΔEA los compuestos EDA vs ligando de referencia de Leu-Dg y Asn-Dg.

	Leu-Dg		Asn-Dg	
	ΔEA	Interacciones	ΔEA	Interacciones
AutoDock 4	0	Trp87, hemo	-1.1	Val353, hemo
AutoDock Vina	1.2	Trp87, hemo	1.3	Val353, hemo
Glide	1.5	---	0.4	---

3.3.3 Globulina de unión a vitamina D

Es aceptado al reducir la expresión de la globulina de unión a la vitamina D afecta la biodisponibilidad de la vitamina. Sin embargo, la inhibición reversible puede aumentarla. El sitio de unión de esta diana está formado por residuos como Thr55 y Ser79 con puentes

de hidrógeno. El resto de los aminoácidos se presentó como interacciones no polares (tipo alquilo o π-alquilo) con los residuos Tyr32, Leu47, Val51, His89 y Met107 (Tabla 23).

Tabla 23. Interacciones esenciales y EA de los compuestos EDA en VDB obtenidas con AD4.

EDA	Interacción ligando-proteína	EA	EDA	Interacción ligando-proteína	EA	EDA	Interacción ligando-proteína	EA	EDA	Interacción ligando-proteína	EA
Ala-Dg	Ser79, Met107	-9.5	Gly-Dg	Ser79, Met107, Thr55	-9.3	Met-Dg	His89, Met107, Tyr32, Val51	-9.4	Ser-Dg	His89, Ser79, Met107	-10.0
Cys-Dg	Ser79, His89, Met107	-9.1	His-Dg	Ser79, His89, Val51, Met107	-10.1	Asn-Dg	Leu47, Val51,	-9.1	Thr-Dg	Met107	-9.7
Asp-Dg	His89, Met107	-9.0	Ile-Dg	Ser79, His89, Met107, Val51, Thr55	-10.3	Pro-Dg	His89, Met107	-10.1	Val-Dg	Val51, Met107	-9.6
Glu-Dg	---	-8.9	Lys-Dg	His89, Met107, Thr55	-10.1	Gln-Dg	---	-9.3	Trp-Dg	Ser79, Met107,	-10.5
Phe-Dg	His89	-9.9	Leu-Dg	Leu47, His89	-9.6	Arg-Dg	---	-9.3	Tyr-Dg	Leu47, His89	-10.3

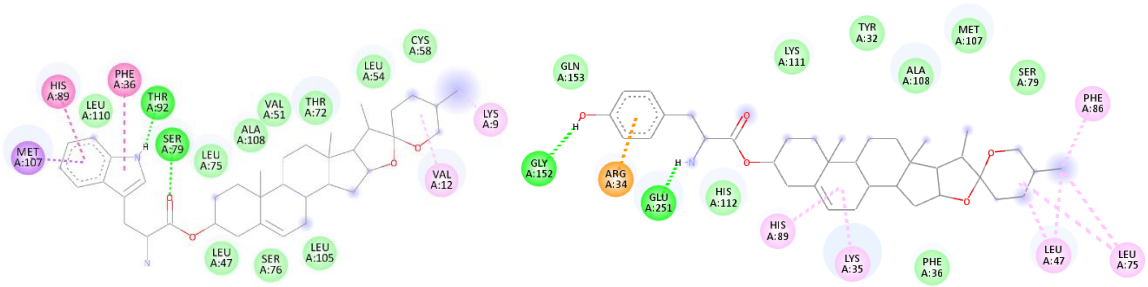


Figura 54. Interacciones ligando-proteína de Trp-Dg y Tyr-Dg en VDB obtenidas con AD4 y ADV.

Con AD4, el mejor EDA fue Trp-Dg, se llevó a cabo la confirmación de posicionamiento sobre el sitio activo para después determinar el papel del EDA sobre la diana. El análisis de interacciones arrojó que el fragmento aminoacídico es clave en el acoplamiento con la proteína, ya que existen interacciones π-π "T-shaped" entre el anillo aromático de indol con His89, así como π-σ con Met107. Phe36 también presentó interacción similar a la de His89, específicamente con el anillo de 5 miembros heteroaromático. Las interacciones más fuertes fueron las que se presentaron entre Thr92 con el NH del indol y Ser79 con el carbonilo del éster. Ambos fueron puentes de hidrógeno mostrando que el aminoácido es

clave para la interacción molecular. Por su parte, Tyr-Dg tiene 2 interacciones de gran fuerza mediadas por puente de hidrógeno: el primero entre Gly152 y el hidroxilo aromático; el segundo entre Glu251 y los protones polares del grupo NH_2, también una interacción π-catión directamente entre el anillo aromático del fragmento aminoacídico y la Arg34. Como se mencionó anteriormente, se investigó si la inhibición era reversible sin embargo hubo varias interacciones fuertes lo que reducen esa probabilidad.

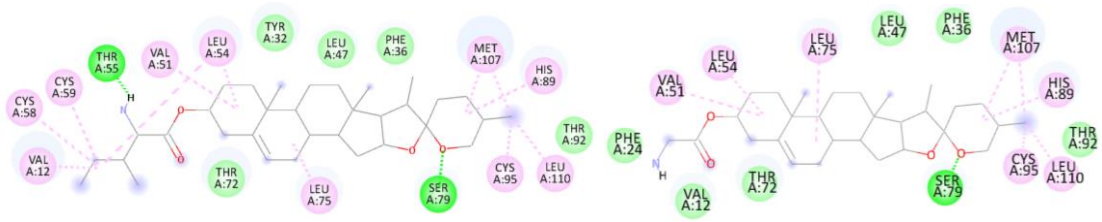


Figura 55. Interacciones ligando-proteína de Ile-Dg y Gly-Dg en VDB obtenidas con AD4.

Se analizaron los derivados EDA encontrando 2 resultados en donde se presentaron la mayor cantidad de interacciones hidrofóbicas y con EA superiores a la molécula de referencia encontrándose a los EDA con aminoácidos alifáticos. Ile-Dg solamente presenta dos puentes de hidrógeno entre Ser79 Y Thr55, siendo las otras interacciones de tipo no polar. Los puentes de hidrógeno se formaron con los residuos más importantes para la inhibición. Para el derivado Gly-Dg hubo un puente de hidrógeno entre Ser79 y el oxígeno de C_{16} de diosgenina.

Tabla 24. Interacciones esenciales y EA de EDA en VDB obtenidas con ADV.

EDA	Interacción ligando-proteína	EA	EDA	Interacción ligando-proteína	EA	EDA	Interacción ligando-proteína	EA	EDA	Interacción ligando-proteína	EA
Ala-Dg	His89 (NF)	-9.2	Gly-Dg	Leu47, His89, Met107	-9.7	Met-Dg	Leu47, His89, Met107	-8.4	Ser-Dg	Met107, His89	-9.3
Cys-Dg	Leu47, Val51	-8.7	His-Dg	Leu47, Val51,	-9.4	Asn-Dg	His89, Met107	-10.1	Thr-Dg	Ser79, His89	-9.7
Asp-Dg	Met107, His89	-9.5	Ile-Dg	Met107, Ser79, Leu47	-9.2	Pro-Dg	Val51, Leu47, His89, Met107	-10	Val-Dg	Met107	-9.7
Glu-Dg	Ser79	-9.1	Lys-Dg	Leu47, His89,	-8.8	Gln-Dg	Met107	-8.9	Trp-Dg	His89, Met107,	-11

Phe-Dg	Leu47, Tyr32, Met107	-9.8	Leu-Dg	Tyr32, Leu47	-9.5	Arg-Dg	Ser79, His89 (NF)	-8.8	Tyr-Dg	Val51	-10

Por ADV se estimó que los mejores derivados por su EA fueron en orden; Trp-Dg, Asn-Dg y Tyr-Dg. Las interacciones de mayor importancia fueron las hidrofóbicas entre el ligando y la proteína, ya que la mayoría de los residuos involucrados interaccionan con Trp-Dg en el metilo 27 y en el anillo A y F de la diosgenina. Con el fragmento aminoacídico también hubo interacciones π-alquilo entre el indol y Val12, Leu27 y Leu 31. La interacción con mayor energética se presentaron entre Ser28 y el hidrógeno polar del heteroátomo del indol. A diferencia del sistema anterior, existen menores puentes de hidrógeno sobre la proteína por lo que es factible la inhibición reversible.

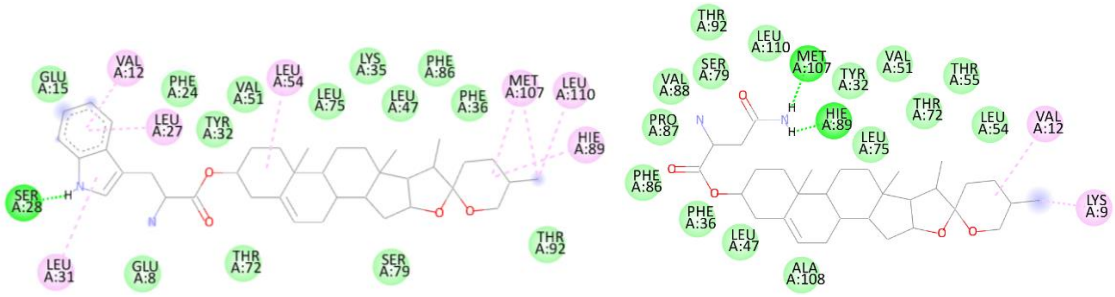


Figura 56. Interacciones ligando-proteína de Trp-Dg y Asn-Dg en VDB obtenidas con ADV.

Por otro lado, Asn-Dg tuvo 2 interacciones por puente de hidrógeno entre el NH_2 de la amida y Met107 junto con His89 indicativo de una interacción fuerte dentro del sitio activo.

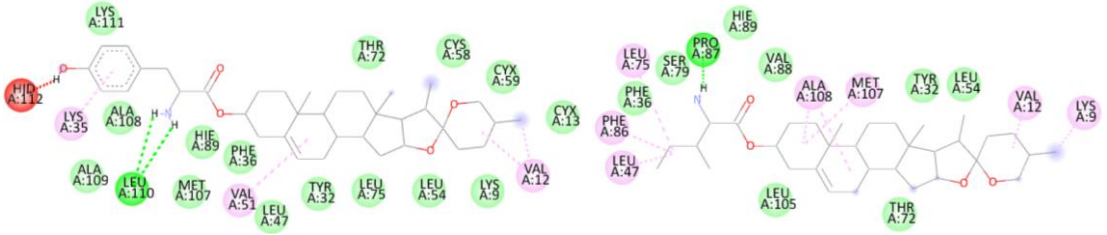


Figura 57. Interacciones ligando-proteína de Trp-Dg y Asn-Dg en VDB obtenidas con ADV.

El derivado Tyr-Dg fue el tercer EDA con la mejor energía, se obtuvo que probablemente la reducción de energía vs otros derivados aromáticos fue debido a la interacción de repulsión electrostática no favorable entre His112 y el hidroxilo del anillo aromático. Las otras interacciones, por puente hidrógeno entre Leu110 y el NH_2, así como las alifáticas dadas por Lys35, Val51 y Val 12 están involucradas en la interacción en el sitio activo. También se analizaron los tipos de interacciones, se encontró que el derivado Ile-Dg, aunque superior en energía a la molécula control, es la molécula con la mayor proporción de interacciones no polares contra puentes de hidrógeno, presentando solamente una interacción de este tipo entre Pro87 y el resto mediado por la cadena alifática del fragmento aminoacídico y el anillo F de la diosgenina.

Tabla 25. Interacciones esenciales y EA de los EDA en VDB obtenidas con Glide.

EDA	Interacción ligando-proteína	EA	EDA	Interacción ligando-proteína	EA	EDA	Interacción ligando-proteína	EA	EDA	Interacción ligando-proteína	EA
Ala-Dg	Ser79	-4.5	Gly-Dg	Ser79, His89	-5.6	Met-Dg	---	-3.7	Ser-Dg	Ser79	-4.4
Cys-Dg	---	-4.4	His-Dg	Ser79	-4.9	Asn-Dg	His89	-5.5	Thr-Dg	His89	-4.6
Asp-Dg	Ser79, His89	-5.2	Ile-Dg	---	-4.3	Pro-Dg	---	-4.8	Val-Dg	---	-4.2
Glu-Dg	---	-4.4	Lys-Dg	---	-3.9	Gln-Dg	His89	-5.2	Trp-Dg	Met107,	-4.7
Phe-Dg	---	-3.8	Leu-Dg	---	-3.5	Arg-Dg	--	-4.5	Tyr-Dg	His89	-4.9

---: no interacciona

3.4 Exactitud en el diagnóstico molecular usando métodos *in silico*

El "docking" molecular es una herramienta invaluable para el desarrollo de moléculas nuevas para la terapéutica, por lo que se han desarrollado una gran cantidad de sistemas, algoritmos y métodos de evaluación.

Uno de los pasos más importantes es determinar su exactitud. Se seleccionaron los dos sistemas open-source más utilizados y extendidos para docking molecular y un sistema privativo, Glide Schrödinger con amplia aceptación en la comunidad científica para comparar los resultados obtenidos y compararlos entre ellos y obtener el resultado con la mejor exactitud diagnóstica posible, es decir, diferenciar entre resultados realmente verdaderos de los falsos.

Para ello, se obtuvieron las curvas ROC como representación gráfica de la sensibilidad de los sistemas comparadas con la especificidad, es decir, la capacidad de los sistemas para evaluar como verdadero un resultado verdadero y como falso, un resultado del que se ha determinado previamente que es falso (105).

Para corroborar que los resultados obtenidos concuerdan con la posición de los compuestos en los sitios de interés y en los aminoácidos específicos de interacción se graficaron las curvas ROC para las dos comparaciones de moléculas control: ligandos endógenos y fármacos de referencia.

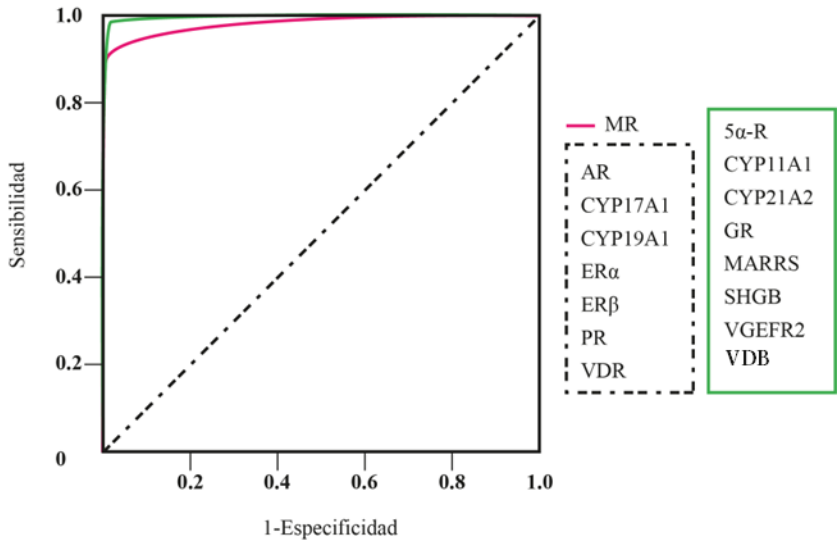


Figura 58. Curva ROC de EDA vs ligandos endógenos.

Podemos observar (Figura 59) que los 3 sistemas usados permiten una evaluación aceptable en las enzimas 5α-reductasa y CYP11A1 en donde los 3 métodos de análisis concordaron en que la mayoría de las moléculas se situaban en el sitio activo de las proteínas, con interacciones específicas involucradas en la inhibición o bloqueo de su actividad y con

energías superiores al ligando endógeno. Para la enzima CYP21A2 y el receptor a glucocorticoides GR también se determinó que no había interacción de las moléculas, no se encontraban en el sitio activo. Además, las EA fueron en su mayoría, inferiores a los ligandos endógenos de referencia. Para el receptor VGEFR2 solamente Trp-Dg interaccionó, el resto de los compuestos no, lo que también es evaluado correctamente por los 3 sistemas.

En el caso de las dianas AR y del citocromo P450 CYP19A1 se obtuvo el peor desempeño de las moléculas, este resultado se puede explicar por la tendencia observada de AD4 y ADV de sobreestimar la EA en la proteína cuando las moléculas no se encontraban dentro del sitio activo, indicando falsos positivos. De igual manera, en los receptores a estrógenos y a progestágenos (ERα, ERβ y PR) se obtuvo este resultado, también los dos sistemas no lograron correlacionar la EA obtenida con la interacción real dentro del sitio activo de los receptores.

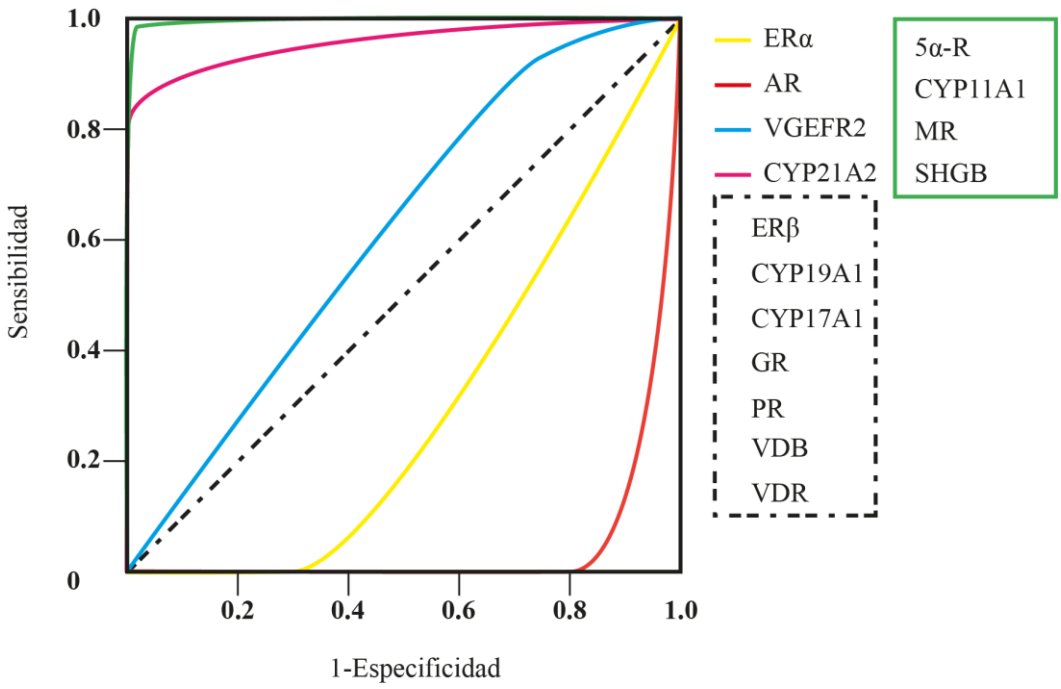


Figura 59. Curva ROC de fármacos vs EDA.

La evaluación contra los fármacos de referencia devolvió resultados que permitieron seleccionar mejor a las proteínas evaluadas por los sistemas. Se encontró que las proteínas con mejores resultados de confiabilidad fueron la 5α-reductasa, la CYP11A1, el receptor a mineralocorticoides MR y la globulina de unión a hormonas sexuales SHBG. Esta diferencia es importante al comparar si las moléculas que se habían determinado como superiores a los fármacos de referencia por docking molecular eran correctas, observando que los resultados para VGEFR2 no son tan buenos para los 3 sistemas y que las peores evaluaciones se llevaron a cabo entre el receptor a estrógenos α y con el receptor de andrógenos. Los resultados energéticos en AD4 y ADV suponían que los derivados eran claramente superiores al fármaco de referencia cuando en realidad no había interacción con el sitio activo y hubo un falso positivo.

Tabla 26. AUC de ligandos endógenos/fármacos vs EDA.

Proteína	Sensibilidad	Especificidad	AUC	Proteína	Sensibilidad	Especificidad	AUC
5αR	1	0	1	VGEFR2	1	1	1
AR	0	1	0.5	GR	1	0	1
CYP17A1	IND	IND	IND	CYP11A1	1	1	1
CYP19A1	0	1	0.5	CYP21A2	1	0	1
ERα	0	1	0.5	MR	0.9	0	0.85
ERβ	0	1	0.5	SHBG	1	0	1
PR	0	1	0.5	MARRS	1	1	1
VDB	IND	IND	IND	VDR	0	1	0.5

IND: indeterminado

3.5 Estudios ADMET

Con los 4 mejores compuestos (tabla 63) seleccionados previamente se procedió a realizar los estudios farmacocinéticos y dinámicos con la plataforma SwissADME para determinar parámetros cinéticos de los compuestos para ser administrados por vía oral, así como de los efectos por su metabolismo.

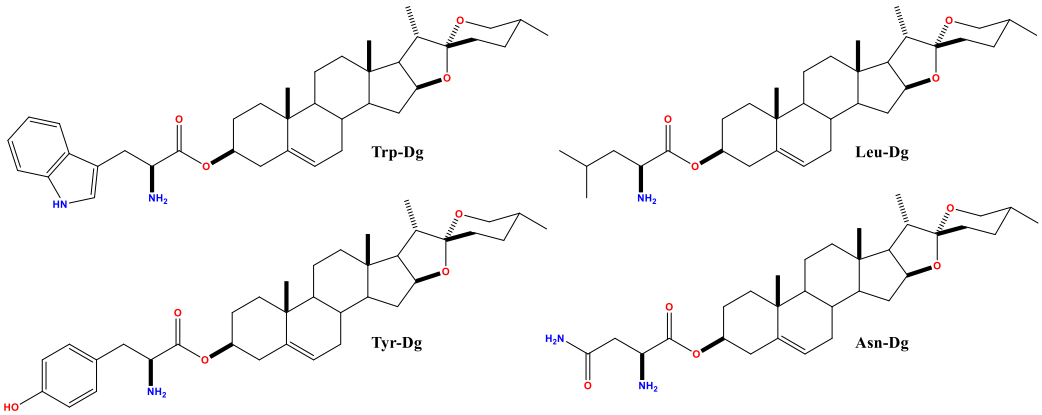


Figura 60. Estructuras de los 4 mejores compuestos obtenidos

Para biodisponibilidad oral, los compuestos aromáticos no cumplen con los criterios de lipofilicidad, tamaño e insolubilidad necesarios para ser buenos candidatos para administración por vía oral. Para Trp-Dg, el peso molecular de 577.79 g/mol es superior a los 500 g/mol, máximo recomendado para biodisponibilidad oral y que directamente afecta al área de superficie polar topológica (TPSA), representado en el parámetro de polaridad con valor de 86.57 Å^2.

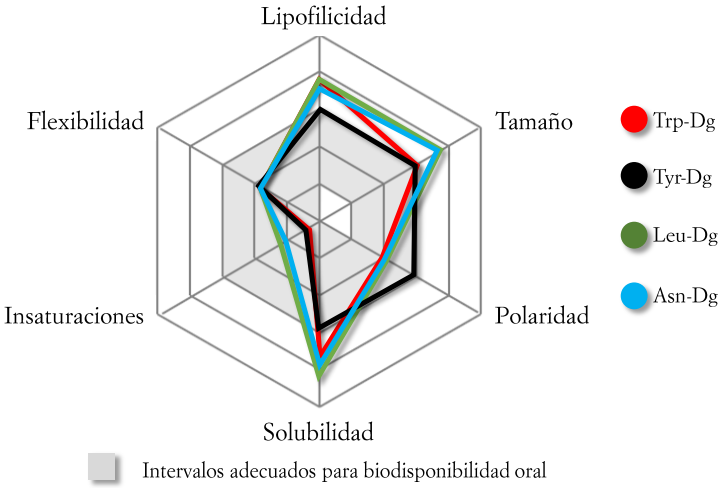


Figura 61. Radar de biodisponibilidad de los 4 mejores EDA.

Por la naturaleza del derivado esteroidal formado principalmente por átomos de carbono y algunos heteroátomos aporta moderada densidad electrónica total a la molécula. El aporte principal lo hace el fragmento aminoacídico, sin embargo, no es suficiente para que

la molécula sea suficientemente soluble en agua dado que el valor de Log *S* (ESOL) fue de -8.08 comparado con el valor mínimo de 0.0 que se requiere.

De las 4 moléculas seleccionadas, sólo Asn-Dg cumple con los criterios de buena biodisponibilidad si se administrara por vía oral. Esto no implica que los otros 3 compuestos tengan malas propiedades farmacocinéticas solo que deberían administradas por otras vías (Tabla 27).

Tabla 27. Propiedades farmacocinéticas de los 4 mejores derivados EDA.

Farmacocinética/moléculas		**Trp-Dg**	**Tyr-Dg**	**Leu-Dg**	**Asn-Dg**
Absorción Gastrointestinal		Baja	Baja	Alta	Alta
Permea BHE		No	No	No	No
Sustrato P-gp		No	No	No	Sí
Inhibidor	CYP1A2	No	No	No	No
	CYP2C19	No	No	No	No
	CYP2C9	No	No	No	No
	CYP2D6	No	No	No	No
	CYP3A4	No	No	No	No

Otros parámetros fueron saber si los compuestos pueden ser absorbidos por vía gastrointestinal, permear la barrera hematoencefálica (BHE), ser sustratos de Glicoproteína P (P-gp), o inhibidores de enzimas que intervienen en la metabolización por los citocromos P450. Se obtuvo que ninguno de los compuestos inhibe CYP's. Los derivados aromáticos presentaron baja absorción gastrointestinal y no son sustratos de los transportadores P-gp. Los dos compuestos restantes presentan alta probabilidad de ser absorbidos vía gastrointestinal, particularmente el derivado Asn-Dg tiene alta probabilidad de ser sustrato de P-gp el cual para los efectos buscados en este proyecto no representan un obstáculo ya que P-gp principalmente está asociado a la resistencia farmacológica de moléculas citotóxicas en cáncer.

Una de las características más importantes para una molécula bioactiva es la especificidad con la diana biológica a la que fue orientada, mientras menos específica sea, implicará una mayor variedad de interacciones con diferentes dianas biológicas que puedan originar efectos adversos. Con la plataforma bioinformática PASSonline se predijo la actividad

biológica. Esta plataforma también devuelve actividades biológicas asociadas a la toxicidad y complementa la información obtenida por los parámetros ADME anteriores.

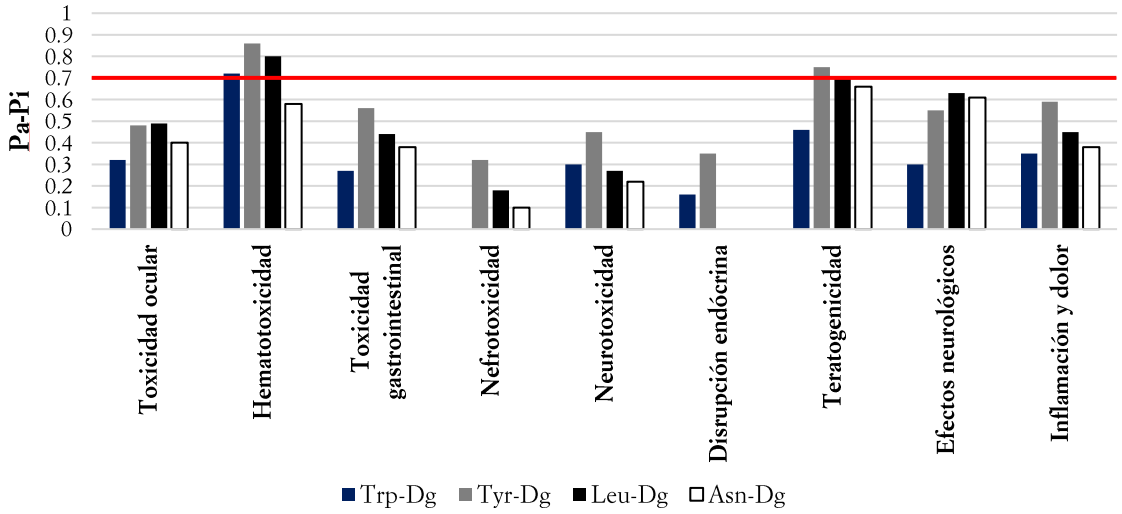


Figura 62. Probabilidad de toxicidad de los EDA mediante PASSonline.

Esta plataforma devuelve dos valores importantes, el valor Pa de probabilidad de bioactividad y el valor Pi, probabilidad de inactividad, los cuales estiman la probabilidad del compuesto por comparación estructural de presentar un efecto biológico dado. Se debe considerarse que la molécula superare al menos el 70% de la diferencia Pa-Pi para presentar alta probabilidad de ser activa. En la se muestra que PASSonline estimó 9 efectos adversos.

Toxicidad en la sangre y efectos teratogénicos fueron los principales efectos adversos. Los compuestos Trp-Dg, Tyr-Dg y Leu-Dg superaron el umbral del 70%. La toxicidad en las células sanguíneas involucra el efecto de una molécula exógena sobre la médula ósea, riñones e hígado, así como en las plaquetas, eritrocitos y leucocitos (106). Esta actividad puede ser explicada por el efecto de los derivados sobre enzimas de la familia de citocromos P450 ya que el grupo prostético es el encargado de la unión del oxígeno al grupo hemo y los derivados EDA mostraron alta afinidad por ellos en el estudio de la CYP11A1. No obstante, debido a la gran cantidad de órganos y células asociadas a la toxicidad de las células de la sangre, se vuelve un parámetro muy importante a considerar para futuros estudios biológicos.

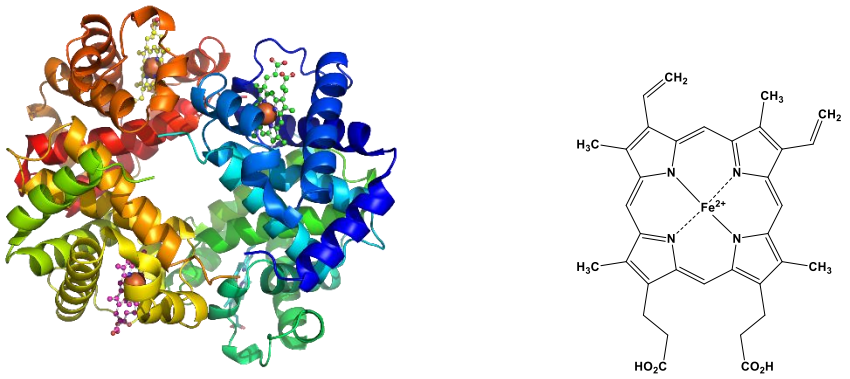


Figura 63. Estructura 3D de la hemoglobina y 2D del grupo hemo

Al inducirse efectos teratogénicos hay defectos en el desarrollo fetal, específicamente, si los compuestos interaccionan con los citocromos P450 como CYP11A1. Esto también es de gran importancia ya que la enzima CYP11A1 controla la producción de esteroides sexuales que pueden alterar el desarrollo sexual del feto, el cual es consistente con el resultado obtenido sobre disrupción endócrina, la cual define que un compuesto que "interfiere con la síntesis, secreción, transporte, unión o eliminación de hormonas naturales en el cuerpo son responsables del mantenimiento de la homeostasis, reproducción y/o comportamiento" (107) que ya se ha discutido en este proyecto sobre el potencial de los EDA para inhibir globulinas de transporte y enzimas asociadas a la esteroidogénesis. Sin embargo, no implica mayor problema si se cuenta con un buen diseño de posología y el paciente sigue a cabalidad las indicaciones terapéuticas.

La toxicidad ocular involucra principalmente la inflamación y atrofia del nervio óptico y de la retina que puede llevar a diferentes grados de ceguera por exposición del tejido óptico a fármacos en un cierto periodo de tiempo, en donde moléculas lipofílicas tienen mayor predisposición a atravesar barreras y estructuras oculares (108,109). Los derivados presentaron baja probabilidad a esta actividad, probablemente debido a la similitud estructural que comparten con corticosteroides, de los cuales existe amplios reportes de su toxicidad en el sistema ocular.

3.4 Análisis retrosintético

El diseño de una molécula también requiere considerar los pasos sintéticos necesarios para su obtención y producción. Dentro de la síntesis de aminoácidos, la selectividad química es una de las características más importantes, ya que los extremos amino y carboxilo del aminoácido, así como los diferentes grupos funcionales unidos al carbono representan un reto para su protección debido a que se presentan dos o más zonas reactivas; cinéticas y termodinámicas, las cuales sin la protección son susceptibles de polimerización una vez que se han activado los grupos funcionales a reaccionar.

Las moléculas diseñadas en este proyecto involucraron una esterificación por parte del ácido carboxílico y del hidroxilo de la diosgenina usándolo como nucleófilo; no obstante, el grupo amino del aminoácido es nucleófilo fuerte por lo que la estrategia sintética debe considerar desactivar al grupo NH_2 para utilizar exclusivamente al hidroxilo de la diosgenina.

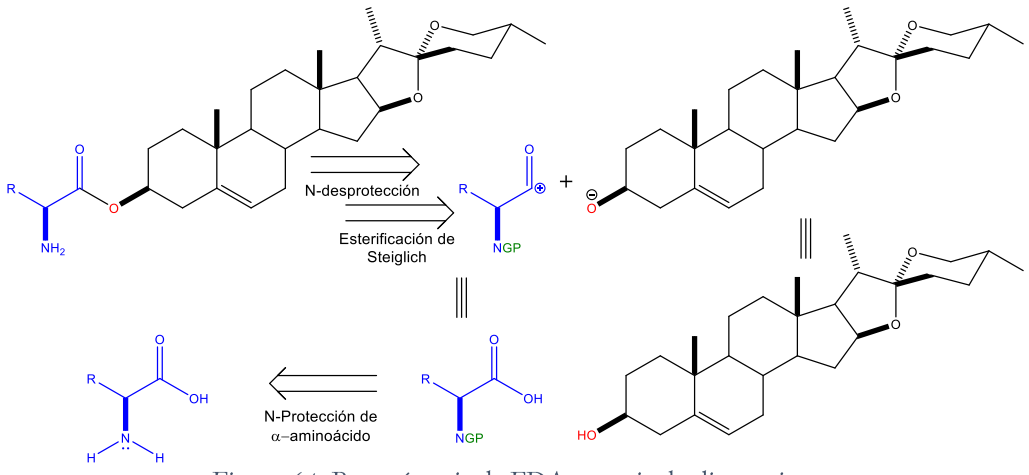


Figura 64. Retrosíntesis de EDA a partir de diosgenina.

Además, los grupos protectores basados en carbamatos son ampliamente usados en la protección de aminas en síntesis orgánica, ejemplo de ellos son el Boc, Cbz y Fmoc. El *tert*-butiloxicarbonilo, introducido por Carpino, McKay y Albertson en 1957 es una de las alternativas más usadas en la protección de aminas. Sin embargo, la remoción del grupo protector requiere condiciones ácidas, generalmente ácido trifluoroacético al 25-50% lo cual supone un problema para la estabilidad del espiroacetal.

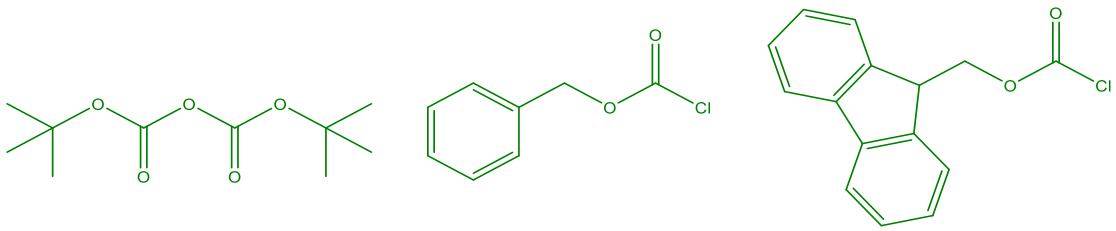


Figura 65. Estructura del Boc, CBz y Fmoc.

Cai y colaboradores en 2019 sintetizaron diferentes derivados de diosgenina con efectos dual como neuroprotectores y angiogénesis. Para llevar a cabo la desprotección se requirió de CH2Cl2 seco y 0.1 equivalentes de ácido trifluoroacético con rendimientos de entre el 50 y 70% (110). Ma y colaboradores también utilizaron aminoácidos *N*-Boc y *N*-Cbz protegidos con rendimientos del 68 al 78% (111).

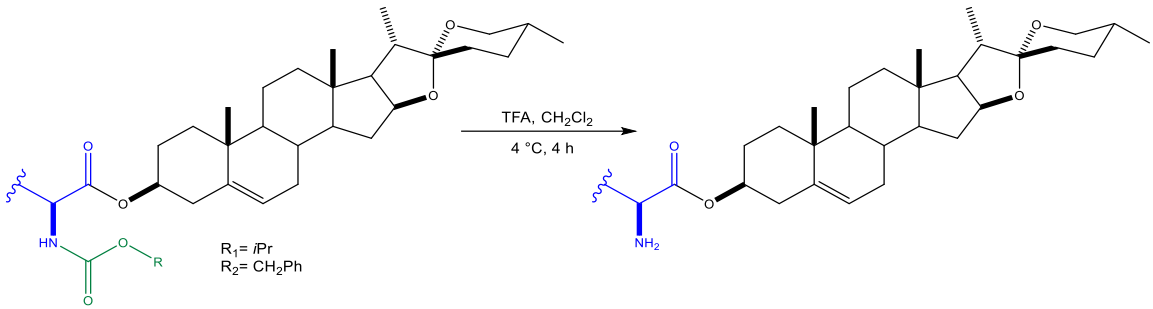


Figura 66. Desprotección de bioconjugados Dg-AA

Otra alternativa de protección de aminas primarias como la de los aminoácidos es la bisprotección con imidas, como la 4,5-difenil-3-oxazolin-2-ona o la formación de *N*-Ftalamidas cuyos rendimientos de obtención son buenos y su desprotección requiere hidrazina en EtOH a temperatura ambiente (112).

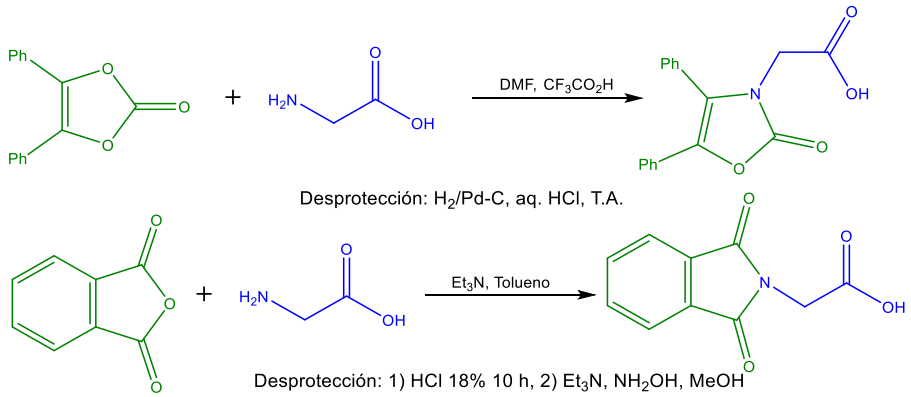


Figura 67. Obtención de aminoácidos Bis-*N* Protegidos

Debido a la versatilidad de este grupo protector y de sus condiciones de reacción relativamente moderadas, se seleccionó a este grupo protector para la protección del aminoácido. Con ello surgió la posibilidad de cuál podría ser el papel de dichos grupos protectores dentro de las moléculas EDA. Con base en las herramientas computacionales, se decidió evaluar también a estos derivados por docking molecular y determinar si el grupo protector afecta la bioactividad de los derivados. Con las conclusiones devueltas por el análisis de exactitud diagnóstica se procedió a utilizar únicamente a Glide.

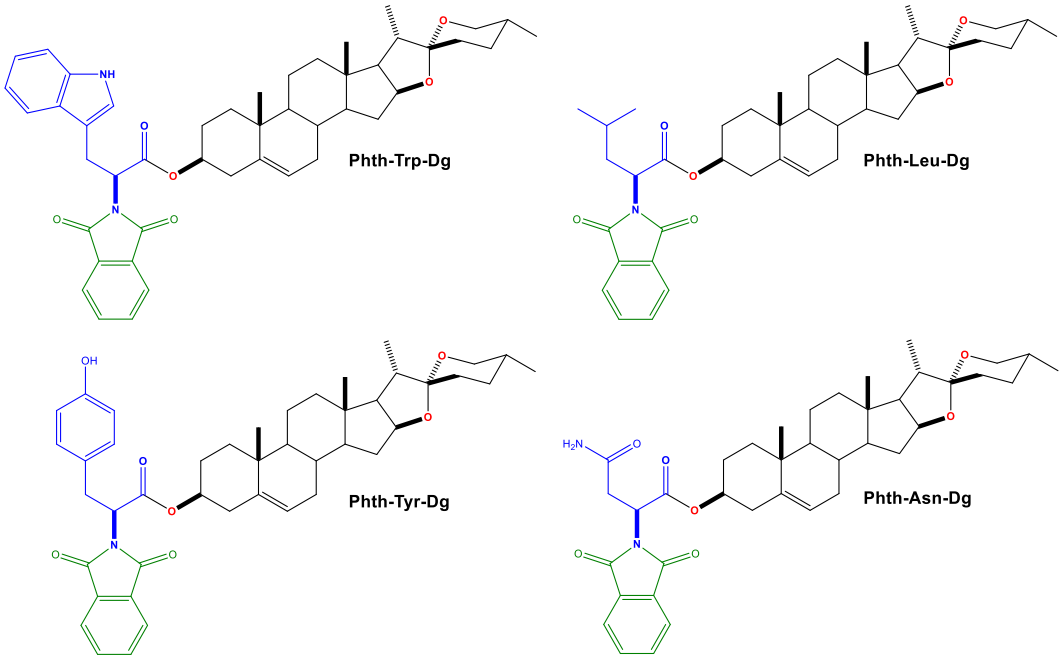


Figura 68. Intermediarios *N*-protegidos de los mejores compuestos obtenidos

Se obtuvo que para las proteínas cuya inhibición es deseable, en casi todos los EDA, la protección mejora energéticamente los resultados para 5αR y VGEFR2 y notablemente para VDB.

Tabla 28. Comparación de EA de EDA protegidos vs desprotegidos (kcal/mol).

Proteína/ molécula	Trp-Dg	Tyr-Dg	Leu-Dg	Asn-Dg	Pht-Trp-Dg	Pht-Tyr-Dg	Pht-Leu-Dg	Pht-Asn-Dg	Ligando endógeno	Fármaco referencia

5αR	-6.2	-6.6	-5.9	-6.5	-7.2	-6.9	-5.6	-6.6	-11.2	-10.3
AR	-3.4	-1.9	-0.3	-2.8	NI	NI	NI	NI	-11.1	.7.3
ERα	-3.9	-3.7	-3.0	-2.9	NI	NI	NI	NI	-10.4	-9.3
ERβ	-1.7	-3.6	-2.3	-3.0	NI	NI	NI	NI	-10.0	-4.6
PR	-0.6	-3.3	-2.4	-3.6	NI	NI	NI	NI	-8.8	-9.1
VGEFR2	-4.1	-5.9	-3.4	-3.4	-6.5	-5.8	-3.5	-4.8	-10.0	-5.6
CYP17A1	-4.5	-3.8	-3.1	-3.6	-4.5	-4.5	-4.4	-3.9	-8.3	-9.7
CYP19A1	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	-10.5	-6.0
VDB	-4.7	-4.9	-3.5	-5.5	-5.5	-4.7	-4.2	-3.8	-5.0	-5.9

En amarillo: energías superiores al ligando endógeno de cada proteína, respectivamente.
NI: No interacciona

Con respecto a las proteínas cuya inhibición es indeseable obtuvimos un resultado favorable para la enzima CYP11A1 ya que las energías de afinidad se reducen dramáticamente, indicando que la interacción es mucho menor con la protección en el grupo amino comparación con el grupo libre (tabla 29).

Tabla 29. Comparación de EA de EDA protegidos vs desprotegidos (kcal/mol).

Proteína/ molécula	Trp-Dg	Tyr-Dg	Leu-Dg	Asn-Dg	Phth-Trp-Dg	Phth-Tyr-Dg	Phth-Leu-Dg	Phth-Asn-Dg	Ligando endógeno	Fármaco referencia
CYP11A1	NI	-9.9	-7.8	-8.9	-6.0	-5.4	-2.4	-4.0	-9.0	-6.8
CYP21A2	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	-9.4	-7.9
GR	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	-10.2	-10.9
MR	-3.7	-4.1	-2.4	-3.8	NI	NI	NI	NI	-9.9	-11.2
SHBG	-6.4	-6.3	-4.6	-4.2	-5.7	-7.6	-4.9	-4.3	-10.3	-9.5

En amarillo: energías superiores al ligando endógeno de cada proteína, respectivamente.
NI: no interacciona

Finalmente, con respecto a las proteínas cuya activación es deseable, se obtuvo que ninguno de los derivados protegidos interactuó con la molécula, esto se puede deber al aumento en el tamaño del fragmento aminoacídico ya que el grupo protector es más voluminoso que el NH_2 original (tabla 30).

Tabla 30. Comparación de EA de EDA protegidos vs desprotegidos (kcal/mol).

Proteína/ molécula	Trp-Dg	Tyr-Dg	Leu-Dg	Asn-Dg	Phth-Trp-Dg	Phth-Tyr-Dg	Phth-Leu-Dg	Phth-Asn-Dg	Ligando endógeno	Fármaco referencia
MARRS	-5.8	-5.7	-4.7	-6.1	NI	NI	NI	NI	-8.2	---
VDR	-3.8	-3.0	-1.6	-2.9	NI	NI	NI	NI	-11.4	-11.3

NI: no interacciona

A nivel espacial, el aumento del volumen de la molécula por la presencia del grupo protector provocó la incapacidad del compuesto para entrar al sitio activo, situándose en la periferia de la proteína, en zonas en las que no existe reporte de inhibición alostérica, cerca del sitio de entrada de ligando y con energías inferiores a la del ligando endógeno, por ende, perdiendo su capacidad inhibitoria de la enzima.

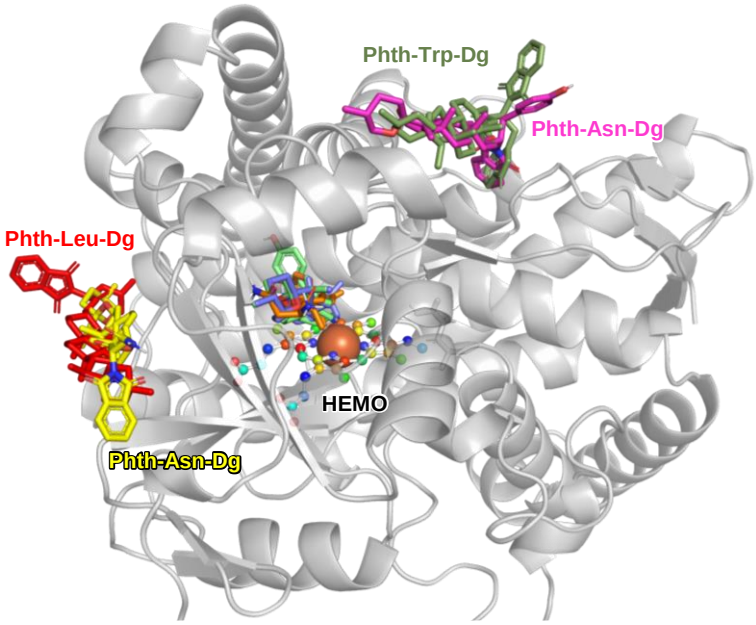


Figura 69. Superposición de los compuestos EDA protegidos y desprotegidos en la enzima CYP11A1.

Con respecto a la globulina de unión a vitamina D, se observó que el derivado protegido de triptófano Phth-Trp-Dg mejoró su energía comparada con su versión desprotegida e igualando a Asn-Dg, uno de los pocos EDA que superaron a la vitamina D a nivel energético. A pesar de que los derivados se encuentran dentro del sitio activo, lo hacen parcialmente interaccionando únicamente con una parte de la molécula.

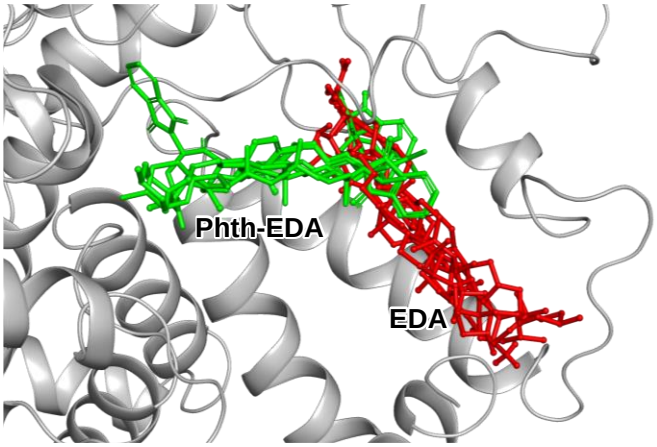


Figura 70. Superposición de los compuestos EDA protegidos y no protegidos en VDB.

A nivel interacción, se observa el efecto de esta interacción parcial sobre el sitio activo al presentar dos interacciones polares de tipo puente de hidrógeno sin interaccionar directamente con residuos en los que se sabe que existe inhibición directa. Sin embargo, se puede explicar el aumento en la energía de afinidad de este derivado por la doble interacción de Lys35 sobre el carbonilo de la diimida del grupo protector y del carbonilo del éster.

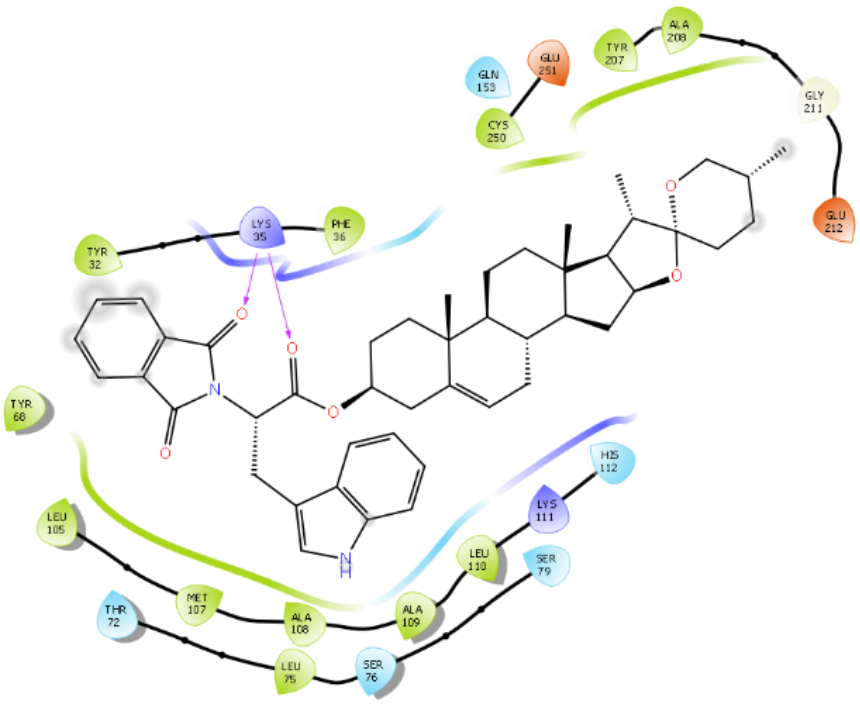


Figura 71. Interacciones ligando-proteína de Phth-Trp-Dg en VDB

Con estos resultados, los intermediarios resultan ser atractivos para otros estudios, mostrando que la modificación del grupo amino es crucial en la EA contra las proteínas estudiadas aquí, tanto por el aumento de interacciones que se puede generar con el grupo protector, así como por el aumento del volumen de la molécula imposibilitando la entrada al sitio activo.

4. Conclusiones

El derivado Trp-Dg tiene la capacidad de inhibir e interactuar específicamente en el sitio de la enzima 5α-reductasa y a los receptores VGEFR2 y MARRS. También es una de las moléculas que presentó la mayor EA en contra de la enzima CYP11A1 la cual es una de las enzimas clave en la síntesis de esteroides. No obstante, la inhibición de la enzima CYP11A1 este derivado tiene potencial para inhibir la producción de andrógenos y por lo tanto, ser útil para contra el fenotipo de SOP Clásico. Por su parte, el derivado Tyr-Dg es el segundo mejor candidato ya que puede inhibir a todas las proteínas que Trp-Dg inhibe a excepción de VGEFR2 y activar a MARRS.

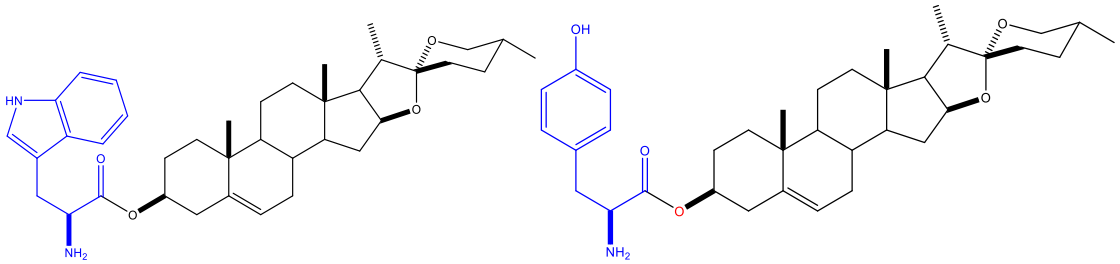


Figura 72. Estructura de Trp-Dg y Tyr-Dg

Los compuestos Leu-Dg y Asn-Dg no tienen capacidad de inhibir a la enzima CYP11A1 compitiendo con el colesterol. Cabe precisar que el fármaco de referencia tiene una muy baja energía de afinidad que coincide con los reportes de la literatura en la que coinciden que el ketoconazol, es un inhibidor débil pero sí activa a MARRS, involucrada en la inflamación, así como a la enzima 5α-reductasa, la cual transforma a la testosterona en su metabolito más activo DHT. Por lo tanto, podría reducción de los efectos androgénicos haciéndolos atractivos para tratar el fenotipo SOP ovulatorio, caracterizado por el papel de los andrógenos en el desarrollo de las manifestaciones clínicas, aunque con menor importancia que en SOP clásico.

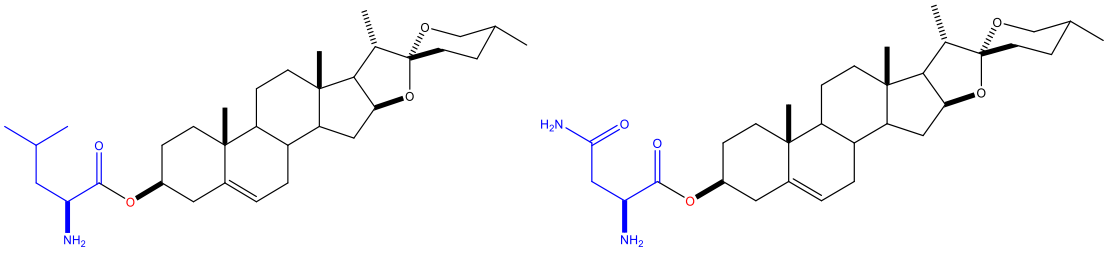


Figura 73. Estructura de Trp-Dg y Tyr-Dg

Los estudios ADME sugieren que el compuesto Asn-Dg es la única molécula que cumple con los criterios necesarios para buena biodisponibilidad si se administra por vía oral, esto no implica que los otros 3 compuestos sean malos, sino que es indicativo de la búsqueda de otras vías de administración y desarrollar tecnologías farmacéuticas para su administración en el caso de considerarse como candidatos a fármacos. Con respecto a la toxicidad, los derivados Trp-Dg, Tyr-Dg y Leu-Dg tienes probabilidad de inducir hematotoxicidad y de teratogenicidad, lo cual se explica por la capacidad de las moléculas de interaccionar con globulinas de unión a vitamina D y a hormonas sexuales así como a la inhibición de la enzima CYP11A1, esencial en la esteroidogénesis, por lo que también se propone aumentar el potencial de estas moléculas a nivel sanguíneo y de los efectos adversos que se podrían presentar en mujeres embarazadas.

Finalmente, al considerar la exactitud diagnóstica, Glide fue el mejor sistema que relaciona las EA con la interacción en el sitio activo y la actividad biológica predicha por docking molecular. Los sistemas AD4 y ADV tienen baja exactitud en la relación EA vs actividad biológica, especialmente con los receptores a andrógenos y a estrógenos, como también con enzimas que presentan un grupo prostético hemo, sin embargo, puede mejorar notablemente su exactitud comparando los resultados de ambas plataformas y sin la posibilidad de descartar los resultados espaciales e interaccionales.

5. Metodología Experimental

5.1 Obtención de estructuras tridimensionales

La obtención de las estructuras tridimensionales de las proteínas fue de la base de datos cristalográfica RCSB Protein Data Bank (113) seleccionando aquellas estructuras sin reporte de mutaciones en el sitio activo comparada con la secuencia canónica reportada para cada una en la base UniProt.

Tabla 31. Nombre, abreviaciones, PDB ID y UniProt ID de las proteínas utilizadas.

Proteína	Abreviatura	PDB ID	Uniprot ID
Receptor de andrógenos	AR	2AMA (114)	P10275
Receptor α de estrógenos	ERα	1A52 (115)	P03372
Receptor β de estrógenos	ERβ	5TOA (116)	Q92731
Receptor de progestágenos	PR	3HQ5 (117)	P06401
Receptor de glucocorticoides	GR	4CSJ (118)	P04150
Receptor de mineralocorticoides	MR	3VHU (119)	P08235
Receptor de vitamina D	VDR	3OGT (120)	P11473
Globulina de unión a vitamina D	VDB	1J7E (121)	P02774
Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular tipo 2	VEGFR2	4AGD (122)	P30101
Receptor de esteroides asociado a membrana de respuesta rápida	MARRS	3F8U (123)	P35968
Globulina de unión a hormonas sexuales	SHBG	1D2S (124)	P04278
Aromatasa	CYP19A1	3EQM (125)	P11511
17α-hidroxilasa/17, 20-liasa	CYP17A1	6CHI (126)	P05093
Enzima de escisión de la cadena lateral del colesterol	CYP11A1	3N9Y (127)	P05108
21-Hidroxilasa	CYP21A2	4Y8W (128)	P08686
3-Oxo-5α-esteroide-4-deshidrogenasa tipo 2	5α-R	7BW1 (104)	P31213

5.2 Obtención de ligandos y fármacos

Los ligandos y fármacos de referencia de cada proteína se obtuvieron de las bases de datos de DrugBank (129) y de GuideToPharmacology (130). Para aquellas proteínas cuyo

sustrato o ligando no es único, se seleccionaron aquellos con las mejores constantes de afinidad o de inhibición reportadas.

Tabla 32. Ligandos y fármacos de referencia de las proteínas estudiadas

Proteína	Ligando canónico	Fármaco control
Receptor de andrógenos	Dihidrotestosterona (DHT)	Flutamida
Receptor α de estrógenos	Estradiol	Tamoxifeno
Receptor β de estrógenos	Estradiol	Raloxifeno
Receptor de progestágenos	Progesterona	Levonorgestrel
Receptor de glucocorticoides	Cortisol	Dexametasona
Receptor de mineralocorticoides	Aldosterona	Espironolactona
Receptor de vitamina D	Calcitriol	TEI9647
Globulina de unión a vitamina D	Calcitriol	TEI9647
Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular	---	Sunitinib Sorafenib
Receptor de esteroides asociado a membrana de respuesta rápida	Diosgenina	---
Globulina de unión a hormonas sexuales	Testosterona Estradiol	
Aromatasa	Testosterona	Anastrozol
17α-hidroxilasa/17, 20-liasa	Pregnenolona	Abiraterona
Enzima de escisión de la cadena lateral del colesterol	Colesterol	Aminoglutetimida
21-Hidroxilasa	Progesterona	Ketoconazol
5α-reductasa	Testosterona	Finasterida

5.3 Minimización energética y asignación de cargas

Se prepararon los ligandos utilizando el software ChemOffice 17.1 para el diseño y minimización energética utilizando el método MM2 (131) ofrecido por Chem3D y el método MM7 de MOPAC (132). La asignación de cargas se hizo mediante la herramienta AutoDock Tools para la evaluación en los sistemas AutoDock 4 y AutoDock Vina. Por su parte, los ligandos se prepararon con el software LigPrep preparando las estructuras desde su diseño 2D y ejecutando la minimización energética utilizando el método OPLS3 (133),

asignando estados de protonación con Epik (134) para la generación de estados de ionización a pH fisiológico para el sistema Glide de Schrödinger.

Para las estructuras macromoleculares, en primer lugar se prepararon las proteínas utilizando el software UCSF Chimera (135). Para la eliminación de moléculas de agua de cristalización y otros elementos no proteicos innecesarios para el cálculo, se procuró seleccionar las cadenas con la mejor calidad y en caso de existir residuos incompletos, se resolvieron utilizando la librería de rotámeros Dunbrack 2010 (136), se asignaron cargas y estados de protonación a pH fisiológico mediante PDB2PQR (137) utilizando el ForceField AMBER y PROPKA para AutoDock Vina y AutoDock 4. Schrödinger por su parte cuenta con Epik para la asignación de estados de protonación y el ForceField OPLS3 para la asignación de cargas, en donde la preparación de la proteína involucró la indicación del centroide de acuerdo con la literatura, preparación de grupos prostéticos, eliminación de agua y condiciones fisiológicas de pH y temperatura.

5.4 Docking molecular

Para los estudios de docking molecular se utilizaron 3 software de acoplamiento molecular: AutoDock Vina (138), AutoDock 4.0 (139) y Glide Schrödinger (100) obteniendo los resultados de energía de acoplamiento devueltos por cada programa. Los resultados de interacciones espaciales y particulares con residuos de cada proteína se llevaron a cabo con los softwares Discovery Studio (140), PyMol (141) y con el visualizador integrado de Schrödinger Maestro.

5.5 Estudios ADMET

La evaluación de las propiedades farmacocinéticas y dinámicas se llevó a cabo mediante la plataforma online SwissADME (142) recuperando los datos calculados de propiedades fisicoquímicas para la construcción del radar de biodisponibilidad oral, utilizando los parámetros de lipofilicidad de XLOGP3 en el intervalo de -0.7 a +5.0, peso molecular de 150 a 500 g/mol, polaridad por TPSA de 20 a 130 $Å^2$, insolubilidad por Log *S* (ESOL) 0 a 6, Insaturación por fracción de carbonos sp^3 de 0.25 a 1.0 y grado de flexibilidad por número de enlaces rotables de 0 a 9 . Se resumieron los resultados farmacocinéticos de parámetros de absorción gastrointestinal, si los compuestos permean la barrera

hematoencefálica (BHE), si los compuestos son sustratos de glicoproteína p (P-gp) o inhibidores de diferentes proteínas del citocromo P450 involucradas en la metabolización de fármaco. La determinación de efectos adversos y toxicidad se llevó a cabo utilizando la plataforma PASSonline (143) recuperando los valores Pa (Probabilidad de actividad) y Pi (Probabilidad de inactividad) y utilizando el criterio de ΔP (Pa-Pi) superior al 70%.

5.6 Análisis estadístico

Para comparar los 3 sistemas de docking molecular en función a los resultados esperados de actividad para cada categoría de proteínas (Inhibición, no inhibición y activación) se utilizó un análisis estadístico de valor, ya que no es posible comparar entre sí a cada sistema. Para este análisis, se consideraron las siguientes condiciones lógicas:

Tabla 33. Estados diagnósticos y condicionales

	Estado	Condición
Inhibición o activación	Positivo absoluto (PA)	Si 3 sistemas devuelven ΔEA entre ligando endógeno/fármaco y compuesto es <0
	Negativo absoluto (PA)	Si 3 sistemas devuelven ΔEA entre ligando endógeno/fármaco y compuesto es >0
	Positivo probable (PP)	Si 2 sistemas devuelven ΔEA entre ligando endógeno/fármaco y compuesto es <0
	Negativo probable (NP)	Si 1 sistema devuelve ΔEA entre ligando endógeno/fármaco y compuesto es >0
	Estado	**Condición**
No inhibir	Positivo absoluto (PA)	Si 3 sistemas devuelven ΔEA entre ligando endógeno/fármaco y compuesto es <0
	Negativo absoluto (PA)	Si 3 sistemas devuelven ΔEA entre ligando endógeno/fármaco y compuesto es >0
	Positivo probable (PP)	Si 2 sistemas devuelven ΔEA entre ligando endógeno/fármaco y compuesto es <0
	Negativo probable (NP)	Si 1 sistema devuelve ΔEA entre ligando endógeno/fármaco y compuesto es >0

El siguiente nivel de análisis se complementó con los resultados de interacción espacial de cada sistema, asignando criterios diagnósticos formales con base en si los ligandos interactúan dentro del sitio activo o no y en cuántos sistemas lo hacen. Para este análisis, se consideraron las siguientes condiciones lógicas:

Tabla 34. Diagnósticos y condicionales asociados

	Diagnóstico	Condición
Inhibición o activación	Verdadero positivo (VP)	Si el resultado energético es PA o PP y ≥2 sistemas coinciden en el sitio activo
	Verdadero negativo (VN)	Si el resultado energético es NA o NP y si ≥0 sistemas coinciden en el sitio activo
	Falso positivo (FP)	Si el resultado energético es PA o PP y ≤2 sistemas coinciden en el sitio activo
	Falso negativo (FN)	Si el resultado energético es PA o PP y 3 sistemas coinciden en el sitio activo
	Diagnóstico	**Condición**
No inhibir	Verdadero positivo (VP)	Si el resultado energético es PA o PP y ≥0 sistemas coinciden en el sitio activo
	Verdadero negativo (VN)	Si el resultado energético es NA o NP y ≥2 sistemas coinciden en el sitio activo
	Falso positivo (FP)	Si el resultado energético es PA o PP y 3 sistemas coinciden en el sitio activo
	Falso negativo (FN)	Si el resultado energético es NA o NP y menos de dos sistemas coinciden en el sitio activo

Referencias

1. Hanson AE. Hippocrates: Diseases of Women 1. Signs J Women Cult Soc. 1975;1(2):567–84.
2. Asikainen S. Masculinities in the Ancient Greco-Roman World. In: Jesus and Other Men. Leiden, The Netherlands: BRILL; 2018. p. 19–45.
3. Paré A, Johnson T, Baker G. The Workes of that Famous Chirurgion Ambrose Parey. Richard Cotes, and Willi: Du-gard, and are to be sold by John Clarke; 1649. (Early English books online).
4. Szydlarska D, Machaj M, Jakimiuk A. History of discovery of polycystic ovary syndrome. Adv Clin Exp Med. 2017;26(3):555–8.
5. Stein IF, Leventhal ML. Amenorrhea associated with bilateral polycystic ovaries. Am J Obstet Gynecol. 1935;29(2):181–91.
6. Stener-Victorin E, Padmanabhan V, Walters KA, Campbell RE, Benrick A, Giacobini P, et al. Animal Models to Understand the Etiology and Pathophysiology of Polycystic Ovary Syndrome. Endocr Rev. 2020;41(4):1–39.
7. Rao P, Bhide P. Controversies in the diagnosis of polycystic ovary syndrome. Ther Adv Reprod Heal. 2020;14:1–11.
8. Hoeger KM, Dokras A, Piltonen T. Update on PCOS: Consequences, Challenges, and Guiding Treatment. J Clin Endocrinol Metab. 2021;106(3):e1071–83.
9. Azziz R, Adashi EY. Stein and Leventhal: 80 years on. Am J Obstet Gynecol [Internet]. 2016;214(2):247.e1-247.e11. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.ajog.2015.12.013
10. Fauser BCJM, Tarlatzis, Fauser, Chang, Aziz, Legro, et al. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. Hum Reprod. 2004;19(1):41–7.
11. Azziz R. Diagnosis of polycystic ovarian syndrome: The Rotterdam criteria are premature. J Clin Endocrinol Metab. 2006;91(3):781–5.
12. Franks S. Diagnosis of polycystic ovarian syndrome: In defense of the Rotterdam criteria. J Clin Endocrinol Metab. 2006;91(3):786–9.
13. Saddick SY. Identifying genes associated with the development of human polycystic ovary syndrome. Saudi J Biol Sci. 2020;27(5):1271–9.
14. Khan MJ, Ullah A, Basit S. Genetic Basis of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS): Current Perspectives. Appl Clin Genet [Internet]. 2019 Dec;Volume 12:249–60. Available from: https://www.dovepress.com/genetic-basis-of-polycystic-ovary-syndrome-pcos-current-perspectives-peer-reviewed-article-TACG
15. Goyal M, Dawood AS. Debates Regarding Lean Patients with Polycystic Ovary

Syndrome: A Narrative Review. J Hum Reprod Sci. 2017;10(3):154–61.

16. Kazemi M, Pierson RA, Parry SA, Kaviani M, Chilibeck PD. Obesity, but not hyperandrogenism or insulin resistance, predicts skeletal muscle mass in reproductive-aged women with polycystic ovary syndrome: A systematic review and meta-analysis of 45 observational studies. Obes Rev. 2021;22(8):1–20.

17. Deniz R, Yavuzkir S, Ugur K, Ustebay DU, Baykus Y, Ustebay S, et al. Subfatin and asprosin, two new metabolic players of polycystic ovary syndrome. J Obstet Gynaecol (Lahore). 2021;41(2):279–84.

18. Gelmann EP. Molecular biology of the androgen receptor. J Clin Oncol. 2002;20(13):3001–15.

19. Gao X ying, Liu Y, Lv Y, Huang T, Lu G, Liu H bin, et al. Role of Androgen Receptor for Reconsidering the "True" Polycystic Ovarian Morphology in PCOS. Sci Rep. 2020;10(1):1–7.

20. Rodriguez Paris V, Bertoldo MJ. The Mechanism of Androgen Actions in PCOS Etiology. Med Sci. 2019;7(9):89.

21. Kuiper GGJM, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Häggblad J, Nilsson S, et al. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors and α and β. Endocrinology. 1997;138(3):863–70.

22. Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J, et al. Estrogen receptors: How do they signal and what are their targets. Physiol Rev. 2007;87(3):905–31.

23. Xu XL, Deng SL, Lian ZX, Yu K. Estrogen Receptors in Polycystic Ovary Syndrome. Cells. 2021;10(2):1–13.

24. Grimm SL, Hartig SM, Edwards DP. Progesterone Receptor Signaling Mechanisms. J Mol Biol. 2016;428(19):3831–49.

25. Hill KK, Roemer SC, Churchill MEA, Edwards DP. Structural and functional analysis of domains of the progesterone receptor. Mol Cell Endocrinol. 2012;348(2):418–29.

26. Li X, Feng Y, Lin JF, Billig H, Shao R. Endometrial progesterone resistance and PCOS. J Biomed Sci. 2014;21(1):1–7.

27. Aghajanova L, Velarde MC, Giudice LC. Altered gene expression profiling in endometrium: Evidence for progesterone resistance. Semin Reprod Med. 2010;28(1):51–8.

28. Carlberg C, Seuter S. The Vitamin D Receptor. Dermatol Clin. 2007;25(4):515–23.

29. Reis GVOP dos, Gontijo NA, Rodrigues KF, Alves MT, Ferreira CN, Gomes KB. Vitamin D receptor polymorphisms and the polycystic ovary syndrome: A systematic review. J Obstet Gynaecol Res. 2017;43(3):436–46.

30. Zadeh-Vakili A, Ramezani Tehrani F, Daneshpour MS, Zarkesh M, Saadat N, Azizi F. Genetic polymorphism of vitamin D receptor gene affects the phenotype of PCOS. Gene. 2013;515(1):193–6.

31. Speeckaert M, Huang G, Delanghe JR, Taes YEC. Biological and clinical aspects of the vitamin D binding protein (Gc-globulin) and its polymorphism. Clin Chim Acta. 2006;372(1–2):33–42.

32. Karuwanarint P, Phonrat B, Tungtrongchitr A, Suriyaprom K, Chuengsamarn S, Schweigert FJ, et al. Vitamin D-binding protein and its polymorphisms as a predictor for metabolic syndrome. Biomark Med. 2018;12(5):465–73.

33. Santos BR, Necker Lecke SB, Spritzer PM. Genetic variant in Vitamin D-binding protein is associated with metabolic syndrome and lower 25-hydroxyVitamin D levels in polycystic ovary syndrome: A cross-sectional study. PLoS One. 2017;12(3):1–12.

34. Gomez-Sanchez E, Gomez-Sanchez CE. The multifaceted mineralocorticoid receptor. Compr Physiol. 2014;4(3):965–94.

35. Armanini D, Castello R, Scaroni C, Bonanni G, Faccini G, Pellati D, et al. Treatment of polycystic ovary syndrome with spironolactone plus licorice. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2007;131(1):61–7.

36. Valkenburg O, Uitterlinden AG, Themmen AP, De Jong FH, Hofman A, Fauser BCJM, et al. Genetic polymorphisms of the glucocorticoid receptor may affect the phenotype of women with anovulatory polycystic ovary syndrome. Hum Reprod. 2011;26(10):2902–11.

37. Nikolić M, Macut D, Djordjevic A, Veličković N, Nestorović N, Bursać B, et al. Possible involvement of glucocorticoids in 5α-dihydrotestosterone-induced PCOS-like metabolic disturbances in the rat visceral adipose tissue. Mol Cell Endocrinol. 2015;399:22–31.

38. Slominski AT, Li W, Kim TK, Semak I, Wang J, Zjawiony JK, et al. Novel activities of CYP11A1 and their potential physiological significance. J Steroid Biochem Mol Biol. 2015;151:25–37.

39. Mast N, Annalora AJ, Lodowski DT, Palczewski K, Stout CD, Pikuleva IA. Structural basis for three-step sequential catalysis by the cholesterol side chain cleavage enzyme CYP11A1. J Biol Chem. 2011;286(7):5607–13.

40. Pusalkar M, Meherji P, Gokral J, Chinnaraj S, Maitra A. CYP11A1 and CYP17 promoter polymorphisms associate with hyperandrogenemia in polycystic ovary syndrome. Fertil Steril. 2009;92(2):653–9.

41. Heidarzadehpilehrood R, Pirhoushiaran M, Abdollahzadeh R, Osman MB, Sakinah M, Nordin N, et al. A Review on CYP11A1, CYP17A1, and CYP19A1 Polymorphism Studies: Candidate Susceptibility Genes for Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) and Infertility. Genes (Basel). 2022;13(2).

42. Yoshimoto FK, Auchus RJ. The diverse chemistry of cytochrome P450 17A1 (P450c17, CYP17A1). J Steroid Biochem Mol Biol. 2015;151:52–65.

43. Park J-M, Lee E-J, Ramakrishna S, Cha D-H, Baek K-H. Association study for single nucleotide polymorphisms in the CYP17A1 gene and polycystic ovary syndrome. Int J Mol Med. 2008;22(2):249–54.

44. Simpson ER, Clyne C, Rubin G, Wah CB, Robertson K, Britt K, et al. Aromatase - A brief overview. Annu Rev Physiol. 2002;64:93–127.

45. Chen J, Shen S, Tan Y, Xia D, Xia Y, Cao Y, et al. The correlation of aromatase activity and obesity in women with or without polycystic ovary syndrome. J Ovarian Res. 2015;8(1):4–9.

46. Misso ML, Wong JLA, Teede HJ, Hart R, Rombauts L, Melder AM, et al. Aromatase inhibitors for PCOS: A systematic review and meta-analysis. Hum Reprod Update. 2012;18(3):301–12.

47. Wedell A. Molecular genetics of 21-hydroxylase deficiency. Endocr Dev. 2010;20:80–7.

48. Zhao B, Lei L, Kagawa N, Sundaramoorthy M, Banerjee S, Nagy LD, et al. Three-dimensional structure of steroid 21-hydroxylase (cytochrome P450 21A2) with two substrates reveals locations of disease-associated variants. J Biol Chem. 2012;287(13):10613–22.

49. Ajmal N, Khan SZ, Shaikh R. Polycystic ovary syndrome (PCOS) and genetic predisposition: A review article. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol X. 2019;3:1–6.

50. Settas N, Dracopoulou-Vabouli M, Dastamani A, Katsikis I, Chrousos G, Panidis D, et al. CYP21A2 mutations in women with polycystic ovary syndrome (PCOS). Horm Metab Res. 2013;45(5):383–6.

51. Hammond GL, Bocchinfuso WP. Sex Hormone-Binding Globulin: Gene Organization and Structure/Function Analyses. Horm Res Paediatr. 1996;45(3–5):197–201.

52. Pugeat M, Crave JC, Elmidani M, Nicolas MH, Garoscio-Cholet M, Lejeune H, et al. Pathophysiology of sex hormone binding globulin (SHBG): Relation to insulin. J Steroid Biochem Mol Biol. 1991;40(4):841–9.

53. Simó R, Sáez-López C, Barbosa-Desongles A, Hernández C, Selva DM. Novel insights in SHBG regulation and clinical implications. Trends Endocrinol Metab. 2015;26(7):376–83.

54. Gambineri A, Pelusi C, Vicennati V, Pagotto U, Pasquali R. Obesity and the Polycystic Ovary Syndrome. Int J Obes. 2002;26(7):883–96.

55. Khanal R, Nemere I. The ERp57/GRp58/1,25D3-MARRS Receptor: Multiple Functional Roles in Diverse Cell Systems. Curr Med Chem. 2007;14(10):1087–93.

56. Amin Zaki El-Bahya A. A Closer Insight into The Role of Vitamin D in Polycystic Ovary Syndrome (Pcos). Glob J Pharm Pharm Sci. 2018;6(4).

57. Yang WS, Moon SY, Lee MJ, Lee EK, Park SK. Diosgenin, an Activator of 1,25D 3 -MARRS Receptor/ERp57, Attenuates the Effects of TNF-α by Causing ADAM10-Dependent Ectodomain Shedding of TNF Receptor 1. Cell Physiol Biochem. 2017;43(6):2434–45.

58. Shaik F, Cuthbert GA, Homer-Vanniasinkam S, Muench SP, Ponnambalam S, Harrison MA. Structural basis for vascular endothelial growth factor receptor activation and implications for disease therapy. Biomolecules. 2020;10(12):1–25.

59. Ivy SP, Wick JY, Kaufman BM. An overview of small-molecule inhibitors of VEGFR signaling. Nat Rev Clin Oncol. 2009;6(10):569–79.

60. Peitsidis P, Agrawal R. Role of vascular endothelial growth factor in women with PCO and PCOS: A systematic review. Reprod Biomed Online. 2010;20(4):444–52.

61. Azzouni F, Godoy A, Li Y, Mohler J. The 5 alpha-reductase isozyme family: A review of basic biology and their role in human diseases. Adv Urol. 2012;2012:1–18.

62. Wu C, Wei K, Jiang Z. 5aα-reductase activity in women with polycystic ovary syndrome: A systematic review and meta-analysis. Reprod Biol Endocrinol. 2017;15(1):1–9.

63. Escobar-Morreale HF. Polycystic ovary syndrome: Definition, aetiology, diagnosis and treatment. Nat Rev Endocrinol. 2018;14(5):270–84.

64. Badawy A, Elnashar A. Treatment options for polycystic ovary syndrome. Int J Womens Health. 2011;3(1):25–35.

65. Pekhlivanov B, Kaleva-Khodzheva N, Orbetsova M, Mitkov M. Metabolic syndrome in women with polycystic ovary syndrome. Akush Ginekol (Sofiia). 2007;46(9):37–40.

66. Scicchitano P, Dentamaro I, Carbonara R, Bulzis G, Dachille A, Caputo P, et al. Cardiovascular risk in women with PCOS. Int J Endocrinol Metab. 2012;10(4):611–8.

67. Osibogun O, Ogunmoroti O, Michos ED. Polycystic ovary syndrome and cardiometabolic risk: Opportunities for cardiovascular disease prevention. Trends Cardiovasc Med. 2020;30(7):399–404.

68. Lim SS, Hutchison SK, Van Ryswyk E, Norman RJ, Teede HJ, Moran LJ. Lifestyle changes in women with polycystic ovary syndrome. Cochrane Database Syst Rev. 2019;2019(3).

69. Fruzzetti F, Perini D, Russo M, Bucci F, Gadducci A. Comparison of two insulin sensitizers, metformin and myo-inositol, in women with polycystic ovary syndrome (PCOS). Gynecol Endocrinol. 2017;33(1):39–42.

70. Rice S, Pellatt L, Ramanathan K, Whitehead SA, Mason HD. Metformin inhibits aromatase via an extracellular signal-regulated kinase-mediated pathway. Endocrinology. 2009;150(10):4794–801.

71. Genazzani AD. Inositol as putative integrative treatment for PCOS. Reprod Biomed Online. 2016;33(6):770–80.

72. Lee YS, Jun HS. Anti-diabetic actions of glucagon-like peptide-1 on pancreatic beta-cells. Metabolism. 2014;63(1):9–19.

73. Xing C, Li C, He B. Insulin Sensitizers for Improving the Endocrine and Metabolic Profile in Overweight Women with PCOS. J Clin Endocrinol Metab. 2020;105(9):2950–63.

74. Cassidy-Vu L, Joe E, Kirk JK. Role of Statin Drugs for Polycystic Ovary Syndrome. J Fam Reprod Heal. 2016;10(4):165–75.

75. Kodaman PH, Duleba AJ. Statins in the treatment of polycystic ovary syndrome. Semin Reprod Med. 2008;26(1):127–38.

76. Auchus RJ, Buschur EO, Chang AY, Hammer GD, Ramm C, Madrigal D, et al. Abiraterone acetate to lower androgens in women with classic 21-hydroxylase deficiency. J Clin Endocrinol Metab. 2014;99(8):2763–70.

77. Morgante G, Massaro MG, Di Sabatino A, Cappelli V, De Leo V. Therapeutic approach for metabolic disorders and infertility in women with PCOS. Gynecol Endocrinol. 2018;34(1):4–9.

78. Luque-Ramírez M, Nattero-Chávez L, Ortiz Flores AE, Escobar-Morreale HF. Combined oral contraceptives and/or antiandrogens versus insulin sensitizers for polycystic ovary syndrome: A systematic review and meta-analysis. Hum Reprod Update. 2018;24(2):226–41.

79. Oguz SH, Yildiz BO. An update on contraception in polycystic ovary syndrome. Endocrinol Metab. 2021;36(2):296–311.

80. Lopez LM, Grimes DA, Schulz KF. Steroidal contraceptives: effect on carbohydrate metabolism in women without diabetes mellitus. Cochrane database Syst Rev. 2019;2019(11).

81. Papadakis G, Kandaraki EA, Garidou A, Koutsaki M, Papalou O, Diamanti-Kandarakis E, et al. Tailoring treatment for PCOS phenotypes. Expert Rev Endocrinol Metab [Internet]. 2021;16(1):9–18. Available from: https://doi.org/10.1080/17446651.2021.1865152

82. Cole TJ, Short KL, Hooper SB. The science of steroids. Semin Fetal Neonatal Med. 2019;24(3):170–5.

83. Makar S, Saha T, Swetha R, Gutti G, Kumar A, Singh SK. Rational approaches of drug design for the development of selective estrogen receptor modulators (SERMs), implicated in breast cancer. Bioorg Chem. 2020;94.

84. Minorics R, Zupko I. Steroidal Anticancer Agents: An Overview of Estradiol-related Compounds. Anticancer Agents Med Chem. 2018;18(5):652–66.

85. Verma SK, Ratre P, Jain AK, Liang C, Gupta G Das, Thareja S. De novo designing, assessment of target affinity and binding interactions against aromatase: Discovery of novel leads as anti-breast cancer agents. Struct Chem. 2021;32(2):847–58.

86. Bansal R, Suryan A. A Comprehensive Review on Steroidal Bioconjugates as Promising Leads in Drug Discovery. ACS Bio Med Chem Au. 2022;

87. Salvador JAR, Carvalho JFS, Neves MAC, Silvestre SM, Leitão AJ, Silva MMC, et al. Anticancer steroids: Linking natural and semi-synthetic compounds. Vol. 30, Natural Product Reports. 2013. 324–374 p.

88. Birudukota N, Mudgal MM, Shanbhag V. Discovery and development of azasteroids as anticancer agents. Steroids [Internet]. 2019;152(August):108505. Available from: https://doi.org/10.1016/j.steroids.2019.108505

89. Singla P, Salunke DB. Recent advances in steroid amino acid conjugates: Old scaffolds with new dimensions. Eur J Med Chem. 2020;187:1–29.

90. Kvasnica M, Budesinsky M, Swaczynova J, Pouzar V, Kohout L. Platinum(II) complexes with steroidal esters of l-methionine and l-histidine: Synthesis, characterization and cytotoxic activity. Bioorganic Med Chem. 2008;16(7):3704–13.

91. Kumar S, Thakur J, Yadav K, Mitra M, Pal S, Ray A, et al. Cholic Acid-Derived Amphiphile which Combats Gram-Positive Bacteria-Mediated Infections via Disintegration of Lipid Clusters. ACS Biomater Sci & Eng. 2019;5(9):4764–75.

92. Kong F, Andersen RJ. Polymastiamides B-F, novel steroid/amino acid conjugates isolated from the Norwegian marine sponge Polymastia boletiformis. J Nat Prod. 1996;59(4):379–85.

93. Hilario-Martínez JC, Huerta A, Amaro-López JC, Alatriste V, De los Santos MG, Martínez I, et al. Stereoselective synthesis of (26R)-26-hydroxydiosgenin and its effect on the regulation of rat ovarian function. Bioorg Chem. 2021;115:1–10.

94. Prabhu BN, Kanchamreddy SH, Sharma AR, Bhat SK, Bhat P V., Kabekkodu SP, et al. Conceptualization of functional single nucleotide polymorphisms of polycystic ovarian syndrome genes: an in silico approach. J Endocrinol Invest. 2021;44(8):1783–93.

95. Casarini L, Brigante G. The polycystic ovary syndrome evolutionary paradox: A genome-wide association studies-based, in silico, evolutionary explanation. J Clin Endocrinol Metab. 2014;99(11):E2412–20.

96. Duan L, Jin D, An X, Zhang Y, Zhao S, Zhou R, et al. The Potential Effect of Rhizoma coptidis on Polycystic Ovary Syndrome Based on Network Pharmacology and Molecular Docking. Evidence-based Complement Altern Med. 2021;2021:1–12.

97. Vieira TF, Sousa SF. Comparing AutoDock and Vina in ligand/decoy discrimination for virtual screening. Appl Sci. 2019;9(21).

98. Pagadala NS, Syed K, Tuszynski J. Software for molecular docking: a review. Biophys Rev. 2017;9(2):91–102.

99. Sitruk-Ware R. New progestagens for contraceptive use. Hum Reprod Update. 2006;12(2):169–78.

100. Halgren TA, Murphy RB, Friesner RA, Beard HS, Frye LL, Pollard WT, et al. Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 2. Enrichment Factors in Database Screening. J Med Chem. 2004;47(7):1750–9.

101. Castro-Alvarez A, Costa AM, Vilarrasa J. The Performance of several docking programs at reproducing protein-macrolide-like crystal structures. Molecules. 2017;22(1).

102. Boittier ED, Tang YY, Buckley ME, Schuurs ZP, Richard DJ, Gandhi NS. Assessing molecular docking tools to guide targeted drug discovery of cd38 inhibitors. Int J Mol Sci. 2020;21(15):1–19.

103. Münzker J, Hofer D, Trummer C, Ulbing M, Harger A, Pieber T, et al. Testosterone to dihydrotestosterone ratio as a new biomarker for an adverse metabolic phenotype in the polycystic ovary syndrome. J Clin Endocrinol Metab. 2015;100(2):653–60.

104. Xiao Q, Wang L, Supekar S, Shen T, Liu H, Ye F, et al. Structure of human steroid 5α-reductase 2 with the anti-androgen drug finasteride. Nat Commun. 2020;11(1):1–23.

105. Marzban C. The ROC curve and the area under it as performance measures. Weather Forecast. 2004;19(6):1106–14.

106. Hua Y, Shi Y, Cui X, Li X. In silico prediction of chemical-induced hematotoxicity with machine learning and deep learning methods. Mol Divers. 2021;25(3):1585–96.

107. Kabir ER, Rahman MS, Rahman I. A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. Environ Toxicol Pharmacol. 2015;40(1):241–58.

108. Fraunfelder FT, Fraunfelder FW. Chapter 15 - Oncolytic Drugs. In: Fraunfelder F "Fritz" T, Fraunfelder F "Rick" WBT-D-IOSE (Eighth E, editors. London: Elsevier; 2021. p. 299–360.

109. Moorthy RS, Valluri S. Ocular toxicity associated with systemic drug therapy. Curr Opin Ophthalmol. 1999;10(6):438–46.

110. Cai D, Qi J, Yang Y, Zhang W, Zhou F, Jia X, et al. Design, Synthesis and biological evaluation of diosgenin-amino acid derivatives with dual functions of neuroprotection and angiogenesis. Molecules. 2019;24(22).

111. Ma L, Zhang J, Wang X, Yang J, Guo L, Wang X, et al. Design and synthesis of diosgenin derivatives as apoptosis inducers through mitochondria-related pathways.

Eur J Med Chem. 2021;217:113361.

112. T. W., Green, P.G.M W. Greene's Protective Groups in Organic Synthesis. 5th ed. Somerset: Wiley; 2014. 1009–1012 p.

113. Berman H, Henrick K, Nakamura H. Announcing the worldwide Protein Data Bank. Vol. 10, Nature Structural Biology. Nature Publishing Group; 2003. p. 980.

114. Pereira de Jesus-Tran K, Cote P-L, Cantin L, Blanchet J, Labrie F, Breton R. Comparison of crystal structures of human androgen receptor ligand-binding domain complexed with various agonists reveals molecular determinants responsible for binding affinity. Protein Sci. 2006;15:987–99.

115. Tanenbaum DM, Wang Y, Williams SP, Sigler PB. Crystallographic comparison of the estrogen and progesterone receptor's ligand binding domains. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;95(11):5998–6003.

116. Souza PCT, Textor LC, Melo DC, Nascimento AS, Skaf MS, Polikarpov I. An alternative conformation of ERβ bound to estradiol reveals H12 in a stable antagonist position. Sci Rep. 2017;7(1):1–11.

117. Thompson SK, Washburn DG, Frazee JS, Madauss KP, Hoang TH, Lapinski L, et al. Rational design of orally-active, pyrrolidine-based progesterone receptor partial agonists. Bioorganic Med Chem Lett. 2009;19(16):4777–80.

118. Edman K, Ahlgren R, Bengtsson M, Bladh H, Bäckström S, Dahmén J, et al. The discovery of potent and selective non-steroidal glucocorticoid receptor modulators, suitable for inhalation. Bioorganic Med Chem Lett [Internet]. 2014;24(11):2571–7. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.03.070

119. Hasui T, Matsunaga N, Ora T, Ohyabu N, Nishigaki N, Imura Y, et al. Identification of benzoxazin-3-one derivatives as novel, potent, and selective nonsteroidal mineralocorticoid receptor antagonists. J Med Chem. 2011;54(24):8616–31.

120. Huet T, Fraga R, Mouriño A, Moras D, Rochel N. Design, Chemical synthesis, Functional characterization and Crystal structure of the sidechain analogue of 1,25-dihydroxyvitamin D3. In 2011.

121. Verboven C, Rabijns A, De Maeyer M, Van Baelen H, Bouillon R, De Ranter C. A structural basis for the unique binding features of the human vitamin d-binding protein. Nat Struct Biol. 2002;9(2):131–6.

122. McTigue M, Murray BW, Chen JH, Deng YL, Solowiej J, Kania RS. Molecular conformations, interactions, and properties associated with drug efficiency and clinical performance among VEGFR TK inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012;109(45):18281–9.

123. Dong G, Wearsch PA, Peaper DR, Cresswell P, Reinisch KM. Insights into MHC Class I Peptide Loading from the Structure of the Tapasin-ERp57 Thiol

Oxidoreductase Heterodimer. Immunity. 2009;30(1):21–32.

124. Grishkovskaya I, Avvakumov G V., Sklenar G, Dales D, Hammond GL, Muller YA. Crystal structure of human sex hormone-binding globulin: Steroid transport by a laminin G-like domain. EMBO J. 2000;19(4):504–12.

125. Ghosh D, Griswold J, Erman M, Pangborn W. Structural basis for androgen specificity and oestrogen synthesis in human aromatase. Nature. 2009;457(7226):219–23.

126. Fehl C, Vogt CD, Yadav R, Li K, Scott EE, Aubé J. Structure-Based Design of Inhibitors with Improved Selectivity for Steroidogenic Cytochrome P450 17A1 over Cytochrome P450 21A2. J Med Chem. 2018;61(11):4946–60.

127. Strushkevich N, MacKenzie F, Cherkesova T, Grabovec I, Usanov S, Park HW. Structural basis for pregnenolone biosynthesis by the mitochondrial monooxygenase system. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011;108(25):10139–43.

128. Pallan PS, Wang C, Lei L, Yoshimoto FK, Auchus RJ, Waterman MR, et al. Human cytochrome P450 21A2, the major steroid 21-hydroxylase: Structure of the enzyme•progesterone substrate complex and rate-limiting C-H bond cleavage. J Biol Chem. 2015;290(21):13128–43.

129. Wishart DS, Knox C, Guo AC, Cheng D, Shrivastava S, Tzur D, et al. DrugBank: A knowledgebase for drugs, drug actions and drug targets. Nucleic Acids Res. 2008 Jan;36(SUPPL. 1):D901-6.

130. Armstrong JF, Faccenda E, Harding SD, Pawson AJ, Southan C, Sharman JL, et al. The IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY in 2020: Extending immunopharmacology content and introducing the IUPHAR/MMV Guide to MALARIA PHARMACOLOGY. Nucleic Acids Res. 2020;48(D1):D1006–21.

131. Allinger NL. Conformational Analysis. 130. MM2. A Hydrocarbon Force Field Utilizing V1and V2Torsional Terms1,2. J Am Chem Soc. 1977;99(25):8127–34.

132. Stewart JJP. Optimization of parameters for semiempirical methods VI: More modifications to the NDDO approximations and re-optimization of parameters. J Mol Model. 2013;19(1):1–32.

133. Harder E, Damm W, Maple J, Wu C, Reboul M, Xiang JY, et al. OPLS3: A Force Field Providing Broad Coverage of Drug-like Small Molecules and Proteins. J Chem Theory Comput. 2016;12(1):281–96.

134. Shelley JC, Cholleti A, Frye LL, Greenwood JR, Timlin MR, Uchimaya M. Epik: A software program for pKa prediction and protonation state generation for drug-like molecules. J Comput Aided Mol Des. 2007;21(12):681–91.

135. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, et al. UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. J Comput Chem. 2004;25(13):1605–12.

136. Shapovalov M V., Dunbrack RL. A smoothed backbone-dependent rotamer library for proteins derived from adaptive kernel density estimates and regressions. Structure. 2011;19(6):844–58.

137. Jurrus E, Engel D, Star K, Monson K, Brandi J, Felberg LE, et al. Improvements to the APBS biomolecular solvation software suite. Protein Sci. 2018;27(1):112–28.

138. Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. J Comput Chem. 2009;31(2):455–61.

139. Morris GM, Ruth H, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, et al. Software news and updates AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. J Comput Chem. 2009;30(16):2785–91.

140. Dassault Systèmes. BIOVIA Discovery Studio Visualizer Software [Internet]. 2021. Available from: https://www.3ds.com/

141. Schrodinger LLC. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8. 2015.

142. Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. Sci Rep. 2017 Mar;7:42717.

143. Filimonov DA, Lagunin AA, Gloriozova TA, Rudik A V., Druzhilovskii DS, Pogodin P V., et al. Prediction of the biological activity spectra of organic compounds using the pass online web resource. Chem Heterocycl Compd. 2014;50(3):444–57.