



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
LICENCIATURA EN BIOTECNOLOGÍA

ESTUDIO COMPUTACIONAL DE INHIBIDORES DE LA
CYP17A1 Y CYP21A2 RELACIONADOS A LA
PROGRESIÓN DEL CÁNCER DE PRÓSTATA
RESISTENTE A LA CASTRACIÓN.

Tesis que para obtener el título de
LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:
ALEJANDRO RUIZ DIEGO

DIRECTOR: DR. FRANCISCO JAVIER MELÉNDEZ
BUSTAMANTE
CO-DIRECTORA DE TESIS: DRA. NORMA ANGÉLICA
CABALLERO CONCHA



FEBRERO 2023

Agradecimientos

Al Laboratorio Nacional de Supercómputo del Sureste de México (LNS-BUAP) por las facilidades otorgadas para realizar este trabajo.



También agradezco a la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado (VIEP) por el apoyo brindado a el Proyecto 100256733-VIEP 2022.



Agradezco al Cuerpo Académico BUAP-CA-263 "Investigación experimental y computacional de nuevos materiales y sistemas biomoleculares" (PRODEP-SEP).



Dedicatoria

Dedico esta tesis a mi madre, la persona que me crio y que más me ha apoyado para ser quien soy ahora. Gracias por todos los sacrificios que has hecho por mi mamá, espero estes orgullosa de lo que he logrado. Sin importar el pasado te amo y todos mis logros son y serán siempre tuyos también.

A mi tía Lupita, quien ha sido mi segunda madre y quien siempre ha estado para ayudarme a cumplir mis metas y sueños.

A mi mejor amiga y confidente de la licenciatura Saraí Morales Ramírez, quien desde la primera semana de la licenciatura me ha brindado su amistad y apoyo. Y quien es además una inspiración para mí.

A mi asesor de Tesis, el Dr. Francisco Javier Meléndez Bustamante, quien desde 3er Semestre me permitió entrar a su laboratorio y me dio las herramientas para aprender química cuántica y química computacional.

A mi co-asesora, la Dra. Norma Caballero, a quien le agradezco enormemente el tiempo invertido para el desarrollo de este trabajo, en especial por la paciencia para corregir la ortografía y gramática.

.
. .
.

Por último, pero no menos importante a E.R.A, la persona que me hizo entrar al mundo de la ciencia y quien me ayudó a descubrir lo que quería hacer en el futuro, sin ti no hubiera estudiado biotecnología ni tendría las metas que tengo.

Resumen

Actualmente, existen una amplia variedad de opciones terapéuticas que sirven para el tratamiento del cáncer, sin embargo, las células cancerosas son capaces de adaptarse y volverse resistente a ellos, conllevando la disminución o pérdida de la efectividad del tratamiento y por ende el avance de la enfermedad. Ejemplo de esto, se da en las etapas avanzadas del cáncer de próstata, donde la castración química, con el paso del tiempo pierde efectividad y la enfermedad pasa a un cáncer de próstata resistente a la castración.

La etapa de resistencia a la castración del cáncer de próstata se ha atribuido a dos mecanismos moleculares principales: el primero se relaciona con el mal funcionamiento y la activación del receptor de andrógenos, que desencadena la activación de genes de proliferación de las células y el segundo que son las vías independientes al mismo, donde la enzima CYP17A1 tiene un papel importante para la producción endógena de andrógenos. Siendo los fármacos inhibidores de la actividad de la CYP17A1 y la activación del receptor de andrógenos son la elección para tratar este estadio del cáncer.

En el presente trabajo se estudiaron mediante métodos computacionales a ocho estructuras derivadas de la sapogenina diosgenina, una molécula que se ha reportado tiene poder anticancerígeno y utilizando dos plataformas de acoplamiento molecular y las metodologías de acoplamiento flexible de AutoDock VINA y la de ajuste inducido de Schrödinger se determinó que todas tienen afinidad por el sitio activo la CYP17A1 y únicamente cuatro tienen por el sitio de unión a ligando del receptor de andrógenos. Con los resultados del acoplamiento se determino la actividad inhibitoria de las moléculas basándose en las energías de interacción y su interacción con los residuos clave de ambas proteínas, donde los resultados de AutoDock VINA indican a las moléculas: 5aOHLaxo, oxima-*i*-esteroide y glyiesteroide como inhibidores específicos de la enzima CYP17A1. Mientras que, con base a los resultados obtenidos con el software Schrödinger, la diosgenina, 5aOHLaxo y oxima-*i*-esteroide son las que pueden tener esta actividad. También se realizó el acoplamiento de las sapogeninas con la enzima CYP21A2, esto para proponer aquellas estructuras que fueran a inhibir a la CYP17A1 y no a otra, los resultados mostraron que el único posible inhibidor específico de la CYP17A1 es la molécula oxima-*i*-esteroide.

Adicionalmente, debido a que los resultados mostraron que es difícil inhibir únicamente a la CYP17A1, se estudió de manera bioinformática los sitios activos de las dos enzimas CYP utilizadas y se obtuvo que a nivel estructural y nivel de secuencia se conservan los residuos Arg239, Glu305, Thr306, Val366, Asp298 y Val489 de la CYP17A1 con la Arg234, Glu295, Thr296, Val359, Asp288 y Val470 de la CYP21A2, los cuales interactúan en ambas enzimas con las moléculas estudiadas y causan que el único inhibidor específico para la CYP17A1 de las ocho estructuras estudiadas sea el oxima-*i*-esteroide.

Contenido

Capítulo 1	7
Introducción	7
Capítulo 2	9
Antecedentes.....	9
2.1 Cáncer de próstata: Generalidades, tratamiento y etapa de resistencia a la castración. .	9
2.2 Saponinas, sapogeninas y diosgeninas.....	13
2.3 Citocromo P450 17A1 (CYP17A1).	15
2.4 Inhibidores de la enzima CYP17A1.....	18
2.5 Acoplamiento molecular de la enzima CYP17A1.....	20
2.6 Receptores de andrógenos.....	21
Capítulo 3	22
3.1 Planteamiento y Justificación	22
3.2 Hipótesis.....	23
3.3 Objetivo general y objetivos específicos.....	23
Objetivo general.....	23
Objetivos específicos	23
Capítulo 4	25
Marco Teórico.....	25
4.1 Mecánica Cuántica.....	25
4.2 Teoría de funcionales de la densidad (DFT).....	28
4.3 Funciones de Base	30
4.4 Acoplamiento molecular.....	32
4.5 Análisis bioinformático	35
Capítulo 5	37
Metodología.....	37
5.1 Cálculos de optimización de la geometría molecular.....	37
5.2 Acoplamiento molecular	39
5.3 Acoplamiento de Autodock Vina.....	40
5.4 Acoplamiento en Schrödinger	41
5.5 Análisis bioinformático	42
Capítulo 6	44
Discusión y resultados	44
6.1 Cálculo de las geometrías moleculares optimizadas	44

6.2 Acoplamiento molecular empleando el software Autodock Vina.....	46
6.3 Acoplamiento molecular empleando el software Schrödinger.....	54
6.4 Comparación de los resultados entre Autodock Vina y Schrödinger del acoplamiento molecular entre la enzima CYP17A1 y las sapogeninas	58
6.5 Comparación de los resultados entre Autodock Vina y Schrödinger del acoplamiento molecular entre la enzima CYP21A2 y las sapogeninas	62
6.6 Comparación de los resultados entre Autodock Vina y Schrödinger del acoplamiento molecular entre la enzima CYP17A2 y las sapogeninas	68
6.7 Comparación de los resultados entre Autodock Vina y Schrödinger del acoplamiento molecular entre las enzimas CYP17A1 y CYP21A2.....	70
6.8 Receptor de andógenos (RA).....	71
6.9 Análisis bioinformático	74
Capítulo 7	79
Conclusiones	79
Capítulo 8	81
Bibliografía.....	81
Apendice A	94
Apendice B	95
Apendice C	98
Apendice D	99

Capítulo 1

Introducción

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer es un conjunto de enfermedades caracterizado por la rápida proliferación de células anormales con origen en cualquier región del cuerpo y con la capacidad de extenderse a regiones ya sean adyacentes o distantes del cuerpo [1]. En 2020, cerca de 10 millones de personas murieron a causa del cáncer, convirtiéndola en la primera causa de muerte a nivel mundial [2]. Estadísticas del mismo año, posicionaron al cáncer de mama, cáncer de pulmón y cáncer de próstata como los más diagnosticados, siendo el cáncer de pulmón e hígado, así como el de estómago los más mortales [3].

Actualmente, se cuenta con una amplia variedad de tratamientos quimioterápicos y antineoplásicos que se utilizan en la lucha contra el cáncer. Pero, la generación de resistencia por parte de las células cancerosas ha llevado a la búsqueda o desarrollo de nuevas moléculas que puedan servir como tratamientos de esta enfermedad. Bajo este contexto, la identificación y extracción de compuestos naturales ha cobrado gran importancia debido a que, por miles de años, las plantas se han utilizado para prevenir y tratar diversas enfermedades como el cáncer y la diabetes.

Específicamente, los esteroides de origen natural o sintético han sido una clase de compuestos que han mostrado una gran variedad de muchas actividades biológicas, volviéndolos un área de interés en la investigación científica [4,5]. En la oncología son ampliamente utilizados debido a los beneficios que tienen en el paciente y los efectos anticancerígenos que pueden presentar [6]. Entre los esteroides sintéticos que se usan en el tratamiento del cáncer se tiene por ejemplo a los compuestos de prednisolona, metilprednisolona, dexametasona [7] y la fluoximesterona [8].

Los compuestos naturales con actividad biológica comprobada pueden servir como base para el diseño y síntesis de nuevos compuestos [9,10], abriendo una ventana de oportunidad para mejorar la actividad intrínseca que un compuesto puede tener o puede darle un nuevo efecto.

En este trabajo se estudia mediante métodos *in-silico* a derivados de sapogeninas sintetizadas por Carrasco y col., [11] buscando su aplicación en el tratamiento para el cáncer de próstata resistente a la castración (CPRC).

La estructura que esta tesis es la siguiente:

Capítulo 1 Introducción: Se presenta un panorama general de las estadísticas del cáncer a nivel mundial, así como la importancia del uso de esteroides naturales o sintéticos como un tratamiento para esta enfermedad.

Capítulo 2 Antecedentes: En este capítulo se presentan los antecedentes del cáncer de próstata, donde, por ejemplo, se mencionan las generalidades del padecimiento, su tratamiento y su avance a un fenotipo de resistencia a la castración, incluyendo sus mecanismos moleculares. También, se mencionan las características químicas de las sapogeninas y mecanismos de acción de diosgenina, así como la estructura base de las moléculas estudiadas. Adicionalmente, se mencionan las características moleculares de las enzimas estudiadas, al igual que los datos de acoplamiento en la CYP17A1 ya realizados.

Capítulo 3 Planteamiento, justificación, hipótesis y objetivos: En este capítulo se hace mención acerca del planteamiento del problema, la hipótesis del trabajo y los diferentes objetivos que se plantean en este trabajo de tesis.

Capítulo 4 Marco teórico: Para poder desarrollar el presente proyecto, se presenta el marco teórico correspondiente a las metodologías utilizadas para el desarrollo adecuado del manuscrito, la cual abarca la parte de química cuántica, bioinformática y biología computacional.

Capítulo 5 Metodología: Se describen las metodologías utilizadas, así como el flujo de trabajo para el procesamiento de las diferentes macromoléculas y moléculas pequeñas que fueron utilizadas. Para ello, en cada apartado se justifica el uso de cada metodología aplicada.

Capítulo 6 Resultados y discusiones: Se exponen los resultados obtenidos de los diferentes acoplamientos moleculares realizados con las ocho sapogeninas estudiadas, el análisis del sitio activo entre las CYP17A1 y la CYP21A2.

Capítulo 7 Conclusiones: Se recapitula los resultados más relevantes obtenidos del presente trabajo y una perspectiva del trabajo subsecuente a corto plazo.

Capítulo 8 Bibliografía: Finalmente, en este capítulo se enlista y se numeran las referencias utilizadas para contextualizar y validar el trabajo. Cabe señalar que en la parte final del manuscrito también son enlistados 4 apéndices que complementan la presente tesis de grado.

Capítulo 2

Antecedentes

2.1 Cáncer de próstata: Generalidades, tratamiento y etapa de resistencia a la castración.

Se habla de cáncer de próstata (CPa) o adenocarcinoma de próstata cuando el sitio de origen de las células tumorales es la próstata, una glándula accesoria del sistema reproductor masculino, cuya función principal es la secreción de fluidos constituyentes del semen, así como la producción de hormonas androgénicas. Las estructuras funcionales de esta glándula son los acinos que están compuestos por células epiteliales y estromales [12], con predominio de las células glandulares que segregan el antígeno prostático específico (PSA) [13]. Investigaciones hechas por Lee & Shen han demostrado que las células luminales y basales del epitelio son los dos linajes celulares de la próstata más susceptibles a dar origen a un tumor maligno [14].

Desde hace años es sabido que el crecimiento, diferenciación y mantenimiento de la actividad de la glándula prostática, es dependiente de los andrógenos [15], hormonas sexuales derivadas del metabolismo de los esteroides y cuya función es promover el desarrollo de las características sexuales del hombre. La testosterona es el andrógeno más conocido, el cual al ser metabolizado por las células de la próstata es convertido a dihidrotestosterona (DHT), la cual es considerada el andrógeno más potente del cuerpo, por su alto acoplamiento con el receptor de andrógenos y su estrecha relación con el crecimiento de la próstata [16]. Es atribuida a la relación metabolismo prostático-señalización de andrógenos, el origen y el avance del cáncer de próstata a un fenotipo resistente a la quimioterapia y castración [17-19].

La Sociedad Americana del Cáncer (American Cancer Society) menciona que, para clasificar los distintos niveles de cáncer de próstata, se utiliza el sistema de Gleason, una puntuación basada en el grado de similitud entre las células en el tejido canceroso y las células del tejido normal cuando son observadas bajo el microscopio [20]. En la puntuación de Gleason se evalúan tanto la arquitectura primaria o más predominante como la segunda más visible o secundaria del tumor, evaluando los resultados con valores que van desde 1 hasta 5 [21].

Adicional a la puntuación de Gleason, el estado patológico se puede medir con el sistema de clasificación TNM (ver Tabla 1), desarrollado por el Comité Conjunto Estadounidense sobre el Cáncer (American Joint Committee on Cancer), el cual considera aspectos como la extensión del Tumor (T), involucramiento de los nodos linfáticos (N), presencia de metástasis (M), la concentración de PSA y la puntuación de Gleason [22].

Tabla 1: Sistema de clasificación TNM para cáncer de próstata basada en el AJCC Cancer Staging Manual [23]

Estadio	T	N	M	PSA (ng/ml)	Gleason
I	T1a-c	N0	M0	<10	≤6
	T2a	N0	M0	<10	≤6
IIa	T1a-c	N0	M0	PSA<20	7
	T1a-c	N0	M0	PSA≥10 <20	≤6
	T2a	N0	M0	PSA≥10 <20	≤6
	T2a	N0	M0	PSA<20	7
	T2b	N0	M0	PSA<20	≤7
IIb	T2c	N0	M0	Cualquiera	Cualquiera
	T1-2	N0	M0	PSA≥20	Cualquiera
	T1-2	N0	M0	Cualquiera	≥8
III	T3a-b	N0	M0	Cualquiera	Cualquiera
IV	T4	N0	M0	Cualquiera	Cualquiera
	Cualquiera	N1	M0	Cualquiera	Cualquiera
	Cualquiera	Cualquiera	M1	Cualquiera	Cualquiera

T1a: Cáncer presente en menos del 5 % del tejido extirpado. T1b: Cáncer presente en el 5 % o más del tejido extirpado. T1c: Cáncer diagnosticado por biopsia debido a un elevado nivel de PSA. T2a : El tumor ha invadido la mitad (o menos) de un lado de la próstata. T2b: El tumor se ha propagado a más de la mitad de un lado de la próstata, pero no a ambos lados. T2c: el cáncer ha invadido ambos lados de la próstata. T3a: El tumor se ha desarrollado fuera de la próstata; sin embargo, no se ha propagado a las vesículas seminales. T3b: El tumor se ha diseminado a las vesículas seminales. T4: el tumor se ha propagado a los tejidos próximos a la próstata distintos de las vesículas seminales. N0: El tumor no se ha propagado a los ganglios linfáticos cercanos. N1: El tumor se ha propagado a los ganglios linfáticos cercanos. M0: El cáncer no ha hecho metástasis a otras áreas del cuerpo más allá de los ganglios linfáticos cercanos. M1: El cáncer ha hecho metástasis a partes distantes del cuerpo.

Las opciones de tratamientos para el cáncer prostático dependen del estadio en el que se encuentre. Si el tumor se encuentra localizado, algunas de las opciones más recomendadas son: Vigilancia activa, prostatectomía radical, radioterapia de haz externo (XRT), braquiterapia y crioterapia. Mientras que, si el tumor es recurrente después de la terapia local o se ha vuelto metastásico se dice que está en etapas avanzadas y las opciones recomendadas son: Terapia hormonal, quimioterapia o bien opciones emergentes [24].

Específicamente, con la terapia hormonal se busca por todos los medios reducir los niveles de andrógenos en el organismo y con esto evitar la activación del receptor de andrógenos. Esta acción de bloquear la producción de andrógenos se llama castración y puede realizarse de manera quirúrgica o química [25].

La castración quirúrgica busca remover los testículos y así evitar la producción de andrógenos, mientras que la castración química o también conocida como terapia de privación de andrógenos (ADT), busca con medicamentos cuyo principio activo sea antagonista de la hormona liberadora de la hormona llamada luteinizante o LHRH, bloquear la señalización de la producción de los andrógenos [26].

En los últimos años, el uso de la ADT se aplica en pacientes con cáncer de próstata cuando se encuentra en etapa avanzada. Las estadísticas del uso de la ADT son buenas, mostrando tasas de respuesta que van del 80%-90% [27]. Adicionalmente, en el cáncer de próstata de bajo riesgo, el 85% de los pacientes que aceptan la ADT postoperatoria obtienen una tasa de supervivencia promedio de por lo menos 5 años [28]. Además, por si sola la ADT ha mostrado una efectividad entre el 80-90% en los pacientes ayudando a bajar los niveles de PSA en el suero sanguíneo de personas con metástasis [29].

A pesar de los datos estadísticos de efectividad que han mostrado los tratamientos de la ADT contra el cáncer de próstata, desafortunadamente la efectividad de estos disminuye entorno a los 2-3 años posteriores a dichos tratamientos, lo cual se refleja en el alza de la concentración de testosterona a niveles mayores de 20 ng/dl [30] en el plasma sanguíneo. Siendo en este punto que el cáncer se denomina cáncer de próstata resistente a la castración (CPRC), el cual tienen una baja prognosis y una vida media del paciente de 16-18 meses [31].

El CPRC se ha relacionado con diferentes mecanismos moleculares que llevan a su desarrollo, teniendo como principales responsables por ejemplo la vía relacionada con el receptor de andrógenos o RA y las vías independientes al mismo, las cuales

se pueden observar en la Figura 1 [32]. Entre las vías dependientes del receptor de andrógenos se incluye la amplificación de su gen y la sobreexpresión de la proteína, mutaciones puntuales, expresión de variantes resultantes del splicing, alteración en la expresión de co-reguladores, modificaciones post-traslacionales aberrantes y la síntesis de hormonas esteroides intratumorales [33].

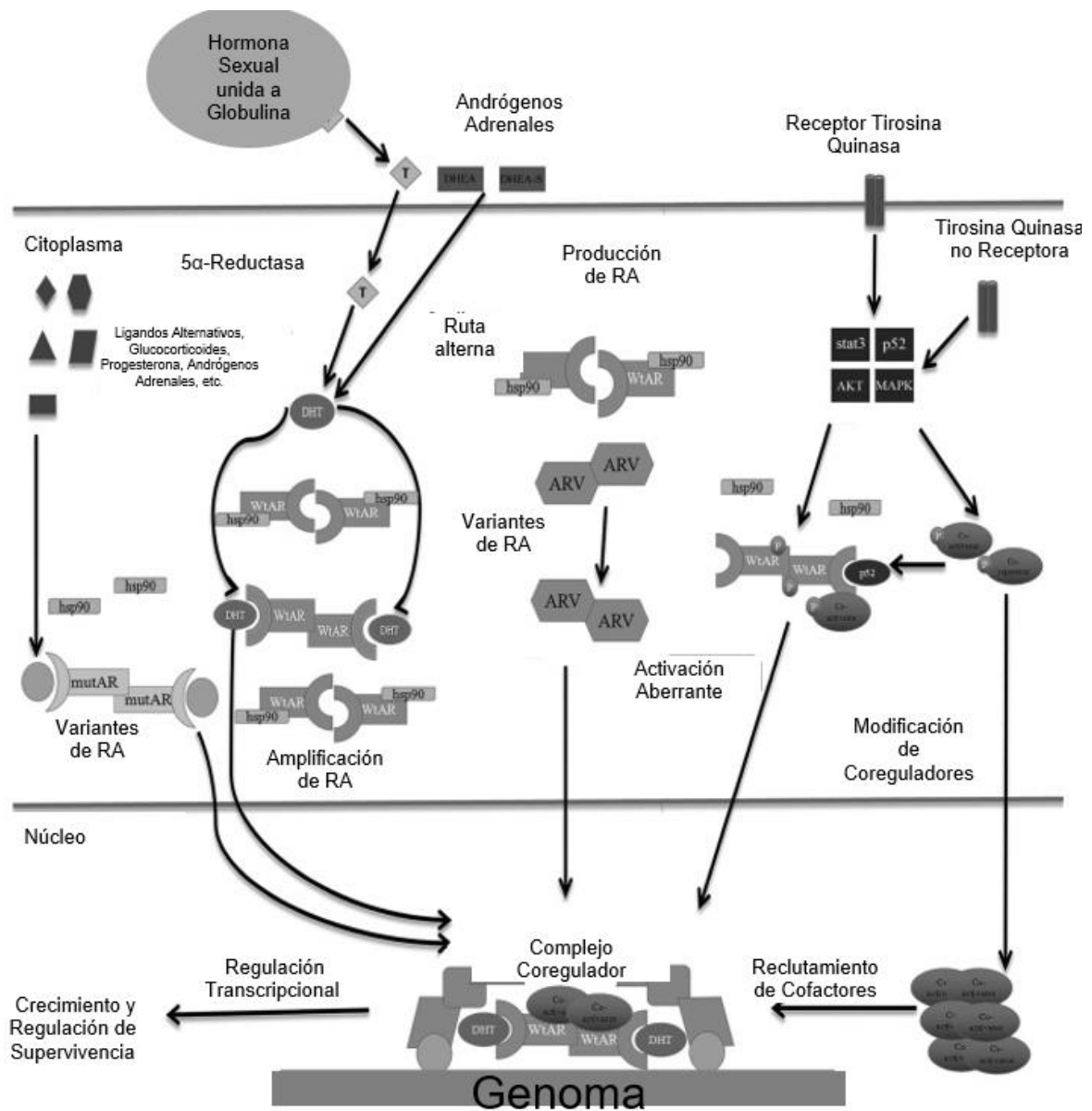


Figura 1: Principales vías y mecanismos moleculares implicados en el desarrollo del cáncer de próstata, tomada de Huang et al. (2018) [32].

2.2 Saponinas, sapogeninas y diosgenina.

Las sapogeninas son compuestos orgánicos policíclicos de tipo esteroidal derivadas de la hidrólisis de las saponinas, una clase de metabolitos secundarios (glucósidos esteroidales) sintetizados por las plantas. La estructura completa de la saponina es mostrada en la Figura 2, esta se compone de una parte sacárida y una no sacarida, unidas por un enlace glucosídico en el carbono 3. La parte sacarida se compone de ciertos monosacáridos o cadenas oligosacáridas compuestas ya sea de: Glucosa, galactosa, manosa, ramnosa, fucosa, etc [34]. Mientras tanto, la parte no sacarida que también es conocida como aglicona o sapogenina, puede dividirse en 3 clases: Triterpenoides glucósidos, glucósidos esteroides y glucósidos esteroides alcalinos [35].

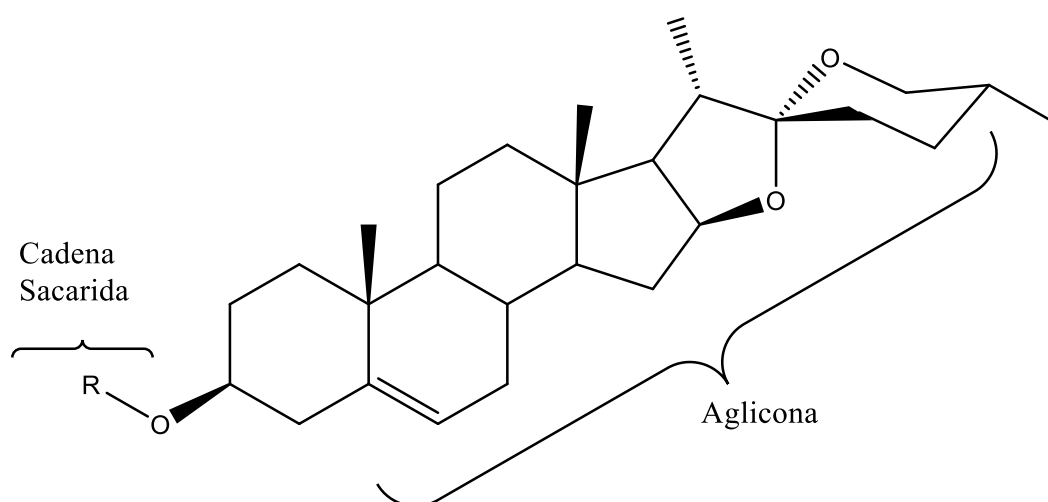


Figura 2: Estructura general de una saponina.

Las saponinas pueden subdividirse en dos clases dependiendo de la estructura de la aglicona. Por ejemplo, si cuenta con una estructura central compuesta por 6 anillos, pertenecen a la subclase de los espirostanos y si cuentan con una estructura de 5 anillos pertenecen a la clase de los furostanos o bisnorlactónico (según la función del 5to anillo). Además, las saponinas se encuentran en una amplia variedad de especies dicotiledóneas como *Glycine Max* [36], *Hippocastani*, *Ginseng* [37] entre otras. En plantas de origen mexicano se han encontrado en chaya silvestre (*Cnidosculus chayamansa*) [38], gobernadora (*Larrea tridentata*) y sangre de drago (*Jatropha dioica* Sessé) [39].

Estos compuestos cuentan con una amplia variedad de actividades biológicas comprobadas, entre las que se encuentra la citotoxicidad de células cancerígenas

[40], como la línea MCF de cáncer de mama y la línea de cáncer en fibroblastos L20B de cáncer [41]. Está sobre todo comprobado que la actividad anticancerígena de las saponinas se conserva en la parte de la sapogenina, principalmente cuando se realiza el proceso de hidrólisis del compuesto (saponina) y se separa en sus dos componentes (sapogenina y el glúcosido) [42].

Por otro lado, la molécula de diogenina es el derivado de la parte no sacárida de la molécula de dioscina, cuenta sobre todo con la capacidad de reducir los niveles de glucosa en sangre, suprimir la inflamación e inducir la apoptosis en una variedad de células tumorales [43]. Adicionalmente, la molécula de diosgenina es de gran interés en la síntesis orgánica debido a su uso como principal precursor de varias drogas esteroideas como los compuestos de pregnenolona y progesterona [44].

A nivel molecular, los mecanismos anticancerígenos que tiene esta molécula se relacionan con la interrupción de la vía TNF- α , así como la capacidad de inhibir la vía de STAT3 relacionada con la proliferación, invasión y metástasis, Figura 3 [45].

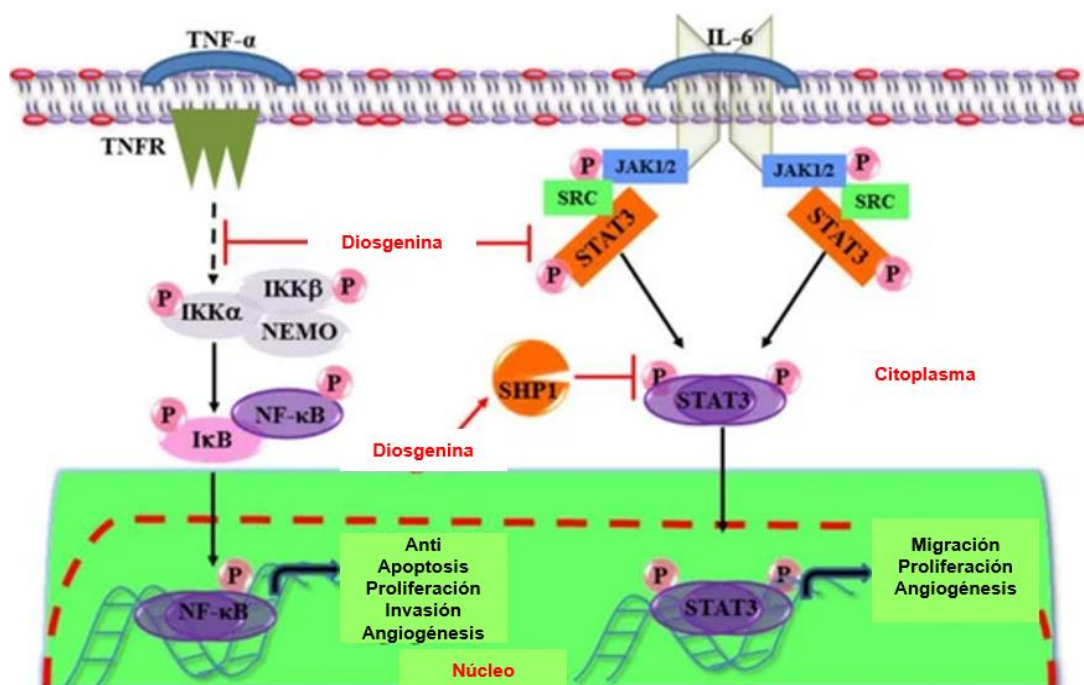


Figura 3: Mecanismos a nivel molecular de la molécula de diosgenina con acción anticancerígena. Fuente: Sethi et al. (2018) [45].

Además, se ha comprobado que cuenta con propiedades para inducir apoptosis a través de la vía dependiente de las caspasas [46], inducir la autofagia [47] y volver sensibles líneas celulares resistentes a ciertos fármacos [48]. Para la realización del

presente trabajo se utilizaron como ensayo ocho moléculas de sapogeninas derivadas sintéticamente de la diosgenina, las cuales están compuestas de 6 anillos (espirostanos) y que son derivadas de la diosgenina.

2.3 Citocromo P450 17A1 (CYP17A1).

El citocromo P450 (CYP450) es un complejo enzimático capaz de catalizar una amplia variedad de reacciones químicas entre las que se destacan la hidroxilación, oxigenación de heteroátomos, liberación de heteroátomos y formación de epóxidos [49], las cuales son necesarias para llevar a cabo el metabolismo de xenobióticos, drogas y esteroides. En el humano se han encontrado al menos 57 genes diferentes asociados a CYP450, cada uno con una función específica dentro del metabolismo [50].

Por otra parte, la proteína esteroide 17- α -hidrolasa/17,20-liasa o CYP17A1 (por sus siglas Citocromo P450 de la familia 17 subclase A miembro 1) es una enzima membranal del retículo endoplasmático codificada por el gen CYP17A1 en *Homo sapiens* [51]. Esta proteína se encuentra localizada en el cromosoma 10, con un tamaño de 6569 pb, divididos en 8 exones y 7 intrones [52]. La expresión de esta enzima, según lo reportado en la base de datos Bgee suite [53], se origina en más de 120 tipos celulares distintos, siendo las células de las glándulas adrenales las que más lo expresan, seguido de las de testículo y próstata.

Estructuralmente, la enzima CYP17A1 se encuentra conformada por 508 residuos y cuenta con una fosforilación post-traduccional necesaria para activar la actividad de liasa [54]. Los residuos catalíticos de esta enzima aún no se conocen por completo, pero gracias a varios estudios de mutagénesis dirigida presentados en la Tabla 2, se ha empezado a elucidar el papel de ciertos residuos en relación con la unión de los ligandos de la enzima, sitios de unión a cofactores y papel en la reacción.

Tabla 2: Resumen de trabajos donde se determinó el papel de los residuos del sitio activo de la enzima CYP17A1.

Mutación	Efecto	Referencia
E305G	Deficiencia de la actividad liasa	[55]
N202S	Cambios en la preferencia de los sustratos y velocidad de conversión a DHEA.	[56]

R347H y R358Q	Destrucción de la actividad liasa.	[57]
F114V y D116V	Deficiencia parcial de la actividad hidrolasa y total de la actividad liasa.	[58]
R347C y R347H	Deficiencia parcial de la actividad liasa.	[58]
A105L	Cambios en la afinidad de los sustratos y cambio del sitio de hidroxilación.	[59]

La CYP17A1 como su nombre lo indica, presenta una actividad bifuncional, por un lado, es una 17- α hidrolasa y por otro es una 17,20- liasa. Ambas actividades de esta enzima son indiscutiblemente necesarias para la producción de las hormonas sexuales, mineralocorticoides y glucocorticoides, siendo principalmente el tipo de hormona esteroidea sintetizada dependiente de la reacción que se realice [60].

Dentro de la ruta esteroidogénica la enzima CYP17A1 cataliza varias reacciones, siendo principalmente 3 oxidaciones de acuerdo con la Figura 4: la 17- α hidroxilación de la pregnenolona a 17 α -hidroxipregnenolona, la conversión de 17 α -hidroxipregnenolona en dehidroepiandrosterona (DHEA) y la 17- α hidroxilación de la progesterona a 17 α -hidroxiprogestero y luego a androstenediona [61]. Cada reacción mediada por esta enzima requiere de un cofactor diferente. La actividad 17-hidrolasa requiere del citocromo P40 reductasa (POR) y la actividad liasa del citocromo b5 (Cypb5). La formación del complejo CYP17A1/b5 o CYP17A1/POR se encuentra modulada por el sustrato, existiendo regulación alostérica entre el sitio activo y el sitio de unión de b5 [63]

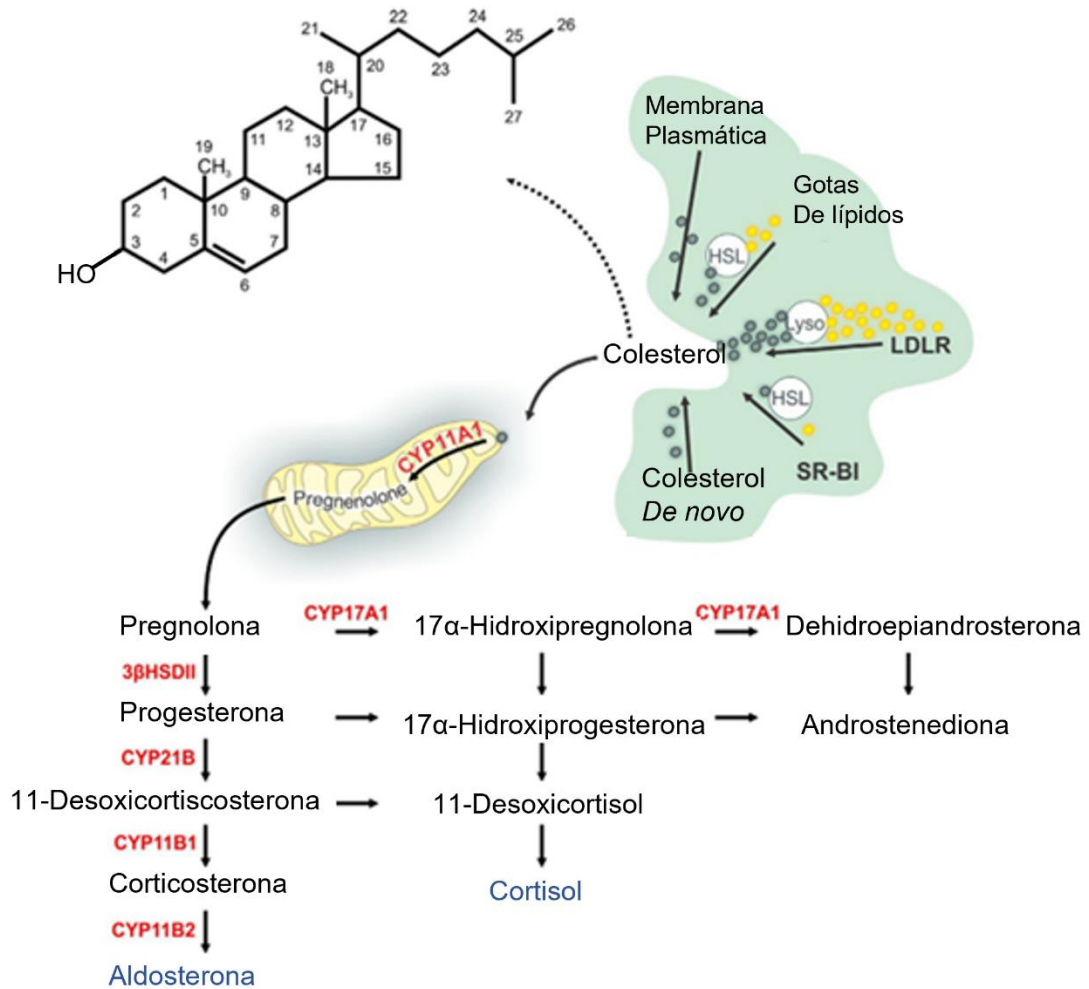


Figura 4: Ruta de la síntesis de hormonas esteroides. Entrada a la célula mediada por mediadores como la LDL y las reacciones metabólicas más importantes realizadas dentro de la mitocondria para dar origen a la aldosterona y cortisol.

Fuente: Martínez-Arguelles & Papadopoulos (2019) [62].

Debido a que la enzima CYP17A1 se relaciona directamente con la producción de andrógenos, puede verse como un posible blanco terapéutico para el tratamiento del CPRC puesto que, una vez bloqueada la producción de andrógenos por medio de la ADT, las células cancerígenas de la próstata siguen creciendo al tomar del medio DHEA y androstenediona, ambos liberados por las glándulas suprarrenales o por el microambiente tumoral y convertirlos en testosterona (Figura 5) [64]. La testosterona dentro de las células de la próstata es convertida a DHT, un andrógeno capaz de unirse y activar al RA [65], el cual es capaz de transcribir varios genes relacionados

con el desarrollo, manutención y función de la próstata [66], que en caso de células cancerígenas se relacionan con su proliferación [67].

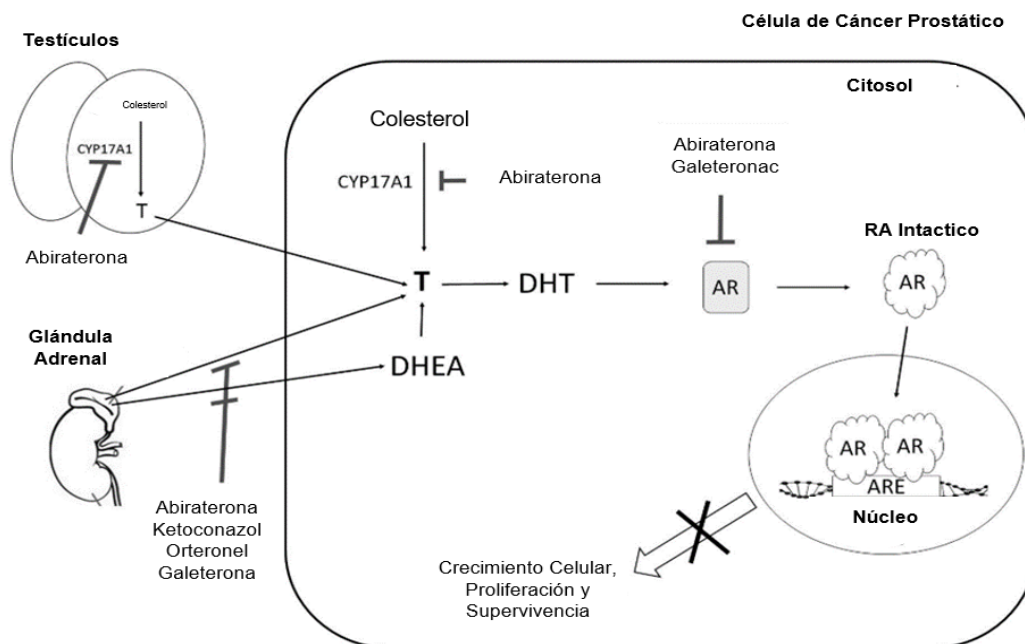


Figura 5: Ruta esquemática de conversión de la DHEA a testosterona y relación con la activación de la señalización del receptor de andrógenos en células de cáncer de próstata. Fuente: Sivonova et al. (2017) [68].

La selección de la enzima CYP17A1 como blanco terapéutico para el desarrollo de esta tesis, es debido al papel que tiene como generador determinante en la síntesis de hormonas androgénicas y su relación directa con la progresión del cáncer de próstata al producir andrógenos intracelulares.

2.4 Inhibidores de la enzima CYP17A1.

El uso de moléculas inhibitorias de la enzima CYP17A1 busca disminuir los niveles de andrógenos en el organismo y por ende combatir enfermedades o padecimientos androgenodependientes como el CPRC. En la actualidad, se han encontrado y sintetizado varias moléculas que pueden cumplir con este objetivo, las cuales según su mecanismo de acción se pueden dividir en dos clases de acuerdo con Figura 6. Los inhibidores de tipo I que desplazan a la molécula de agua como sexto ligando del átomo de Hierro (Fe) del grupo hemo, permitiendo una coordinación con el metal en un estado pentacoordinado; y los tipos II, que interactúan como sexto ligando con

el grupo hemo y en algunos casos, con residuos de aminoácidos próximos al sitio del grupo hemo [69].

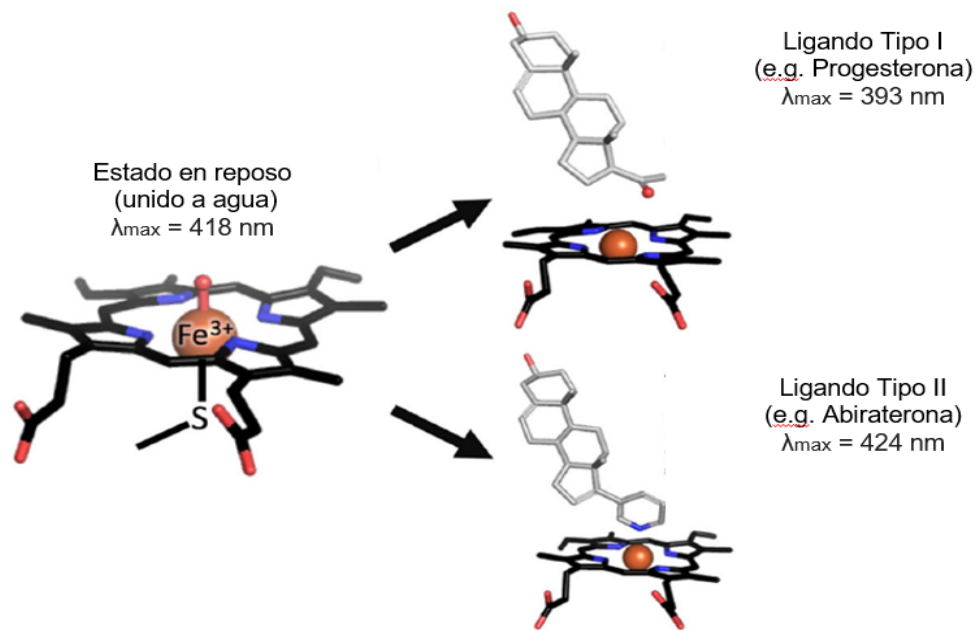


Figura 6: Esquema de los 2 tipos de ligandos que hay en la enzima CYP17A1 debido a su interacción con el grupo Hemo. Fuente: Yadav et al. (2017) [70].

En el año 2011, la U.S. Food and Drug Administration (US-FDA) permitió el uso del primer inhibidor específico de la enzima CYP17A1 como un potencial tratamiento quimioterapéutico enfocado al CPRC. Este fármaco es la abiraterona acetato, que en combinación con prednisona, puede ser utilizado para tratar a los pacientes con CPRC mostrando una reducción del riesgo de muerte del 35% y una media de vida de 15.8 meses comparado con 11.2 meses del grupo placebo [71]. Como pasa con otras terapias anticancerígenas, desgraciadamente la gran mayoría de las células del CPRC han demostrado volverse resistentes a la terapia con abiraterona acetato, lo cual se han atribuido a mutaciones en el RA [72]. Otros inhibidores de la enzima CYP17A1 que se han propuesto y estudiado en diferentes fases clínicas son por ejemplo los compuestos: VT-464-(S)-orteronel (TAK-700), galeterone (TOK-001), CFG-920 y EN3356 [73].

A pesar de que los fármacos anticancerígenos utilizados para tratar el PCa pueden llegar a ser ciertamente selectivos a alguna de las dos actividades que presenta la enzima CYP17A1, existen estudios como el realizado en 2016 por Udhane et al.

[74], donde han demostrado que la abiraterona acetato no lo es, ya que afecta a ambas actividades y también a la enzima CYP21A2. Adicional a esto, en estudios *in vitro* se ha demostrado con varios estudios que la sustancia abiraterona tiene una alta capacidad inhibitoria de otras enzimas de la misma familia como son las enzimas: CYP1A2, CYP2D6 y CYP2C8, así como una capacidad moderada de inhibición de las enzimas: CYP2C9, CYP2C19 y CYP3A4/5 [75]. Por lo anterior, y debido a que afecta varios puntos del metabolismo celular y no solo a la producción de andrógenos, es necesario que al proponer nuevos compuestos anticancerígenos inhibidores de la actividad de CYP17A1 se tomen en cuenta las demás proteínas de la familia.

2.5 Acoplamiento molecular de la enzima CYP17A1.

Una de las enzimas seleccionadas para ser estudiada en el presente trabajo es la enzima CYP17A1, la cual ha sido objeto de varios estudios computacionales que han permitido determinar su sitio activo, elucidar los residuos involucrados en la unión a sus ligantes y comprender las características estructurales del complejo enzima-ligando, como lo es la geometría de las moléculas interaccionantes una vez colocadas dentro del sitio activo. Así, los diferentes residuos que se han encontrado como necesarios para llevar acabo un acoplamiento molecular usando una variedad selecta de programas computacionales para describir de manera más adecuada la interacción con los diversos tipos de ligandos se muestran en la Tabla 3. En la tabla se muestran los tipos de ligandos involucrados en el Docking Molecular, los valores de energía obtenidos durante los cálculos, los residuos del sitio activo y algunas referencias encontradas para cada estudio realizado.

Tabla 3: Estudios de los acoplamientos moleculares realizados entre varios ligandos y la enzima CYP17A1

Programa computacional	Tipos de ligando probados	Valores de energía de acoplamiento (kcal/mol)	Residuos claves del sitio activo involucrados en la unión del ligando	Referencia
AUTODOCK 4.0	Inhibidores análogos	(-6.77)–(-10.88)	Phe114, Try201, Asn202,	[76]

	de la pregnolona		Ile205, Ile206, Gly301, Ala302, Glu305, Thr306, Ile371, Val482 y Val483	
Autodock4.2	Inhibidores análogos de la pregnolona	(-7.73)–(-12.31)	Ala365, Ala330 y Arg212	[77]
Schrödinger 9.4	Inhibidores de ésteres de ftalato	(-3.00)–(-9.00)	Ile443, Gly444, Ile371, Leu370, Phe301, Met262, Phe132, Ser441, Thr307, Thr306	[78]
Sybyl	Inhibidores no esteroideos diversos	—	Asn202, Ala105, Arg239,	[79]
—	Inhibidor glucósido esteroideo	—	Asn202 y Arg239,	[80]

— Información no reportada en el artículo.

2.6 Receptores de andrógenos.

El receptor de andrógenos es un factor de transcripción de la superfamilia de los receptores de hormonas esteroideas con actividad dependiente del ligando. El RA se encuentra en el cromosoma X, en un gen de tamaño 2757pb que codifica para una proteína de 919 aminoácidos en 8 exones [81]. Estructuralmente, se compone básicamente de 3 dominios funcionales: El dominio N-terminal, el dominio de unión a DNA y por último el dominio de unión a ligando (LBD) en el C-terminal. En el atlas de proteínas humanas [82], se tiene registrado que las células con mayor expresión son las del epidídimo y las vesículas seminales, seguidas del riñón y los testículos. La activación del RA es mediada por los andrógenos, principalmente la testosterona y la DHT. Cuando un compuesto agonista se une al LBD, el RA sufre un importante cambio conformacional que afecta notablemente a la posición de la hélice 12 α del C-terminal, permitiéndole reclutar co-activadores que le ayudan a activar los genes bajo su control [83]. La inhibición de la activación de RA se utiliza para el tratamiento del CPRC, administrando antagonistas que se unan al LBD como las sustancias enzalutamida, ARN-509, TOK-001, entre otros [84].

Dado que algunos de los mecanismos de resistencia a la castración que desarrolla el cáncer de próstata, se relacionan principalmente con la activación de RA, fue que se decidió además de probar las moléculas estudiadas en la CYP17A1, realizar el acoplamiento con el LBD de RA. Cubriendo así dos posibles vías relacionadas con el avance del CPRC como posibles candidatas para realizar un estudio basado en métodos computacionales que ayuden a explicar los mecanismos de acción en la desactivación de la señalización del receptor de andrógenos en células de cáncer de próstata.

Tabla 4: Estudios de los acoplamientos moleculares realizados entre varios ligandos y el receptor de andrógenos.

Programa computacional	Tipos de ligando probados	Valores de energía de acoplamiento (kcal/mol)	Residuos claves involucrados en la unión del ligando	Referencia
Argus Lab 4.0.1	Inhibidores fitoquímicos	(-10.32)–(-13.92)	Leu873, Gly708, Arg752, Gln711, Met745, y Met749	[85]
Schrödinger 9.0	Inhibidores de diversa naturaleza	(-11.35)–(-13.18)	Arg752, Gln711, Met749, Phe764, y Met787	[86]
MOE Dock	Substancias endocrinas activas	(-8.38)–(-11.35)	-	[87]

— Información no reportada en el artículo.

Capítulo 3

3.1 Planteamiento y Justificación

En el año 2020, la agencia internacional para la investigación del cáncer reportó más de 90,000 muertes por cáncer en nuestro país, siendo por lo tanto el cáncer mama, seguido del cáncer de próstata, los dos tipos más diagnosticados con mayor número de muertes y una mayor tasa de mortalidad [88]. Convirtiendo así a esta enfermedad que es indiferente del género y edad, en un punto de atención tanto en su diagnóstico temprano, como en su tratamiento.

En el cáncer de próstata, la pérdida de sensibilidad de las células por la ADT, que produce un fenotipo de CPRC, ha motivado a la búsqueda de nuevas opciones

quimioterapéuticas que sirvan en este estadio del cáncer. Tal como se mostró en los antecedentes de este trabajo de investigación, el uso de moléculas de naturaleza esteroide o la modificación de sustratos endógenos para el desarrollo de posibles inhibidores, es una estrategia que sirve como método para el desarrollo de nuevos fármacos para los blancos terapéuticos del CPRC.

Para ayudar en esta tarea y llevar a cabo ciertas predicciones, las aproximaciones computacionales tales como el acoplamiento molecular, que forma parte del diseño dirigido apoyado por computadora (CADD), son de gran utilidad para aproximar el comportamiento que puede tener una nueva molécula, probando su interacción y proponiendo un posible efecto que puede tener en un cierto blanco terapéutico. Ayuda a realizar un cribado o tamizado más rápido de los miles de compuestos que se han descubierto o sintetizado hasta ahora, bajando los costos y tiempo de investigación en la industria farmacéutica [89].

3.2 Hipótesis

Las ocho sapogeninas estudiadas en este trabajo, dada su naturaleza esteroidea y parecido en estructura química a los andrógenos, tendrán la capacidad de unirse al receptor de andrógenos o a la enzima CYP17A1, interactuando de esta manera con los residuos clave para su funcionamiento, permitiendo así tener un posible inhibidor de la acción de la enzima o proteína.

3.3 Objetivo general y objetivos específicos.

Objetivo general

Describir mediante herramientas *in-silico* las interacciones más probables entre ocho moléculas de sapogeninas con dos de las proteínas relacionadas con el CPRC, tales como la CYP17A1 y el RA.

Objetivos específicos

1. Analizar el acoplamiento molecular del grupo de ocho saponinas y proponerlas con posible actividad anticancerígena en el CPRC, utilizando dos programas basados en los métodos de química computacional.

2. Comparar los resultados del acoplamiento del grupo de sapogeninas con la enzima CYP17A1 y la enzima CYP21A2 para determinar la especificidad por el blanco terapéutico empleando dos programas computacionales.

3. Analizar la interacción entre el grupo de sapogeninas propuestas en este trabajo y el RA usando herramientas de acoplamiento molecular de ajuste inducido.

Capítulo 4

Marco Teórico

La química cuántica computacional es el área de la química encargada de predecir tanto la estructura como las propiedades fisicoquímicas de los átomos y moléculas utilizando algoritmos computacionales, al tratar de obtener una solución aproximada de la ecuación de Schrödinger o ecuación de valor propio. Para realizar estas predicciones, se utilizan los conocimientos de la mecánica cuántica y la mecánica estadística, que en conjunto permiten estudiar a los sistemas químicos con base en las leyes fundamentales que rigen a las partículas subatómicas, relacionando su comportamiento microscópico con el macroscópico. La bibliografía consultada para escribir el marco teórico que sustenta el presente trabajo se basa principalmente en los siguientes libros de texto: Introducción a la química computacional [90], química cuántica [91] y un enfoque químico [92].

4.1 Mecánica Cuántica

Con el nacimiento de la mecánica cuántica en el siglo XX, se generan varias teorías y es en 1926, que el físico austriaco Erwin Schrödinger, publica su trabajo sobre la mecánica ondulatoria y establece una ecuación general que sin duda alguna permite obtener información de los sistemas de partículas subatómicas, utilizando para ellos sus propiedades ondulatorias. De esta manera, la ecuación de Schrödinger permite describir el estado de un sistema de partículas o de una sola partícula utilizando únicamente una función que depende de su posición y evolución en el tiempo, dicha función es llamada función de onda y representada por la letra psi (Ψ). La forma de la ecuación de Schrödinger puede variar en función del número de dimensiones a considerar para describir el sistema, así como de las condiciones del sistema, en forma general se puede escribir la ecuación de la forma:

$$\hat{H}\Psi(\vec{r}, t) = E\Psi(\vec{r}, t) \quad (1)$$

donde \hat{H} es el operador hamiltoniano que considera tanto la energía cinética como la potencial. En específico para moléculas, el hamiltoniano considera a los protones y electrones, así como las interacciones entre partículas de la misma especie y diferentes, formando el llamado hamiltoniano molecular que tiene la forma:

$$\hat{H} = -\frac{\hbar}{2} \sum_{i=1}^{elec} \frac{1}{m_i} \nabla_i^2 - \frac{\hbar}{2} \sum_{\mu=1}^{nucl} \frac{1}{m_\mu} \nabla_\mu^2 + \sum_{\mu=1}^{nucl} \sum_{\nu>\mu} \frac{Z_\mu Z_\nu e^2}{|\vec{R}_\mu - \vec{R}_\nu|} - \sum_{\mu=1}^{nucl} \sum_{i=1}^{elec} \frac{Z_\mu e}{|\vec{r}_i - \vec{R}_\mu|} + \sum_{i=1}^{elec} \sum_{j>i} \frac{e^2}{|\vec{r}_i - \vec{r}_j|} \quad (2)$$

siendo i y j los subíndices que representan a los electrones que forman el sistema molecular, mientras que los subíndices μ y ν se refieren a los núcleos, \vec{R}_μ , \vec{R}_ν y \vec{r}_i , \vec{r}_j corresponde a los vectores de posición entre los núcleos y electrones. En el último término, las variables Z_μ y Z_ν corresponden al número atómico de los núcleos μ y ν . Así, los dos primeros términos de la ecuación (2) son los operadores de energía cinética de los electrones y núcleos, respectivamente. Mientras que los últimos tres términos conciernen a la energía potencial de las repulsiones de los núcleos, la atracción entre electrones y núcleos y la repulsión entre electrones en ese orden.

La resolución de la ecuación de Schrödinger debe generar como resultado la descripción exacta de la energía del sistema estudiado y debe ser aplicable a cualquier sistema atómico o molecular. Un factor importante tomando en cuenta las aproximaciones establecidas, es que la solución de la no debe generar un valor de energía menor al valor experimental.

Una de las primeras aproximaciones que se proponen para resolver la ecuación de Schrödinger, propuesta por Born y Oppenheimer en 1927. La aproximación se basa en considerar la masa de los núcleos mayor a la masa de los electrones, causando que los núcleos se consideren estáticos. Al tomar en cuenta lo anterior, se puede separar el operador hamiltoniano en una parte electrónica y una nuclear, obteniendo la energía total del sistema molecular considerando un hamiltoniano en función de la posición de los electrones llamado hamiltoniano electrónico:

$$\hat{H}_{el}(\vec{r}, \vec{R}_0) \phi_{el}^n(\vec{r}, \vec{R}_0) = E_{el}^n \phi_{el}^n(\vec{r}, \vec{R}_0) \quad (3)$$

La solución de la ecuación de Schrödinger con el hamiltoniano electrónico, permite obtener las energías para diferentes estados electrónicos y por ende diferentes funciones de onda parametrizadas a una configuración nuclear específica. Dado que es posible tener un número infinito de configuraciones de los núcleos, al resolver la ecuación de Schrödinger para cada una de ellas, se obtiene un número infinito de

funciones de onda y sus respectivas energías que en conjunto forman la superficie de energía potencial, que describe el comportamiento de la energía conformacional de una molécula. En muchas ocasiones la resolución de la ecuación de Schrödinger electrónica para átomos polielectrónicos o moléculas considerando la aproximación de Born y Oppenheimer es complicada, entonces es necesario el desarrollo de metodologías matemáticas que ayudaran a resolverla, como lo son los métodos de Hartree-Fock y la teoría de funcionales de la densidad (DFT), dichos métodos serán descritos brevemente a continuación.

El método Hartree-Fock que se usa para calcular las diferentes con formaciones moleculares y sus correspondientes energías electrónicas está basado en dos consideraciones relacionadas al comportamiento de los electrones. En la primera consideración se propone que los electrones sean partículas que no interactúan entre sí, permitiendo que la función de onda total del sistema sea un producto antisimétrico de funciones de spin-orbitales. El producto antisimétrico tiene como característica que debe ser una determinante de Slater de la forma:

$$\Psi(\chi_1, \chi_2, \dots, \chi_N) = \frac{1}{\sqrt{N!}} \begin{vmatrix} \phi_1(\chi_1) & \phi_2(\chi_1) & \dots & \phi_N(\chi_1) \\ \phi_1(\chi_2) & \phi_2(\chi_2) & \dots & \phi_N(\chi_2) \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \phi_1(\chi_N) & \phi_2(\chi_N) & \dots & \phi_N(\chi_N) \end{vmatrix} \quad (4)$$

donde $(N!)^{-1/2}$ es el factor de normalización. Las filas del determinante de Slater se encuentran definidas por los electrones, mientras que las columnas definen a los términos *spin*-orbitales. De esta forma, la antisimetría de la función de onda permite que, al intercambiar las coordenadas de dos electrones, la función de onda cambie de signo, propiedad física que muestran las partículas fermionicas, familia a la que pertenece el electrón.

Esta aproximación considera el determinante de Slater como una función de onda polielectrónica a través del producto de funciones monoeléctricas. Además, este método está basado en el principio variacional el cual trata de encontrar la mejor función de onda de un sistema molecular y con ello pretende que la energía calculada sea igual o mayor a la energía exacta o experimental como ya ha sido mencionado. Usando el principio variacional y el determinante de Slater como una función prueba, es posible es posible minimizar la energía E_{ele} con respecto a la función de onda mediante la siguiente ecuación:

$$\begin{aligned}
E_{ele} = \langle \Psi | \hat{H} | \Psi \rangle &= \sum_a^N \langle \Psi_a(r_1) | h(r_1) | \Psi_a(r_1) \rangle \\
&+ \frac{1}{2} \sum_a^N \sum_b^N \langle \Psi_a(r_1) \Psi_b(r_2) | r_{12}^{-1} | \Psi_a(r_1) \Psi_b(r_2) \rangle \\
&- \langle \Psi_a(r_1) \Psi_b(r_2) | r_{12}^{-1} | \Psi_b(r_1) \Psi_a(r_2) \rangle \quad (5)
\end{aligned}$$

donde \hat{H} es el Hamiltoniano electrónico completo. El primer término de la ecuación (5) es el Hamiltoniano mono-electrónico o de *core*, el segundo se denomina integral de Coulomb y tiene el análogo clásico de la repulsión interelectrónica. Mientras que el tercer término es la integral de intercambio, que aparece como consecuencia de la antisimetría de la función de onda de los electrones y no tiene un análogo clásico. La segunda consideración se encuentra relacionada con el segundo y tercer término de la ecuación anterior, los cuales representan el operador coulombico y el operador de intercambio, respectivamente. Por lo tanto, la solución de la ecuación de Hartree-Fock (llamados nivel RHF o UFH) se resuelve de forma iterativa mediante el método llamado de campo autoconsistente, el cual determina la mejor función de onda electrónica posible y con ello la mejor energía electrónica.

4.2 Teoría de funcionales de la densidad (DFT)

La Teoría del Funcional de la Densidad o DFT fue desarrollada gracias a las aportaciones de Thomas y Fermi, así como las de Hohenberg y Kohn. La teoría DFT se fundamenta en la idea de que la energía de una molécula en estado fundamental es solo funcional de la densidad electrónica. Permitiendo resolver la ecuación de Schrödinger utilizando únicamente el funcional de la densidad electrónica.

La teoría DFT considera al hamiltoniano puramente electrónico y de acuerdo a la aproximación de Born-Oppenheimer en conjunto con el teorema de Hohenberg y Kohn, se obtiene una expresión del hamiltoniano que, en lugar de depender de las coordenadas de cada electrón, lo hace en función de densidad electrónica de la forma:

$$E_{ele} = E_v[\rho_0] = \bar{T}[\rho_0] + \bar{V}_{Ne}[\rho_0] + \bar{V}_{ee}[\rho_0] \quad (6)$$

donde cada uno de los términos de la llamada energía de potencial externo $E_v[\rho_0]$ es un promedio de las interacciones obtenidas de la densidad electrónica.

La ecuación (6) no proporciona una vía práctica para resolver la E_{ele} a partir de la ρ_0 debido a que el funcional definido como $F[\rho_0] \equiv \bar{T}[\rho_0] + \bar{V}_{ee}[\rho_0]$ es desconocido, por lo tanto, es necesario para que sea más práctica su resolución emplear el teorema variacional de Hohenberg-Kohn y el método de aproximación Kohn-Sham propuesto en 1965, el cual permite obtener la densidad ρ_0 y la energía electrónica del estado fundamental E_{ele} a partir de la misma densidad ρ_0 . En principio este método es capaz de obtener resultados exactos, sin embargo, la solución contiene funcionales desconocidos que deben aproximarse, por lo que el método Kohn-Sham genera resultados aproximados.

Para este sistema de electrones no interaccionantes y utilizando varias definiciones consideradas en la teoría DFT, la expresión de la energía electrónica teniendo en cuenta el potencial externo viene dada por la siguiente expresión:

$$E_v[\rho] = \int \rho(\mathbf{r})v(\mathbf{r})d\mathbf{r} + \bar{T}_s[\rho] + \frac{1}{2} \int \int \frac{\rho(\mathbf{r}_1)\rho(\mathbf{r}_2)}{r_{12}} d\mathbf{r}_1 d\mathbf{r}_2 + \Delta\bar{T}[\rho] + \Delta\bar{V}_{ee}[\rho] \quad (7)$$

En esta última ecuación, no se conocen las formas explícitas de los funcionales $\Delta\bar{T}[\rho]$ y $\Delta\bar{V}_{ee}[\rho]$, por lo que es necesario definir el llamado funcional de energía de intercambio y correlación como:

$$E_{XC}[\rho] \equiv \Delta\bar{T}[\rho] + \Delta\bar{V}_{ee}[\rho] \quad (8)$$

Quedando la ecuación (8) rescrita como:

$$E_0 = E_v[\rho] = \int \rho(\mathbf{r})v(\mathbf{r})d\mathbf{r} + \bar{T}_s[\rho] + \frac{1}{2} \int \int \frac{\rho(\mathbf{r}_1)\rho(\mathbf{r}_2)}{r_{12}} d\mathbf{r}_1 d\mathbf{r}_2 + E_{XC}[\rho] \quad (9)$$

Para resolver todas las ecuaciones de la teoría DFT es necesario determinar la función de densidad del estado fundamental y conocer E_{XC} a través de los orbitales de Kohn-Sham, los cuales son descritos para el estado fundamental. Por lo tanto, para obtener $E_{ele} = E_0$ a partir de la densidad ρ se realiza por medio de la ecuación:

$$E_0 = - \sum_{\alpha} Z_{\alpha} \int \frac{\rho(\mathbf{r})}{r_{1\alpha}} d\mathbf{r}_1 - \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n \langle \theta_i^{KS}(1) | \nabla_1^2 | \theta_i^{KS}(1) \rangle + \frac{1}{2} \int \int \frac{\rho(\mathbf{r}_1)\rho(\mathbf{r}_2)}{r_{12}} d\mathbf{r}_1 d\mathbf{r}_2 + E_{ci}[\rho] \quad (10)$$

Finalmente, una vez teniendo la ecuación (10) se necesita encontrar los orbitales de Kohn-Sham siguiendo el principio variacional hasta minimizar la energía E_0 . Además se debe encontrar el funcional de energía de intercambio y correlación E_{XC} , lo cual se hace aplicando otras aproximaciones como la aproximación de la densidad local (LDA) o la aproximación de la densidad de espín (LSDA).

Los funcionales de correlación de gradiente corregido comúnmente empleados son el funcional B3LYP, el cual es un funcional híbrido formulado en 1994. Cualquier funcional de intercambio se puede combinar con cualquier otro funcional que contenga correlación para formar un funcional de intercambio y correlación como el funcional híbrido híbrido B3LYP (o Becke3LYP) en donde el tres indica un funcional con tres parámetros y viene definido como:

$$E_{XC}^{B3LYP} = (1 - a_o - a_x)E_X^{LSDA} + a_o E_X^{HF} + a_x E_X^{B88} + (1 - a_c)E_c^{VWN} + a_c E_c^{LYP} \quad (11)$$

donde E_X^{HF} es la energía de intercambio Hartree-Fock, E_X^{B88} es el funcional de Becke de 1988, E_X^{LSDA} es la energía de intercambio basados en la aproximación local de la densidad de espín, E_c^{LYP} es el funcional de correlación de Lee-Yang-Parr y los parámetros a_o , a_x y a_c corresponden a valores cuyos resultados hacen que concuerden con los reportados experimentalmente.

4.3 Funciones de Base

En el campo de la química computacional, uno de los dos componentes necesarios para describir a los sistemas químicos son las funciones base, las cuales pueden ser vistas como una aproximación matemática de los orbitales atómicos. Así, al combinar orbitales atómicos, se obtienen los orbitales moleculares. Los dos tipos de funciones bases más utilizados en los cálculos de química computacional son los orbitales tipo Slater (STO) y los Gaussianos (GTO).

Es posible aproximar su comportamiento a través de una contracción de cierta combinación lineal de funciones gaussianas preestablecidas y que son llamadas funciones gaussianas primitivas (GF), cuya forma viene dada por:

$$\phi_u^{CGF}(r - R_A) = \sum_{p=1}^L d_{pu} \phi_p^{GF}(\alpha_{pu}r - R_A) \quad (12)$$

Al momento de seleccionar la función de base con la cual se representarán los orbitales atómicos y los orbitales moleculares, es necesario considerar ciertas características del conjunto de base a utilizar. El conjunto de base más pequeño que se puede utilizar es llamado base mínima y consiste en solo tomar el número de funciones base necesarias para contener representar a los orbitales atómicos que son ocupados por los electrones del sistema. Si bien la base mínima permite realizar cálculos computacionales de manera rápida, sacrifica exactitud del comportamiento físico del sistema, por lo que se han desarrollado extensiones de la base mínima que presentan en la Tabla 4.

Tabla 4: Funciones de base utilizadas en química cuántica computacional y sus características principales

Tipo de conjunto de base	Característica
Base mínima (MBS)	Utiliza el número funciones de base exactas para representar a los orbitales atómicos utilizados por los electrones de un átomo.
Base doble Zeta (DZ)	Duplica las funciones de base utilizadas en la MBS.
Base de valencia dividida (DZV)	Para los electrones de <i>core</i> del átomo es una MBS, mientras que para los electrones de la capa de valencia es una DZ.
Base extendida	Multiplica la cantidad de funciones de base de una MBS en números enteros mayores a 2 (base doble), englobando los conjuntos de base Triple Zeta, Cuádruple Zeta, etc.
Base DZ con Polarización (DZP)	Es un conjunto de base DZ, en el cual se adicionan funciones de base de orbitales atómicos no ocupados por los electrones en el estado fundamental de la molécula.
Bases con funciones difusas	Se construyen como MBS, pero adicionan funciones de base con exponentes más pequeños, modificando el tamaño de los orbitales atómicos, permitiendo que se extiendan más allá de la dimensión que ocupan en el átomo en su estado basal.
Bases de Pople	Son conjuntos de base DZV que tienen la forma general $k-nlmG$, donde k es el número de funciones gaussianas primitivas para representar a los orbitales atómicos de los electrones <i>core</i> .

En el presente trabajo se utilizaron dos bases de Pople distintas, la primera fue la 6-31G(d) o 6-31G*, que es una función DZV con polarización. La construcción de esta base se realiza mediante el producto de 6 funciones gaussianas primitivas para describir a los orbitales de los electrones del core y duplica los orbitales de los electrones de la capa de valencia, utilizando un producto de 3 gaussianas para uno de los orbitales y de una gaussiana para el orbital duplicado. Adicionalmente, agrega funciones del tipo d a átomos pesados.

La segunda función de base utilizada fue la 6-31g+(d), la cual tiene las mismas características que la anterior, con la diferencia que se adicionan funciones difusas en los átomos pesados.

4.4 Acoplamiento molecular

El docking molecular o acoplamiento molecular, es una metodología computacional utilizada para predecir la interacción entre una molécula llamada ligando y otra llamada receptor. El resultado que se obtiene de un cálculo de acoplamiento molecular es una serie de conformaciones del ligando, para las cuales este tiene la capacidad de interaccionar con la proteína, así como la energía libre de unión que se da entre las dos moléculas. El complejo ligando-receptor resultante es una estructura estable, cuya fuerza depende del tipo de interacciones intermoleculares presentes.

Dentro del funcionamiento de los programas de acoplamiento molecular existen dos funciones importantes de las cuales depende la fiabilidad de la predicción de un buen complejo ligando-receptor. Siendo el algoritmo de búsqueda y la función de puntuación, estas dos funciones importantes y que varían dependiendo el programa de docking empleado.

El algoritmo de búsqueda que el programa utiliza debe dar como resultado una colección de configuraciones o poses de unión del ligando, que puedan determinarse experimentalmente [93]. La principal característica que éstos deben tener es una rapidez suficientemente alta y efectiva para cubrir gran parte del espacio conformacional que el ligando puede tener. Los algoritmos de búsqueda se clasifican según las estrategias que utilizan para cubrir el espacio conformacional y pueden ser del tipo: basados en enfoques de construcción incremental como FlexX, algoritmos basados en formas usados en DOCK, algoritmos genéticos aplicados en

el programa GOLD, técnicas de búsqueda sistemática usado por el programa de Glide o simulaciones Monte Carlo que utiliza LigandFit [94].

Por otro lado, la función de puntuación debe evaluar las interacciones que hay para cada pose y devuelve un valor cuantitativo de la energía libre de interacción para el complejo ligando-receptor. Estas funciones de puntuación deben ser lo suficientemente rápidas para ser aplicadas a un gran número de poses y poder discriminar entre conformaciones de unión y no unión, además de tener valores adecuados para evaluar los diferentes términos energéticos que conforman al valor de la energía de acoplamiento [95].

Las funciones de puntuación suelen dividirse en cuatro clases principales:

- Basadas en física: Utilizan campos de fuerza de la mecánica molecular, para simular los posibles efectos físicos de las interacciones proteína-ligando [96].
- Basadas en enfoques empíricos: Usan técnicas de regresión estadística para ajustar funciones a los datos experimentales y obtener así los valores de los términos de aporte para cada tipo de interacción [97].
- Basados en conocimiento: Utilizan análisis estadístico de los pares de átomos que interactúan de los complejos proteína-ligando con estructuras cristalográficas disponibles, para determinar el valor de los diferentes tipos de interacciones [98].
- Basados en aprendizaje automático: Emplean una variedad de algoritmos de aprendizaje autónomo, como la red neuronal y el aprendizaje profundo, para predecir las interacciones implícitas que son difíciles de modelar por otras funciones de puntuación [99].

En el presente trabajo se utilizaron dos programas de acoplamiento molecular diferentes, cuyas funciones de puntuación y algoritmos de búsqueda se muestran en la Figura 7. El programa de AutoDock Vina combina tanto características de una función de puntuación empírica, como una basada en conocimiento, con un algoritmo de búsqueda global y de búsqueda local iterada. Mientras que Glide utiliza un algoritmo de búsqueda diferente basado en una búsqueda jerárquica y una optimización local.

Programa	Función de Puntuación	Algoritmo de Búsqueda
Autodock Vina	Empírica + Basada en conocimiento	Perturbaciones Aleatorias (Metropolis-Hasting), optimización local (BFGS)
PLANTS	Empírica + Basada en la física	Optimización por colonia de hormigas
Gold	Empírica + Basada en la física	Algoritmo genético
Glide	Empírica + Basada en la física	Búsqueda jerárquica, optimización local
Molegro	Empírica + Basada en la física	Evolución diferencial guiada (DE)
AutoDock 4 (AD4)	Empírica + Basada en la física	Algoritmo genético lamarckiano (LGA)
rDock	Empírica	Algoritmo genético, recocido simulado y minimización simple

Figura 7: Funciones de puntuación y algoritmos de búsqueda de los principales programas de acoplamiento molecular. Fuente: Lyne (2002).

Otro de los parámetros que puede variar en los programas de acoplamiento, son los tipos de metodologías de docking que estas pueden realizar. Típicamente, las metodologías de docking pueden dividirse en dos:

- Docking rígido: Metodología de acoplamiento en la cual tanto el ligando como el receptor se mantienen rígidos, haciendo que la búsqueda de poses de interacción, se limite a aquellas que se den para la conformación del ligando dado. Este tipo de acoplamiento simula el comportamiento de un modelo de llave-cerradura de un sistema enzimático propuesto por Emil Fisher [101].
- Docking flexible: Metodología de docking donde los enlaces con giro libre del ligando, del receptor o de ambos se dejan libres, permitiendo movilidad en el sitio de interacción de la proteína. El enfoque general del acoplamiento flexible requiere de una búsqueda en el espacio conformacional permitido del ligando, en el procedimiento se varían las $6 + N$ variables de traslación, rotación y conformación que la molécula tiene [102]. Aunado a la movilidad del ligando, la movilidad del receptor se realiza permitiendo cambios en la orientación de las cadenas laterales.

Adicionalmente, la teoría de ajuste inducido indica que cuando un ligando se une a su receptor existen cambios conformacionales en la superficie del receptor, tal que la interfaz de interacción se optimiza para tener la mayor cantidad de interacciones [103]. Razón por la cual, cuando se utiliza un complejo ligando-receptor ya resuelto experimentalmente, puede existir un sesgo en la afinidad del receptor por una clase

de ligandos, cuya estructura central sea parecida a su co-cristalizante [104]. Por lo cual, agrega flexibilidad al receptor ha cobrado importancia, llevando al desarrollo de metodologías de docking flexible o al desarrollo de la metodología de acoplamiento de ajuste inducido (IDF).

La metodología de acoplamiento de ajuste inducido del programa Schrödinger consta de cuatro pasos [105]:

- 1.- Acoplamiento inicial con potencial suavizado en un receptor rígido para generar un conjunto de conformaciones iniciales del ligando.
- 2.- Muestreo de la proteína mediante el refinamiento de las cadenas laterales para cada pose del ligando generada en el primer paso.
- 3.- Re-acoplamiento del ligando en la estructura generada con el ajuste inducido.
- 4.- Puntuación de la pose final teniendo en cuenta la energía de acoplamiento del receptor y términos de solvatación.

Como se observa en la metodología de ajuste inducido anterior, primero se realiza un docking rígido donde el potencial suavizado se refiere a permitir generar poses que normalmente son eliminadas por el impedimento estérico entre los átomos del ligando-receptor. Seguido, para las poses que se obtienen, se refinan las cadenas laterales con el objetivo de optimizar las interacciones en el complejo. En tercer lugar, una vez obtenida una nueva conformación de las cadenas laterales del receptor, se vuelve a acoplar el ligando y se determinan aquellas poses más favorables. Por último, las poses finales se evalúan utilizando la función de puntuación del programa.

4.5 Análisis bioinformático

El alineamiento de secuencias hace referencia al proceso de comparar secuencias de origen biológico, como pueden ser los ácidos nucleicos y las proteínas, permitiendo identificar regiones que sean idénticas, donde la secuencia se conserva, o que sean similares, donde por la evolución la secuencia ha cambiado, pero mantiene una relación. Teniendo como objetivo determinar de manera cuantitativa que tan similares son las secuencias y si son o no homólogas.

En el proceso de alineamiento, se calculan el número de símbolos que coinciden, así como del edit distance o distancia de edición, que corresponde al número mínimo de sustituciones, inserciones y eliminaciones necesarias para convertir una secuencia en otra [106]. Otro de los parámetros que ayuda a evaluar el alineamiento

es el gap penalty, el cual permite penalizar la introducción de caracteres espaciadores en el alineamiento de la secuencia. Uno de las herramientas más utilizadas para esta tarea es el algoritmo de BLAST (Herramienta básica de búsqueda de alineación local) perteneciente al Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI). El algoritmo de BLAST desarrollado por Altschul et al. 1990 [107] permite, de manera heurística, alinear de manera rápida y eficiente secuencias biológicas. Para realizar esta tarea, BLAST no compara carácter por carácter, sino que usa segmentos cortos de la secuencia denominados palabras para crear una serie de semillas de alineación. Con estas palabras, se buscan aquellas que coincidan y extiende el alineamiento, después dado un puntaje de corte se seleccionan aquellas que sean homólogas. Si se detecta un acierto, el algoritmo verifica si la palabra está contenida dentro de otro par de segmentos alineados que pueden ser más largos o que tengan una puntuación de corte mayor o igual a la de corte. El alineamiento de cada palabra termina cuando una puntuación de alineación comienza a disminuir más allá de una puntuación de umbral inferior.

Es posible utilizar este algoritmo, para alinear secuencias de ADN o de proteínas. En el caso de proteínas, se emplea el programa BLASTP, que a través de una matriz de sustitución de aminoácidos, determina el puntaje correspondiente al alineamiento para los diferentes 20 aminoácidos, esto dada la probabilidad de que uno se sustituya por otro. Adicional al alineamiento de secuencias que se puede realizar en proteínas, es posible realizar el alineamiento de estructuras, el cual permite comparar la conformación tridimensional de las proteínas y establecer la coincidencia entre residuos, esto mediante la superposición de las coordenadas de éstos. Permitiendo con esto, determinar la homología estructural, cuando no es posible determinar por medio de la secuencia, que estas son homólogas. En este trabajo se usó el programa PDBefold para hacer el alineamiento estructural de las dos enzimas CYP estudiadas. PDBefold a través del algoritmo de correspondencia de estructuras secundarias (SSM) [108] permite identificar residuos que ocupan posiciones geométricas equivalentes, al ejecutar primero la identificación y alineamiento de elementos de la estructura secundaria, seguido de la alineación tridimensional de los átomos de carbono alfa del esqueleto de la proteína.

Capítulo 5

Metodología

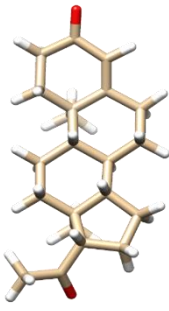
La metodología del presente trabajo se dividió en tres etapas, cada una correspondiente al área de conocimiento necesaria para el desarrollo de este proyecto:

1. Química cuántica: Realización de cálculos de estructura electrónica para optimizar la geometría molecular de las ocho saponinas estudiadas y los cálculos de las frecuencias vibracionales.
2. Biología computacional: Simulación del acoplamiento molecular de las ocho moléculas de saponinas con las enzimas CYP17A1, CYP21A2 y el AR.
3. Bioinformática: Análisis bioinformático de las secuencias y la estructura tridimensional entre las enzimas CYP17A1 y CYP21A2. Adicionalmente, se estudiaron las características fisicoquímicas del sitio activo de ambas proteínas.

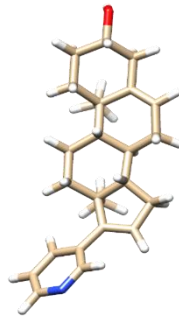
5.1 Cálculos de optimización de la geometría molecular

La estructura química de la ocho saponinas propuestas para el estudio del presente trabajo de tesis son las siguientes: diosgenina, 5aOHLaxo, acetato5aOHLaxo, oxima-*i*-esteroide, glydiosgenina, *i*-esteroide, glyliesteroide y oxima5aOHLaxo, sus estructuras se muestran en la Figura 8 y fueron obtenidas del trabajo de Carrasco-Carballo, A. (2018).

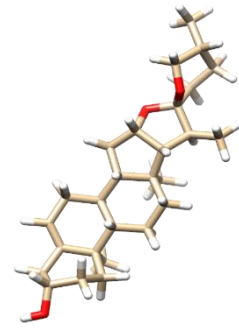
Los cálculos computacionales de optimización se llevaron a cabo en el programa Schrödinger, utilizando el paquete de cálculos *ab initio* Jaguar [109]. Primero se optimizaron las geometrías empleando el método de Hartree-Fock y el conjunto base 6-31g(d). Después se volvieron a optimizar las estructuras obtenidas, pero empleando el funcional B3LYP y el conjunto base 6-31g+(d). Las optimizaciones se llevaron a cabo para generar estructuras tridimensionales que correspondieran a un mínimo de energía en la hypersuperficie de potencial de la molécula, lo cual nos asegura que tenemos la conformación de mínima energía y por ende su conformación más estable. Para cada optimización se calcularon las frecuencias vibracionales de cada una de las geometrías obtenidas, usando el programa Gaussian09 [110]. Éstas fueron calculadas para confirmar que se tratara de la conformación de mínima energía en la superficie de energía potencial ($\nu_i < 0$).



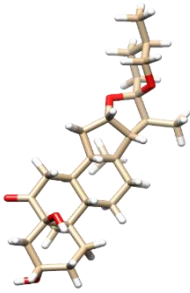
progesterona



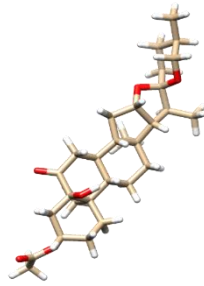
abiraterona



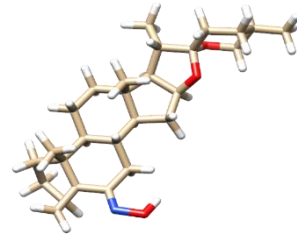
diosgenina



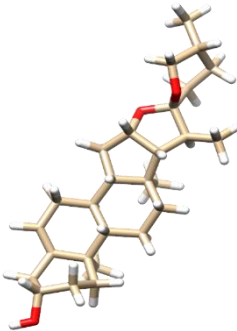
5 α OHLaxo



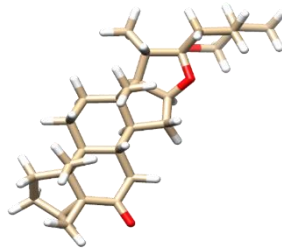
acetato5 α OHLaxo



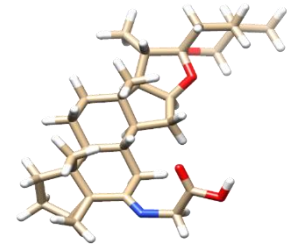
oxima-*i*-esteroide



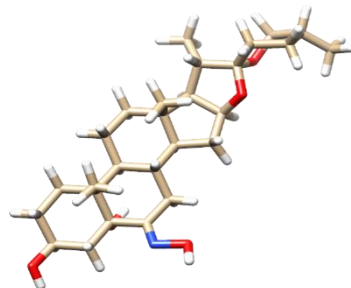
glydiosgenina



i-esteroide



glyliesteroide



oxima5 α OHLaxo

Figura 8: Estructuras 3D de las 8 sapogeninas estudiadas en este trabajo.

5.2 Acoplamiento molecular

Los estudios de acoplamiento molecular entre las proteínas estudiadas y las ocho sapogeninas se llevaron a cabo en dos programas computacionales, Autodock Vina [111] y Schrödinger [112]. Para lograr los objetivos del presente trabajo con respecto al acoplamiento molecular, se comenzó con la búsqueda de las estructuras cristalinas de las 2 enzimas y el receptor a estudiar en el Banco de Datos de Proteínas (PDB <https://www.rcsb.org/>). Para el caso de la enzima CYP17A1, se encontraron varios resultados de la forma de *Homo sapiens*, pero se seleccionó la estructura, con el identificador (ID) 6CHI, el cual corresponde al citocromo humano P450 17A1 sin mutaciones en complejo con el inhibidor abiraterona C6 amida. Para la CYP21A2 se seleccionó la estructura con el PDB ID 4Y8W correspondiente a la estructura cristalina del complejo de progesterona citocromo P450 21A2 humano. Por último, para estudiar las interacciones entre las sapogeninas y el receptor de andrógenos, únicamente se seleccionó la región correspondiente al dominio de unión del ligando, por lo que se seleccionó la estructura con el PDB ID 1T65 co-cristalizada con DHT.

El programa de Autodock Vina permite establecer diferentes parámetros para tratar al ligando y a la proteína durante la simulación de acoplamiento molecular, permitiendo realizar 4 tipos diferentes de metodologías que son:

1. Proteína y ligando rígidos (Docking rígido)
2. Proteína rígida y ligando flexible
3. Proteína flexible y ligando rígido
4. Proteína y ligando flexible (Docking flexible)

La diferencia entre tratar a la proteína de manera flexible o rígida radica en que en la primera se deben seleccionar los residuos que se podrán mover y que deben estar dentro de la caja *grid* que se prepara. Mientras que en la otra, todos los residuos dentro del *grid* no se mueven. De igual manera sucede en el ligando, donde se mantienen rígidos o flexibles los enlaces con giro libre. Utilizando la enzima CYP17A1 y la estructura de su ligando endógeno (progesterona), se llevaron a cabo los cuatro diferentes tipos de metodologías de acoplamiento que permite Vina, esto con la finalidad de seleccionar aquellas dos metodologías que modelaran mejor las interacciones reportadas para este sustrato.

5.3 Acoplamiento de Autodock Vina

Una vez seleccionadas las dos mejores metodologías, se decidió por aquella que recreara la pose e interacciones mostradas en el cristal de la enzima seleccionada. Por lo que se realizó con éstas el acoplamiento de la proteína con su co-cristalizante la abiraterona 6-amida o 3XN por su identificador en la base de datos PDB. Posteriormente, a través del software Chimera, se calculó la desviación cuadrática media (RMSD) entre los átomos de la pose obtenida y la descargada del PDB. La metodología final seleccionada fue tomada y aplicada a todos los cálculos de acoplamiento molecular efectuados a lo largo del trabajo.

Sin importar el programa a utilizar, previo a la realización del acoplamiento molecular, es necesario preparar las proteínas a trabajar mediante la herramienta AutoDock Tools [113] siguiendo el tutorial proporcionado por sus creadores en la página oficial web [114]. Los pasos para preparar una proteína son: eliminar las moléculas de agua que contenga la estructura cristalina, agregar los hidrógenos polares, así como unir los no polares que pueda haber. Finalmente, se asignan las cargas atómicas. A diferencia del tutorial, en este caso a los átomos del receptor se les asignaron las cargas de Kollman [115]. La selección del uso de las cargas de Kollman para las proteínas, se basó en el hecho de que las cargas parciales extraídas por este método son para cada uno de los 20 aminoácidos, además de contar con ajustes basados en la densidad del potencial electrostático obtenidos de cálculos mecano cuánticos [116].

En el caso de la CYP17A1 y la CYP21A2 que son metaloproteínas y cuyo sitio activo contiene un átomo de hierro asociado a un grupo hemo, las cargas que se asignaron al hierro fueron de cero, esto debido a que el programa de Autodock Vina no tiene parametrizados los distintos estados de oxidación que tiene este átomo y demás elementos metálicos.

La selección de residuos flexibles para las dos enzimas estudiadas se basó considerando que fueran residuos catalíticos o que se tratara de residuos que, dada su posición se consideraron podrían desfavorecer la unión del ligando con la enzima debido a un impedimento estérico de los átomos. A la CYP17A1 se le asignaron como residuos flexibles a los residuos catalíticos Asn202 y Glu305 cuya importancia se mencionó en los antecedentes, mientras que los residuos que podrían impedir la

unión del ligando fueron Ile206, Arg239, Thr306, Val483 y Phe114. Por otro lado, a la CYP21A2 se les asignó flexibilidad a los residuos catalíticos Ser109, Leu110, Arg234 que son importantes para el reconocimiento y orientación del ligando [117] y a la Asp288, Val306 y Leu364 como residuos con posible impedimento estérico.

Como parte de los pasos a seguir para realizar un acoplamiento molecular, se debe preparar una caja compuesta por puntos, paso en el cual se restringe el espacio de búsqueda de interacciones y se selecciona en qué región de la proteína se probará la interacción entre las moléculas y la proteína. Para el caso de la CYP17A1 en Vina, la caja se posicionó en las coordenadas X=26.023, Y=151.052 Z=37.621. En el caso de la CYP17A2 la caja se posicionó en las coordenadas X=-7.265, Y=8.454 Z=25.736. Las localizaciones de estas cajas (*grid*) se pueden observar en el apéndice B. En general las dimensiones de la caja utilizada fueron de 30x30x30 Å sobre cada uno de los ejes y con un espaciado entre puntos de 1 Å, que es el valor por defecto establecido por el programa. Por último, el valor de *exhaustividad* se mantuvo en el valor predeterminado de 8. Finalmente, los resultados del acoplamiento fueron visualizados y analizados a través de los diagramas de interacción generados con el programa Discovery Studio [118].

Las estructuras de las moléculas utilizadas como ligandos fueron preparadas en el programa de Autodock Tools [113]. Como primer paso se agregaron los hidrógenos polares faltantes a las estructuras, posteriormente se les asignaron cargas atómicas y finalmente, dependiendo de si el ligando iba a ser rígido o flexible, se estableció el número de torsiones. A los ligandos rígidos se les asignó un valor de 0 torsiones activas, es decir, no se permite que ningún enlace con giro libre pueda moverse, mientras que a los ligandos flexibles se les asignó el número máximo de torsiones que la molécula presentaba. En el caso de las cargas atómicas, a todos los ligandos se les adicionaron las cargas Gasteiger [119].

5.4 Acoplamiento en Schrödinger

En la *suit* de Schrödinger las proteínas fueron preparadas de acuerdo con el asistente de preparación de proteínas de la interfaz *maestro* con el propósito de refinar la estructura proteica que agrega los átomos de hidrógeno, los bucles y demás partes faltantes. Posteriormente, se analizó el espacio de trabajo, se eliminaron todas las moléculas de agua y se calcularon los estados de protonación para el átomo de hierro, al final se seleccionó el estado ferroso, con una carga de

+2, simulando con esto el estado activo del ciclo de activación canónico de las enzimas P450[120]. Por último, se minimizó la estructura utilizando el campo de fuerza OPLS-2005 y se optimizó la red de puentes de hidrógeno.

Como Schrödinger no cuenta con una opción de docking flexible igual a la de Vina, se decidió utilizar la metodología de acoplamiento molecular de ajuste inducido (IDF), la cual permite dejar flexible no solo las cadenas laterales de residuos del sitio activo, sino todos los residuos dentro de la caja *grid* seleccionada. Para esta metodología se dejaron los valores predeterminados del programa, la caja se preparó empleando como centroide al ligando y debido al tamaño de las sapogeninas y a su estructura no plana, se decidió por una caja que tuviera 20 Å de tamaño en cada dirección. Además, se aplicó un factor de escalamiento de 0.5 tanto al receptor como al ligando y se seleccionó que el programa calculara un máximo de 20 poses por ligando. La aplicación de un factor de escalamiento a los radios de van der Waals, permite disminuir el tamaño de los átomos tanto del receptor como del ligando, suavizando el potencial y dando cierta flexibilidad al docking

Los ligandos fueron preparados de manera diferente a la realizada para su uso en Vina. En la interfaz de *maestro*, únicamente se modificó el factor de escalamiento sobre los átomos no polares y se utilizó el valor de 0.7. La asignación de cargas se efectúa de manera automática como parte del proceso de acoplamiento del programa de *Glide* y utiliza el mismo campo de fuerzas que el receptor, el OPLS-2005.

5.5 Análisis bioinformático

Se procedió a realizar un alineamiento de secuencias por pares utilizando la herramienta BLAST del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) [121], esto con el fin de comparar las dos enzimas utilizadas en este trabajo, la CYP17A1 y la CYP21A2 y ver que tan parecidas son a nivel de secuencia. Con la información anterior se estudió el porqué es difícil tener inhibidores selectivos de la CYP17A1, que no afecten a la actividad de la otra enzima. Las secuencias utilizadas para el alineamiento se presentan en el apéndice C.

Posterior al alineamiento de secuencias de las enzimas estudiadas, se realizó el alineamiento estructural tridimensional de las estructuras cristalográficas seleccionadas. La herramienta utilizada para esto fue PDBeFOLD del Instituto Europeo de Bioinformática (EBI) [122]. El objetivo de realizar este alineamiento fue

estudiar la conformación general del sitio activo de las enzimas y compararlas, permitiendo identificar si hay residuos conservados en la misma posición.

Como parte final del estudio de las enzimas CYP17A1 y CYP21A2, se realizó la comparación de la naturaleza química de la superficie del sitio activo de ambas enzimas, utilizando la herramienta de mostrar superficie del receptor del programa Discovery Studio Visualizer. Se analizó tanto la hidrofobicidad del sitio activo como la capacidad de formar puentes de hidrógeno de la superficie de éste.

Capítulo 6

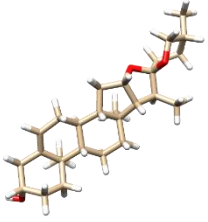
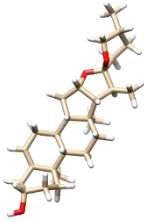
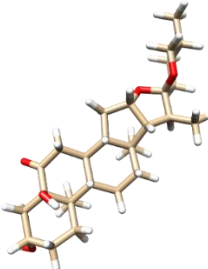
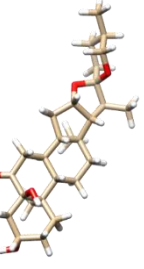
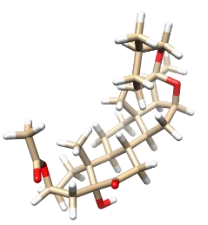
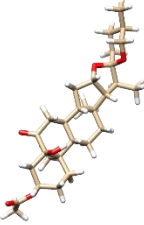
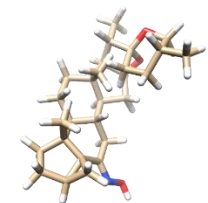
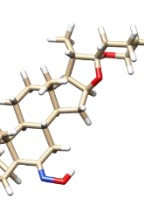
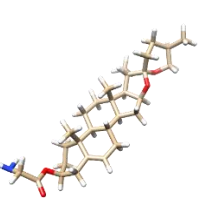
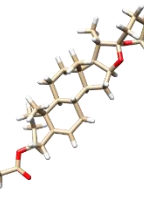
Discusión y resultados

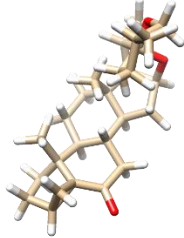
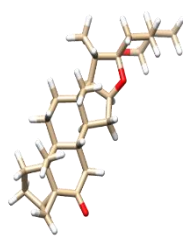
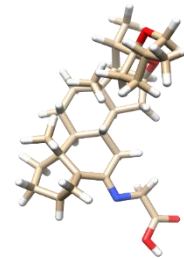
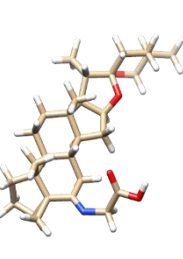
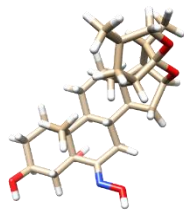
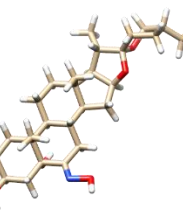
En esta sección se presentan los resultados obtenidos según la metodología descrita en el capítulo anterior.

6.1 Cálculo de las geometrías moleculares optimizadas

Las geometrías moleculares de todas las estructuras optimizadas a nivel de teoría B3LYP/6-31g+(d) presentadas en la Tabla 5, mostraron valores positivos en sus frecuencias vibracionales, asegurando que las geometrías finales obtenidas para cada ligando corresponden a su conformación de mínima energía. Con los valores de RMSD para las distancias de enlace, ángulos de enlace y ángulos diedros, se observa que las estructuras utilizadas de partida no son modificadas en gran medida en sus distancias de enlace, siendo los valores de ángulos de enlace y diedros los parámetros que más variaron en la optimización. Es apreciable en las estructuras optimizadas que, los ángulos de enlace de los anillos de seis miembros que conforman el esqueleto de las moléculas no sufren cambios significativos comparadas con las iniciales, manteniendo siempre una conformación que se asemeja a la conformación de silla que adquiere el ciclohexano en su estado de mínima energía. Siendo los enlaces diedros los que tienen más variación, para llevar a las moléculas a una conformación de menor impedimento estérico entre los átomos de la molécula y por ende a una geometría del estado basal.

Tabla 5: Valores de RMSD de las estructuras 3D inicial de las moléculas estudiadas previas a los cálculos de optimización y estructura final obtenida con el nivel de teoría y la base B3LYP/6-31g+(d).

Nombre de la molécula	Estructura inicial	Estructura optimizada	RMSD distancia s de enlaces	RMSD ángulo s de valenci a	RMSD ngulos diedros
diosgenina			0.0152	1.4208	102.636 2
5aOHLaxo			0.0161	1.7793	52.419
acetato5aOHLaxo			0.0386	6.5645	75.5537
oxima-i-esteroide			0.0337	4.8148	115.556 3
glydiosgenina			0.0165	1.5725	98.6194

i-esteroide			0.0327	11.6211	107.52
glyiesteroide			0.0314	5.5539	100.524 0
oxima5aOHLaxo			0.0374	4.3773	80.6758

6.2 Acoplamiento molecular empleando el software Autodock Vina

Los resultados de los acoplamientos realizados para la CYP17A1 y la CYP21A2, se muestran exponiendo primero los obtenidos en Autodock Vina, seguidos de los obtenidos en Schrödinger y por último se llevará a cabo un análisis y comparación de los resultados de ambos programas. Cabe mencionar en este punto que únicamente para el receptor de andrógenos en Autodock Vina, no fue posible obtener poses que mostraran interacción entre las estructuras estudiadas y su sitio de unión con el ligando, por lo que solo se muestran los resultados con Schrödinger.

Los resultados de las 4 metodologías de acoplamiento molecular permitidas por el programa de Autodock Vina, permitieron seleccionar aquella que mejor modela las interacciones reales entre la CYP17A1 y la progesterona. Por lo que, teóricamente se podría extender este resultado a las moléculas estudiadas y modelar sus posibles interacciones. Los dos parámetros utilizados para la evaluación son las energías de interacción y la conformación de las poses generadas. La búsqueda bibliográfica realizada en los antecedentes indicó que el residuo más importante para mediar la unión entre esta enzima y sus ligandos es la Asn202, razón por la cual se buscó principalmente recrear esta interacción. Las energías de acoplamiento

más bajas y que reflejan una interacción más estable pertenecen a las metodologías donde se utilizaron residuos flexibles (Tabla 6).

Tabla 6: Energías de acoplamiento de las metodologías Receptor-Ligando aplicadas al acoplamiento de la enzima CYP17A1 y a la molécula de progesterona.

		Enzima CYP17A1	
		Receptor rígido	Receptor flexible
Molécula progesterona	Ligando rígido	-11.5 kcal/mol	-11.1 kcal/mol
	Ligando flexible	-12.1 kcal/mol	-11.7 kcal/mol

Adicionalmente, de los diagramas 2D de interacción de cada complejo resultante del acoplamiento (Figura 9), se obtuvo que con las metodologías donde la enzima se mantenía rígida, no se logró recrear el puente de hidrógeno entre la Asn202 y el oxígeno de la cetona en el carbono 3 de la progesterona. Mientras que, en aquellas donde existía flexibilidad del sitio activo, sí se logró recrear esta interacción indicando que utilizar residuos flexibles era la mejor opción para tratar a la proteína.

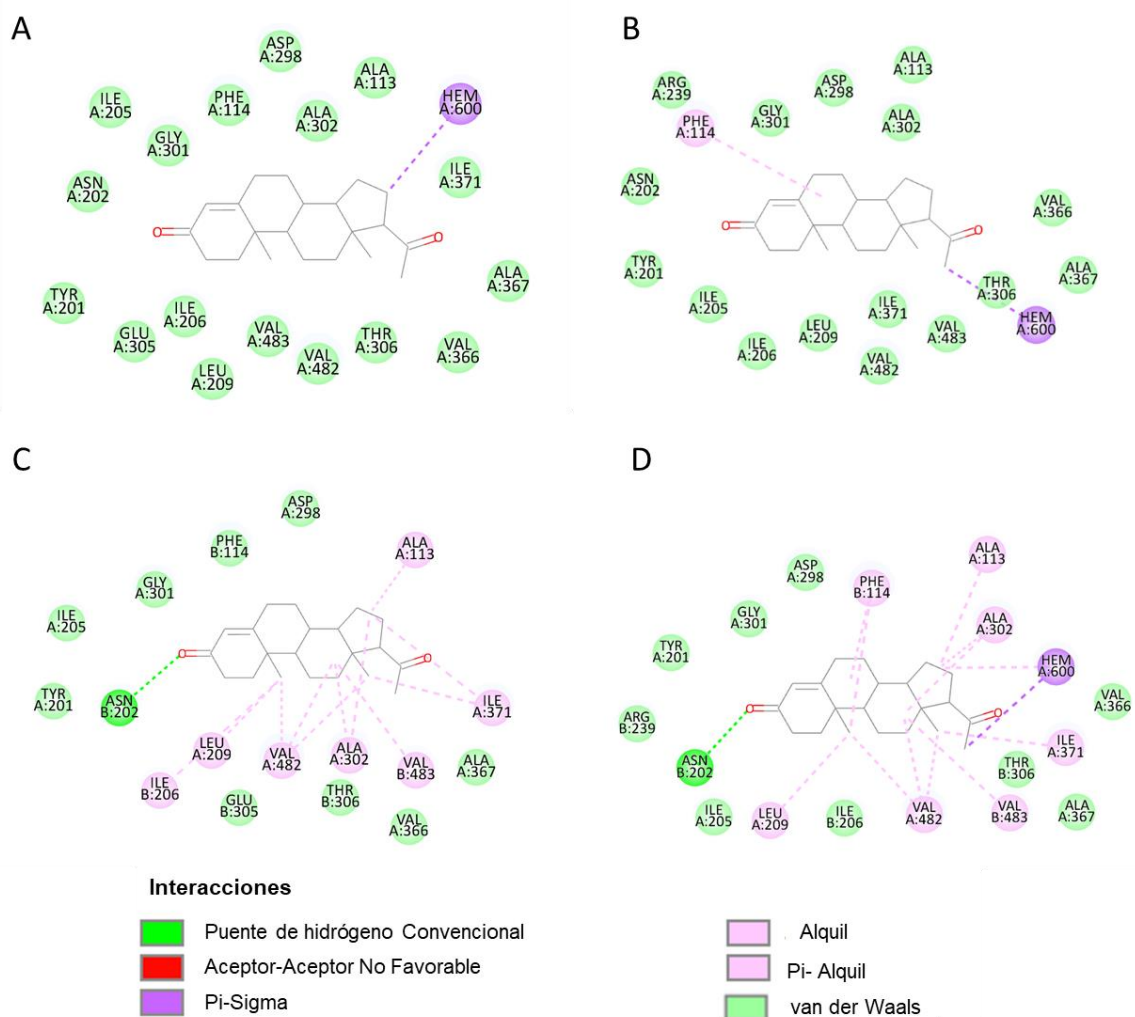


Figura 9: Diagramas 2D de interacción de las 4 metodologías de acoplamiento entre la CYP17A1 y la Progesterona a) Receptor Rígido – Ligando Rígido, b) Receptor Rígido – Ligando Flexible, c) Receptor Flexible – Ligando Rígido, d) Receptor Flexible – Ligando Flexible

Los resultados generados de la validación utilizando como ligando 3XN, que es la molécula co-cristalizante de la estructura CYP17A1 seleccionada [123], mostraron que con el docking flexible se obtiene el menor valor de RMSD entre la pose del ligando obtenida manteniendo el ligando flexible y la conformación de la molécula dentro del cristal, en comparación a la que se obtiene manteniendo el ligando rígido (Tabla 7). El uso del RMSD en la validación del acoplamiento, se debió a que es un parámetro cuantitativo que mide la similitud en la posición de los átomos entre dos moléculas, al superponer sus coordenadas atómicas y calcular la distancia entre los átomos equivalentes [124]. Por lo que, aquella pose con el menor valor de RMSD

comparada con el cristal, es la que mejor simuló la interacción real que se dio entre el ligando y la enzima. La superposición de las estructuras de las poses generadas en el proceso de validación con la conformación del cristal (Figura 10), mostraron que la orientación del grupo amida, al mantener el ligando flexible en la estructura del 3XN, se asemeja más a la referencia, sucediendo lo mismo con la orientación del grupo hidroxilo en la parte superior de la estructura.

Tabla 7: Energías de acoplamiento y valor de RMSD para la validación del acoplamiento entre CYP17A1 y 3XN.

CYP17A1	Receptor flexible– Ligando rígido		Receptor flexible– Ligando flexible	
Molécula	Energía (kcal/mol)	RMSD (Cristal)	Energía (kcal/mol)	RMSD (Cristal)
3XN	-13.6	5.579	-13.1	5.543

Por los resultados anteriores, se decidió utilizar la metodología de docking flexible, manteniendo al ligando y los residuos del sitio activo mencionados en la metodología con la configuración de flexibles.

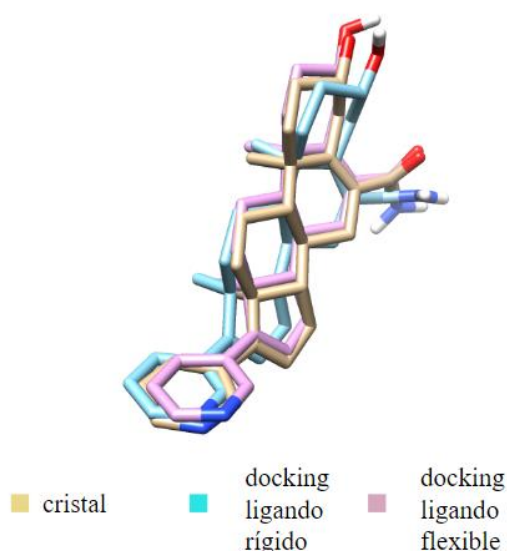


Figura 10: Superposición de las poses de 3XN generadas en el acoplamiento manteniendo a Asn202, Glu305, Ile206, Arg239, Thr306, Val483 y Phe114 flexibles, con el ligando rígido o flexible

Los resultados del acoplamiento de las ocho sapogeninas estudiadas con la CYP17A1 mostraron que todas las moléculas cuentan con interacción en el sitio activo de la enzima y se muestra un resumen de los resultados con las energías de interacción, así como los residuos con los cuales interactúan en la Tabla 8. Dentro de los ligandos a estudiar se incluyó a la progesterona, un ligando endógeno de la enzima, y la abiraterona, un inhibidor de la enzima ya aprobado y utilizado clínicamente contra el CPRC, esto para comparar las energías de acoplamiento de estas dos moléculas con las otras estudiadas. Los diagramas de interacción para cada molécula se encuentran en el Apéndice D para su consulta.

Tabla 8: Resultados del acoplamiento molecular de las moléculas estudiadas, la progesterona y abiraterona acopladas con la enzima CYP17A1.

Molécula	energía de acoplamiento (Kcal/mol)	Residuos con interacción
progesterona	-11.7	Ala113, Phe114 , Asn202 , Leu209, Ala302, Ile371, Val482, Val483, HEM.
abiraterona	-12.1	Ala113, Phe114 , Asn202 , Ile205, Ile206, Leu209, Ala302, Ala367, Ile371, Val482, HEM.
diosgenina	-12.5	Tyr201 , Ile205, Ile206, Arg239, Ala302, Ala367, Ile371, Val482, Val483, HEM
5aOHLaxo	-10.1	Ala105 , Ala113, Phe114 , Asn202 , Ile205, Ala302, Val366 , Ala367, Ile371, HEM
acetato5aOHLaxo	-10.3	Ala105 , Ala113, Phe114 , Ile205, Arg239 , Ala302, Val366 , Ala367, Ile371, HEM.
oxima- <i>i</i> -esteroide	-13.6	Ala105 , Ala113, Phe114 , Ile205, Asn202 , Ile205, Ala302, Glu305 , Val366 , Ala367, Ile371, Val482, HEM
glydiosgenina	-10.0	Ala105 , Asn107 , Ala113, Phe114 , Ile205, Ile206, Arg239 , Ala302, Val366 , Ala 367, Val482, Val483, HEM.
<i>i</i> -esteroide	-13.5	Ile205, Ile206, Arg239, Asp298 , Ala302, Thr306 , Val366 , Ala367, Val482, Val483, HEM

glyiesteroide	-9.9	Ala105 , Ala113, Phe114, Asn202 , Ile205, Ala302, Glu305 , Val366 , Ala367, Ile371, Val482, HEM.
oxima5aOHLaxo	-12.3	Ala105 , Ala113, Phe114 , Ile205, Arg239, Ala302, Val366 , Ala367, Ile371, Val482, HEM.

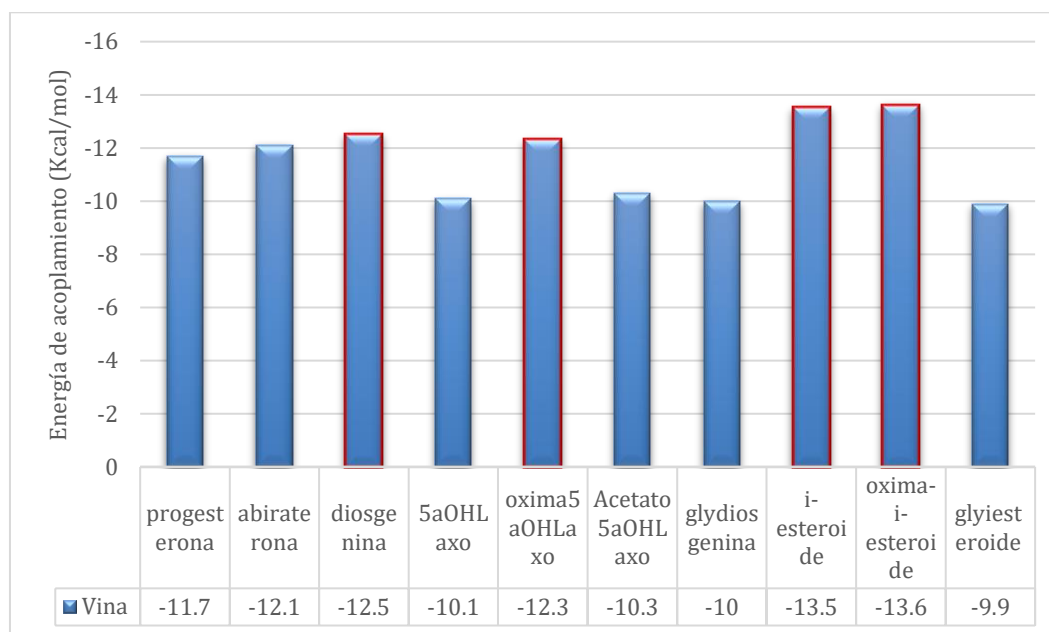
En negritas residuos que coinciden con aquellos considerados catalíticos.

En verde aquellos con los cuales presenta puentes de hidrógeno.

E negro se agruparon todas aquellas interacciones débiles.

En rojo los residuos con interacciones desfavorables.

La acoplamiento de las sapogeninas con la CYP17A1 fueron en general buenas, siendo glyiesteroide quien obtuvo la energía más alta con valor de -9.9 kcal/mol, lo cual difiere en 1.8 kcal/mol con la interacción del ligando endógeno y en 2.3 kcal/mol de la abiraterona. De todas las moléculas, la oxima5aOHLaxo, *i*-esteroide, oxima-*i*-esteroide y diosgenina muestran las energías de interacción menores comparadas con la progesterona y con el inhibidor abiraterona (Gráfica 1) y, por lo tanto, forman un complejo más estable, compitiendo por el sitio activo con la progesterona y si su efecto biológico fuera inhibitorio, interactuarían mejor que la abiraterona.



Gráfica 1: Energías de interacción de las moléculas estudiadas con la enzima CYP17A1 utilizando la metodología de acoplamiento flexible.

Para proponer a las moléculas estudiadas como posibles inhibidores, estas no solo deben interactuar en el sitio activo. Como se menciona en Hernández-Rodríguez et al. (2016) [125], una inhibición enzimática se debe a factores como interacciones fuertes mediadas por puentes de hidrógeno e interacciones con los residuos catalíticos. Siguiendo esta idea, y al analizar las interacciones obtenidas por el acoplamiento, observamos que 5aOHLaxo, oximaisteroide y glyliesteroide interactúan con la CYP17A1 a través del puente de hidrógeno con el residuo Asn202 (Figura 11). Mientras que, el resto a pesar de no hacerlo con este residuo, si muestran interacciones fuertes de puente de hidrógeno con otros residuos como la Tyr201, Asn107, Arg239, Glu305 y Thr306. Cabe mencionar que Glu305 es considerado parte del sitio catalítico y que Arg239 ha servido como un residuo importante para el diseño de inhibidores de la enzima [126, 127]. Por otra parte, oxima5aOHLaxo es el único compuesto que no interactúa por formación de puentes de hidrógeno con la enzima. Adicionalmente, si bien las estructuras estudiadas interactúan con el grupo hemo, no es marcado como un enlace de coordinación con el átomo de hierro.

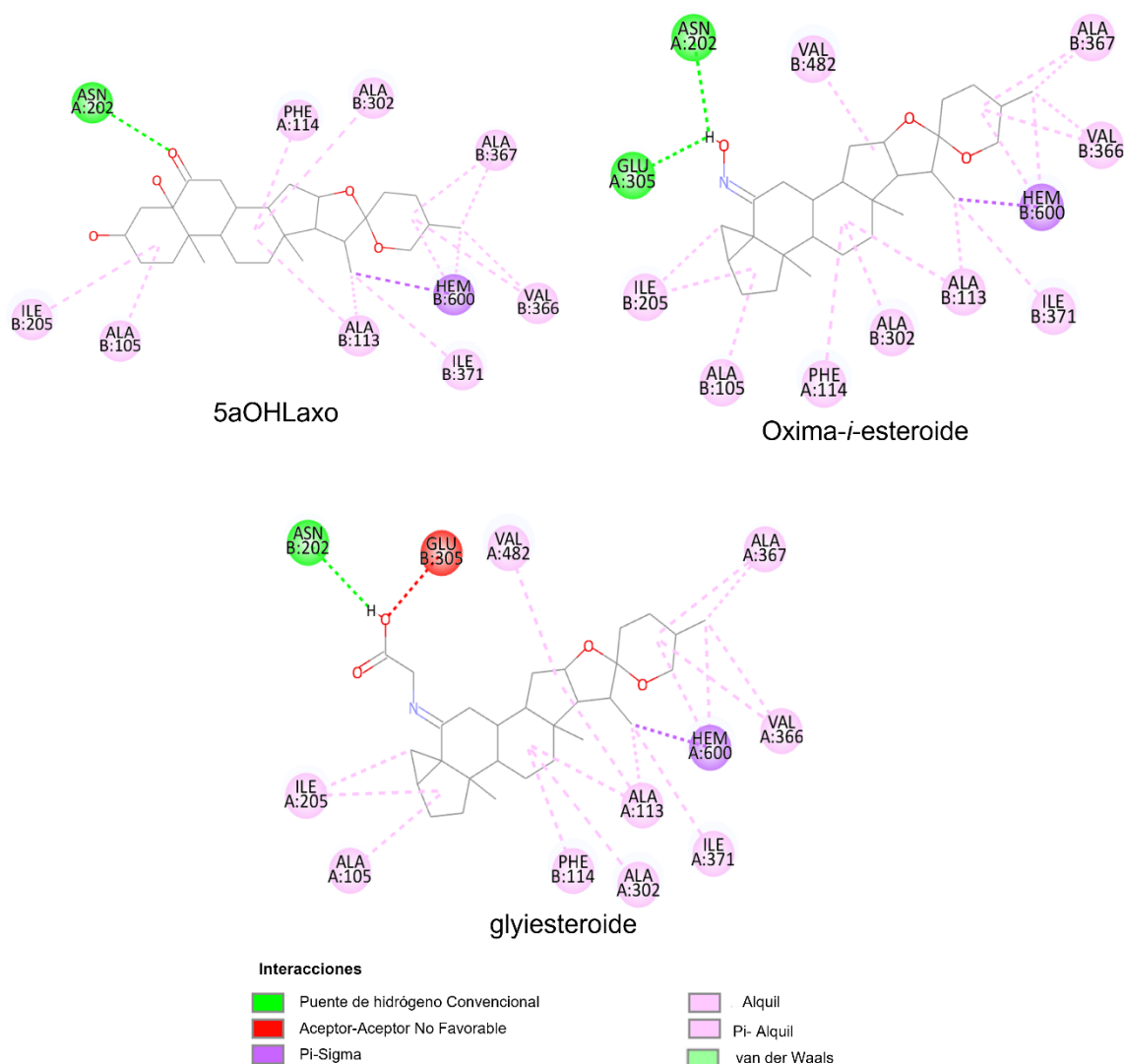


Figura 11: Diagramas de interacción 2D de los ligandos con interacción por puente de hidrógeno con Asn202 de CYP17A1.

Dada la información anterior, se puede proponer a la 5aOHLaxo, oxima-*i*-esteroide y glyliesteroide como moléculas cuya acción biológica podría ser inhibitoria específica de la actividad de la enzima CYP17A1, destacando que oxima-*i*-esteroide interactúa fuertemente con dos residuos catalíticos y que acetato5aOHLaxo y glydiosgenina interactúan con Arg239 que ha sido el blanco para el desarrollo de nuevos inhibidores de CYP17A1 ya publicados en la literatura (Figura 12). Es importante mencionar que oxima5aOHLaxo y acetato5aOHLaxo podrían ser inhibidores de la enzima, pero por la fuerza y tipo de interacciones que en su mayoría son débiles de

tipo alquilo, serían menos específicas y más que bloquear el sitio activo evitarían la unión de ligandos endógenos.

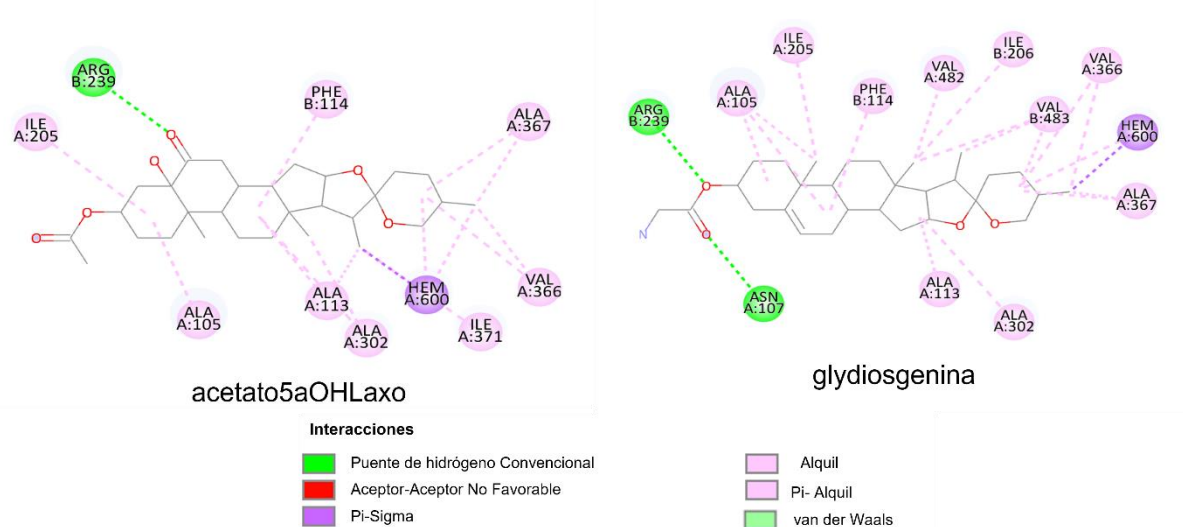


Figura 12: Diagramas 2D donde se muestra la interacción por puente de hidrógeno de acetato5aOHLaxo y glydiosgenina con el residuo Arg239 de la enzima CYP17A1

6.3 Acoplamiento molecular empleando el software Schrödinger

Para esta validación de la metodología de acoplamiento de ajuste inducido (IDF) se utilizó nuevamente la enzima CYP17A1 como receptor y a 3XN como ligando. Con Schrödinger únicamente se validaron los parámetros de la metodología de ajuste inducido a emplear con los ligandos. El uso de los valores por defecto para el factor de escalamiento en los radios de van der Waals, permitió recrear una pose parecida de 3XN en el cristal, posicionando la estructura central de la molécula en el mismo espacio, alineando el nitrógeno del anillo en dirección de interacción con el átomo de hierro del cofactor (Figura 13). La única parte de la molécula que no se acopló de manera parecida al cristal, fue el grupo amida del carbono 6, el cual rotó casi por completo posicionando el grupo carbonilo en donde se halla el átomo de nitrógeno. El valor de RMSD entre la conformación del cristal y la generada con el IDF fue de 4.7 Å, resultado menor al valor obtenido con la validación de la metodología con Autodock Vina.

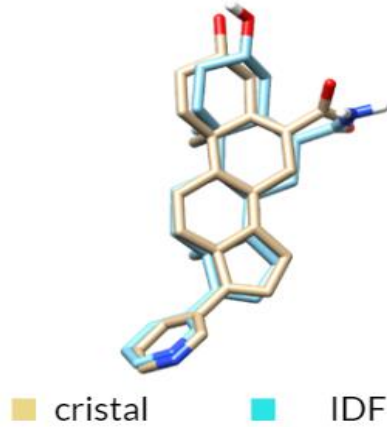
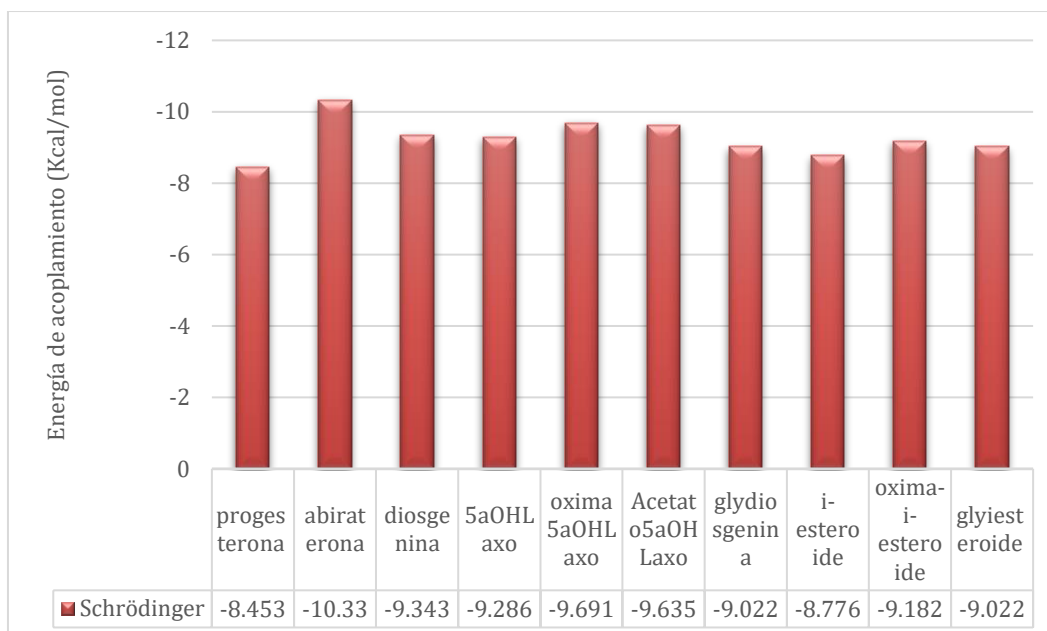


Figura 13: Superposición de la pose de 3XN generada en el acoplamiento ajuste inducido con la estructura del cristal.

Los resultados del IDF también mostraron que las ocho sapogeninas interactúan con el sitio activo de CYP17A1, teniendo todas las moléculas una energía de acoplamiento menor que la del sustrato endógeno (progesterona), pero mayores a la presentada con la abiraterona (Gráfica 2), y por lo tanto, todas las sapogeninas podrían competir por el sitio activo. En cuanto a las interacciones presentes entre los complejos obtenidos, los de la diosgenina, 5aOHLaxo y oxima-*i*-esteroide interactuaron con Asn202 a través de puente de hidrógeno, mientras que el resto lo hacen ya sea con Tyr201, Arg239, Gly297, Asp298 Ala367; residuos que la literatura no marca como catalíticos (Tabla 9). Cabe destacar que Arg239 y Asp298 son residuos mediante los cuales puede realizarse la inhibición de la actividad de la enzima [128].



Gráfica 2: Energías de interacción de las moléculas estudiadas con la enzima CYP17A1 utilizando IDF

De las ocho sapogeninas, únicamente la diosgenina, 5aOHLaxo y oxima-*i*-esteroide presentaron interacción por puente de hidrógeno con Asn202 (Figura 14), por lo que podrían considerarse como posibles inhibidores de la enzima. Sin embargo, es importante destacar que las estructuras con mayor número de puentes de hidrógeno formados con CYP17A1 fueron la acetato5aOHLaxo y glydiosgenina, teniendo un total de 3 interacciones de este tipo con los residuos Arg239 y Asp298, razón por la cual es posible considerar que tengan la capacidad de bloquear el sitio activo de la enzima. De manera similar los ligandos oxima5aOHLaxo, *i*-esteroide y glydiesteroide interactúan con Arg239 o Asp298 formando dos puentes de hidrógeno.

Tabla 9: Resultados del acoplamiento molecular de las moléculas estudiadas con la enzima CYP17A1 utilizando IDF.

Molécula	energía de acoplamiento (Kcal/mol)	Residuos con interacción
progesterona	-8.453	Ala,113, Phe114 , Asn202 , Leu209, Ala302, Val482, Val483, HEM.
abiraterona	-10.331	Ala113, Phe114 , Asn202 , Ile205, Ile206,

		Leu209, Ala302, Thr306, Val366 , Ala367, Val482, HEM
diosgenina	-9.343	Ala113, Phe114 , Asn202 , Ile205, Arg239, Val366 , Ala367, Ile371, Val482, HEM
5aOHLaxo	-9.286	Phe114 , Asn202 , Ile205, Arg239, Val366 , Ala367, Ile371, Val482, Val483, HEM
acetato5aOHLaxo	-9.635	Tyr201 , Ile205, Arg239 , Gly297 , Ala302, Val366 , Ala367, Ile371, Val482, Val483, HEM
oxima- <i>i</i> -esteroide	-9.182	Ala113, Phe114 , Tyr201, Asn202 , Arg239, Ala302, Val366 , Ala367, Val482, Val483, HEM.
glydiosgenina	-8.177	Ala105 , Ala113, Phe114 , Tyr201, Leu214, Arg239 , Ala302, Ala367 , Ile371, Pro434 , Val482, HEM.
<i>i</i> -esteroide	-8.776	Ile205, Ile206, Arg239 , Ala302, Val366 , Ala367, Ile371, Val483, HEM
glyiesterioide	-9.022	Tyr201, Ile205, Ile206, Leu209, Arg239 , Asp298 , Ala302, Ile371, Val482, Val483, HEM.
oxima5aOHLaxo	-9.691	Ile205, Ile206, Gly297 , Asp298 , Ala302, Val366 , Ala367, Ile371, Val482, Val483, HEM.

En negritas residuos que coinciden con aquellos considerados catalíticos.

En verde aquellos con los cuales presenta puentes de hidrógeno.

En negro se agruparon todas aquellas interacciones débiles.

En rojo los residuos con interacciones desfavorables.

Con los resultados anteriores, todas las moléculas estudiadas podrían actuar como inhibidores de la enzima CYP17A1.

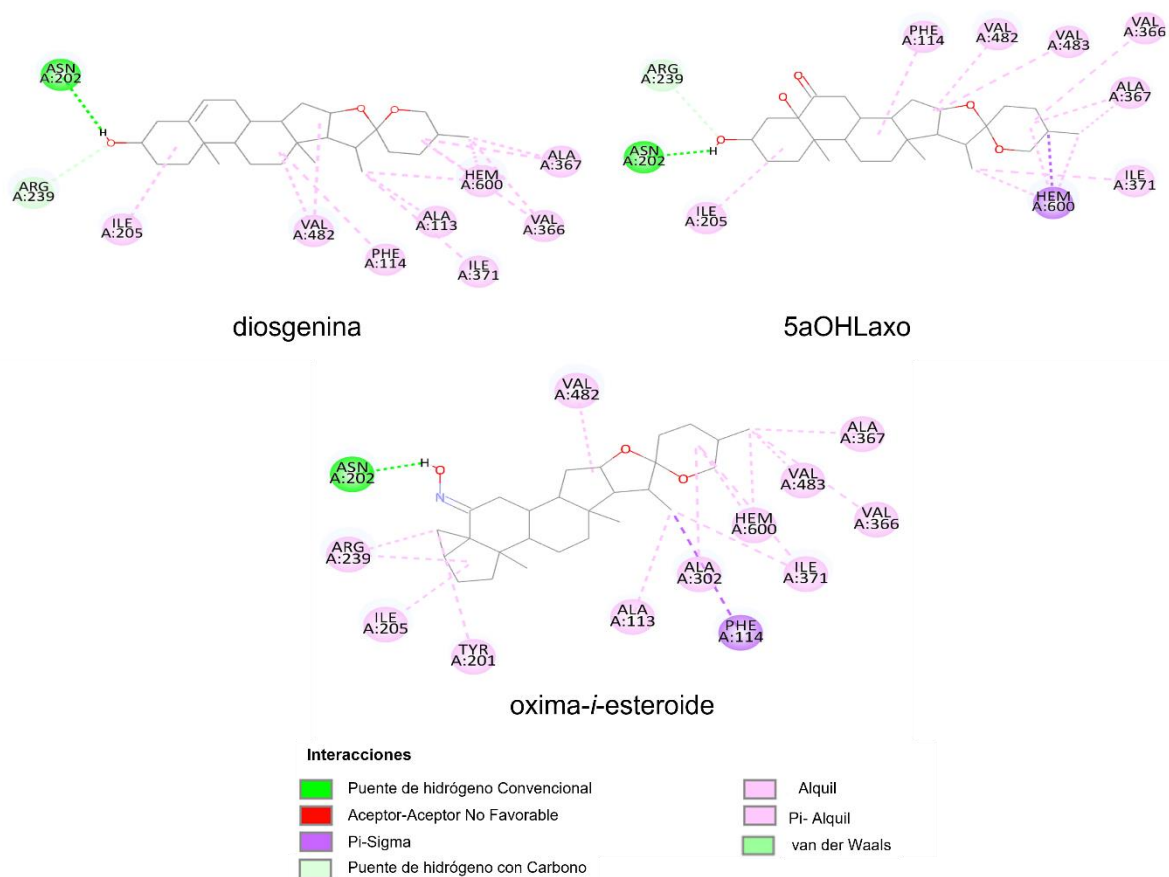
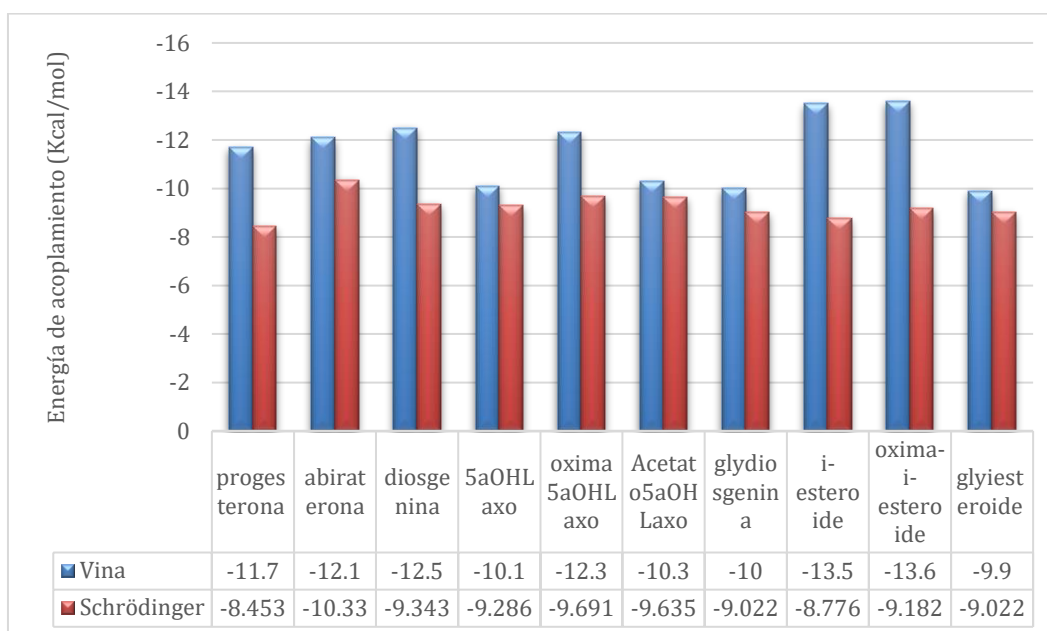


Figura 14: Diagramas de interacción 2D de las moléculas que forman puentes de hidrógeno con Asn202 de CYP17A1 obtenidos con IDF.

6.4 Comparación de los resultados entre Autodock Vina y Schrödinger del acoplamiento molecular entre la enzima CYP17A1 y las sapogeninas

Al comparar los resultados obtenidos de ambos programas utilizados se observa, de manera general, que los valores de las energías de acoplamiento para todas las estructuras estudiadas, incluidos el ligando endógeno y el inhibidor, son menores en Autodock Vina (Gráfica 3).



Gráfica 3: Comparación de las energías de acoplamiento obtenidas con los dos programas utilizados para el acoplamiento de las 8 sapogeninas estudiadas.

Con base en los resultados descritos en las secciones anteriores, se comparó los modos de unión de las moléculas propuestas, y se seleccionaron como inhibidores específicos, solo aquellos compuestos que interactuaron con la enzima a través de Asn202 (Tabla 10), ya que como se mostrará y discutirá más adelante, el hecho de que exista interacción con residuos como Thr306, Arg298 y Asp298 no los hace específicos para esta enzima.

De acuerdo con los resultados obtenidos con Autodock Vina los posibles inhibidores específicos pueden ser 5aOHLaxo, oxima-i-esteroide y glyiesteroide y, según Schrödinger, la diosgenina, 5aOHLaxo y oxima-i-esteroide. Con estos resultados se puede concluir que ambos programas permiten obtener poses donde la 5aOHLaxo y oxima-i-esteroide podrían ser inhibidores específicos de la enzima por la interacción que presentan con Asn202. Por otra parte, se concuerda que la acetato5aOHLaxo y oxima5aOHLaxo se pueden considerar como inhibidores inespecíficos de CYP17A1

Tabla 10: Estructuras seleccionadas como inhibidores específicos y no específicos de la CYP17A1 como resultado de los dos programas utilizados.

	AutoDock Vina	Schrödinger
Estructura con posible actividad de inhibición específica de la enzima CYP17A1	5aOHLaxo, oxima- <i>i</i> -esteroide y glyesteroide.	diosgenina, 5aOHLaxo y Oxima- <i>i</i> -esteroide.
Estructura con posible actividad de inhibición inespecífica de la enzima CYP17A1	acetato5aOHLaxo y oxima5aOHLaxo.	acetato5aOHLaxo, glydiosgenina, oxima5aOHLaxo, <i>i</i> -esteroide y glyesteroide

Al comparar la conformación espacial de las poses de 5aOHLaxo y oxima-*i*-esteroide (Figura 15) se muestra que, si bien en ambos programas se acoplan las moléculas en el sitio activo y forman el puente de hidrógeno con Asn202, no lo hacen en la misma posición. Por ejemplo, para 5aOHLaxo, el esqueleto central, que está conformado por los 6 anillos de la sapogenina, se encuentra girado cerca de 180°, causando que los grupos metilo se posicionen hacia sentidos contrarios.

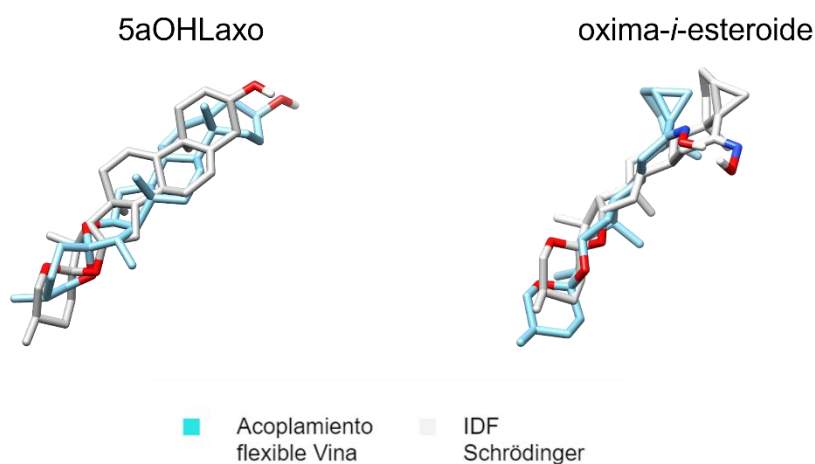


Figura 15: Superposición de las poses de las moléculas con posible actividad inhibitoria específica de la enzima CYP17A1 y que concuerdan en ambos programas empleados.

Como se refleja en los resultados, ambos programas difieren tanto en las poses generadas como en las energías de interacción de cada complejo, quedando la duda de cuál resultado es más confiable o probable de poder ser reproducible en el laboratorio. Directamente, no se ha comparado el poder de predicción que tiene el uso de la metodología de docking flexible de AutoDock Vina y compararla con el modelo de ajuste inducido que permite Schrödinger, no obstante, si se ha evaluado la exactitud del algoritmo de búsqueda y función de puntuación de ambos programas.

El algoritmo de búsqueda de ambos se ha evaluado mediante la reproducibilidad de las poses de diferentes ligandos cristalizados, donde Autodock Vina ha mostrado tener los valores más bajos de RMSD al ser comparado contra programas como DOCK, Autodock 3.0-4.2 y Glide [129], mostrando el mismo comportamiento al ser comparada con PLANTS, Gold, Glide, entre otros [130], donde Glide es el módulo que utiliza la metodología de IDF para hacer el acoplamiento dentro de su protocolo. Esto nos indica que, las poses obtenidas con AutoDock Vina son más propensas a describir la realidad. Pasando a la función de puntuación, se mantiene el mismo comportamiento, siendo AutoDock Vina mejor que Glide para predecir la energía de acoplamiento [131] al compararlas con las experimentales. Por lo que, los resultados obtenidos con Vina parecen ser más confiables.

A pesar de la falta de evidencia que compare las metodologías aplicadas, se ha demostrado que el IDF de Schrödinger genera mejores resultados en la reproducibilidad de las configuraciones para una enzima CYP, al ser capaz de predecir el modo exacto de unión para interactuar con el átomo de hierro y reaccionar con la enzima [132]; esto puede atribuirse a que el campo OPLS que Glide, si tiene parametrizado el átomo de hierro y lo considera al momento de realizar el acoplamiento, mientras que con AutoDock Vina no se realiza esto, quedando la carga formal sobre el hierro de cero. En consecuencia, si bien Vina ha tenido mejores resultados en cuanto a reproducibilidad de las estructuras tridimensionales, el IDF es una buena estrategia para estudiar nuevas moléculas interactuantes con la familia de enzimas estudiadas.

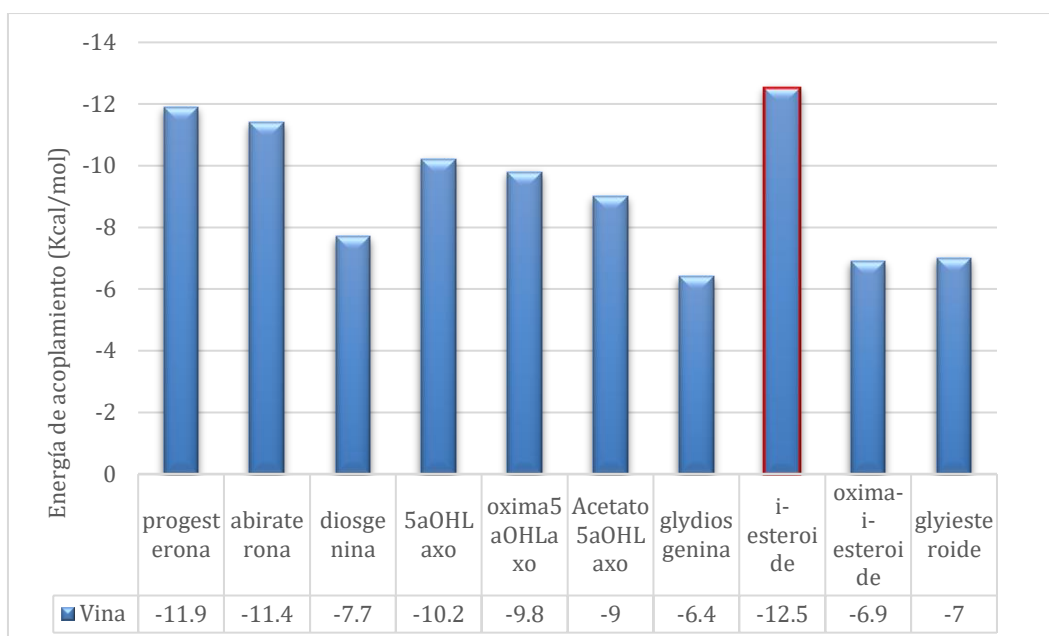
Además, es importante establecer que, si bien ambas metodologías permiten tener flexibilidad en las cadenas laterales del sitio activo, AutoDock Vina considera solo unas pocas manteniendo al resto de los residuos en la configuración que se les

determinó experimentalmente, mientras que con Schrödinger todo el sitio activo tiene la capacidad de moverse y optimizarse a las posibles poses, causando que el espacio conformacional del complejo se pueda estudiar mejor.

Por lo tanto, se considera que ambos resultados son independientes y no comparables, siendo cada resultado un posible modo de unión que pueden tener las ocho sapogeninas estudiadas con la CYP17A1, ya que la representación física del algoritmo de cada programa es diferente. Si bien, ambos programas tratan de representar un modelo de ajuste inducido que sufren las enzimas, la metodología de Schrödinger permite explorar mejor el panorama conformacional de la interacción del complejo ligando-receptor, mientras que AutoDock Vina lo hace con menos grados de libertad combinando parte del modelo de ajuste inducido en los residuos flexibles y del modelo de llave-cerradura en aquellos que se mantienen rígidos.

6.5 Comparación de los resultados entre Autodock Vina y Schrödinger del acoplamiento molecular entre la enzima CYP21A2 y las sapogeninas

De manera similar a lo ocurrido con CYP17A1, las ocho sapogeninas estudiadas mostraron interacción en el sitio activo de la enzima CYP21A2. De todas las estructuras, la única energía de acoplamiento que fue menor a la Progesterona y la abiraterona la presentó *i*-esteroide (Gráfica 4). Las diferencias entre los valores de energía van desde los 1.7 kcal/mol para la 5aOHLaxo y hasta los 5.5 kcal/mol como es el caso de la glydiosgenia. Si bien todas estructuras podrían unirse al sitio activo, solo *i*-esteroide competiría con el sustrato endógeno para bloquear su unión incluso mejor que la abiraterona.



Gráfica 4: Energías de interacción de las moléculas estudiadas con la enzima CYP21A2 utilizando la metodología de acoplamiento flexible.

Para el análisis de interacciones y determinar si las sapogeninas tienen el potencial de bloquear el sitio de la enzima, se consideró como residuo catalítico importante a Arg234, cuyo papel es el anclaje, selección del sustrato y el posicionamiento de éste [133]. De los complejos obtenidos, ninguno formó puente de hidrógeno con Arg234, dándose en su lugar interacciones por puente de hidrógeno con los residuos: Val101, Ile231, Asp235, Ala363, Glu295, Asp288 y Ile291 (Tabla 11). Si bien la interacción con Arg234 no ocurre por la interacción esperada, la diosgenina, 5aOHLaxo, oxima-*i*-esteroide, glyiesteroide y oxima5aOHLaxo lo hacen con éste por interacciones de tipo alquilo. En la literatura se encontró que no es necesaria la interacción con Arg234 para poder bloquear la enzima, basta con que exista interacción con el átomo de Fe para tener esta actividad [134]. Dado que con AutoDock Vina no se logra simular la interacción con los iones metálicos, la posibilidad de inhibición enzimática no se puede descartar.

Tabla 11: Resultados del acoplamiento molecular de las moléculas estudiadas, la progesterona y abiraterona con la enzima CYP21A2.

Molécula	energía de acoplamiento (kcal/mol)	Residuos con interacción

progesterona	-11.9	Leu110 , Trp202, Arg234 , Ile291, HEM
abiraterona	-11.4	Val101, Leu110, Val198, Trp202, Arg234 , Ile291, Val360, Leu364, HEM
diosgenina	-7.7	Val101, Leu110 , Val198, Leu199, Trp202, Ile231 , Arg234 , Asp235 , Val287, Ile291, Val360, Leu364, Val470, HEM
5aOHLaxo	-10.2	Val101, Leu110 , Val198, Trp202, Ile231, Arg234 , Met284, Val287, Ile291, Ala363 , Leu364, HEM
acetato5aOHLaxo	-9	Val101, Val198, Leu199, Trp202, Ile231, Arg234 , Met284, Val287, Ile291, Gly292, Leu364, Val470
oxima- <i>i</i> -esteroide	-6.9	Val101, Val198, Leu199, Ile291, Trp202, Ile231, Arg234 , Val287, His283, Met284, Val287, Asp288 , Leu291, Leu364, Val470,
glydiosgenina	-6.4	Val101 , Leu110 , Val198, Leu199, Trp202, Asp235 , Val287, Ile291, Val360, Leu364, Val470, Ile471, HEM
<i>i</i> -esteroide	-12.5	Val101, Leu110 , Val198, Trp202, Met284, Val297, Ile291, Gly292, Val360, Leu364, Val470, Ile471, HEM
glyiesterioide	-7	Val101, Leu110 , Trp202, Ile231, Arg234 , Val287, Ile291, Glu295 , Thr296 , Leu364, Val470, HEM
oxima5aOHLaxo	-9.8	Val101, Leu110 , Val198, Ile231, Arg234 , Met284, Val287, Ile291 , Gly292, Leu364

En negritas residuos que coinciden con aquellos considerados catalíticos.

En verde aquellos con los cuales presentan puentes de hidrógeno.

En rojo se agruparon todas aquellas interacciones débiles.

En negro los residuos con interacciones desfavorables.

Basándose en los residuos que se consideran como parte del sitio catalítico, además de aquellos con los cuales las moléculas tuvieron interacción y el número de puentes de hidrógeno, se propone a diosgenina, glyiesterioide y glydiosgenina

como posibles inhibidores de la enzima CYP21A2 (Figura 16). Adicionalmente, se considera que la 5aOHLaxo y la oxima5aOHLaxo también podrían ser inhibidores, debido a que presentan un puente de hidrógeno con la enzima.

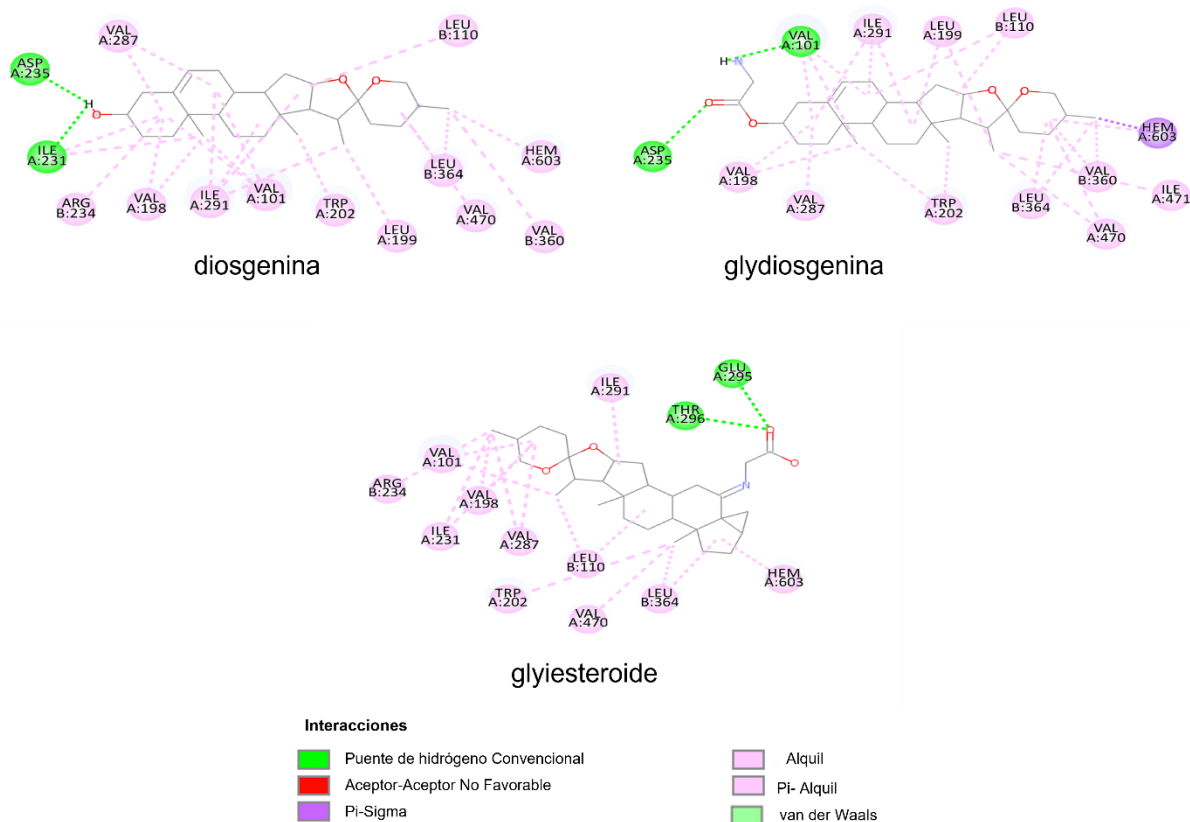
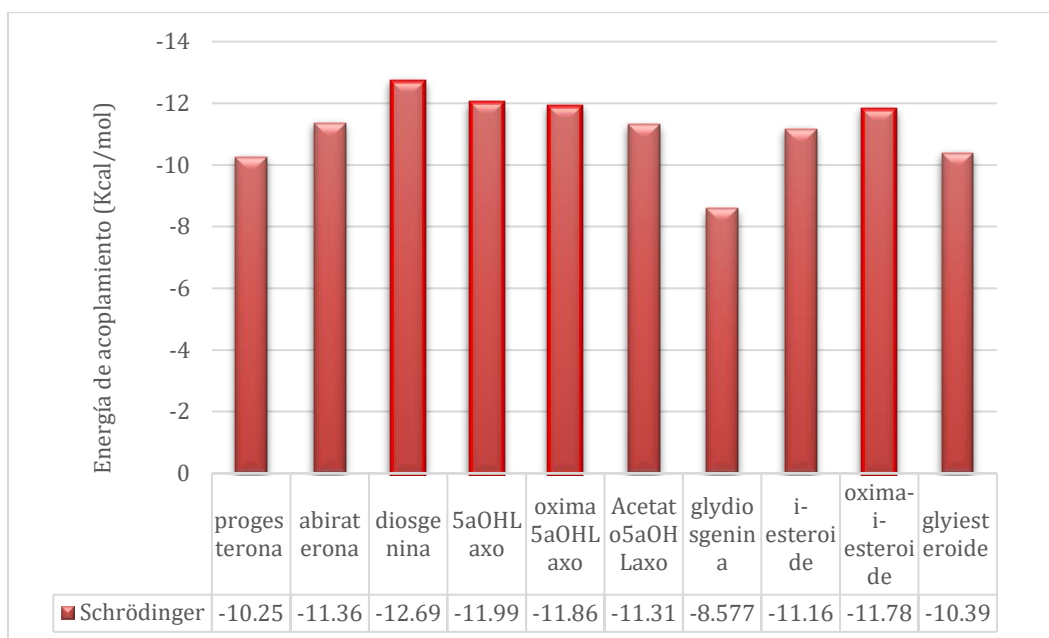


Figura 16: Diagramas de interacción 2D de los ligandos diosgenina, glydiosgenina y glyiesteroide con la enzima CYP21A2.

En contraste con los resultados de AutoDock Vina para la CYP21A2, se obtuvo que 7 de las 8 sapogeninas, específicamente la diosgenina, 5aOHLaxo, oxima5aOHLaxo, acetato5aOHLaxo, *i*-esteroide, oxima-*i*-esteroide y glyiesteroide, forman un complejo enzima-sustrato con una energía menor a la obtenida con la progesterona (Gráfica 5). La glydiosgenina es la única sapogenina que se acopla con una mayor energía que la del ligando endógeno, indicando el posible potencial de estas estructuras como competidores del sitio activo de la CYP21A2. Además, de las siete sapogeninas con energía de acoplamiento menor a la de la progesterona, todas a excepción de la acetato5aOHLaxo y *i*-esteroide tienen una energía menor a la de la abiraterona.



Gráfica 5: Energías de acoplamiento de las moléculas estudiadas con CYP21A2 utilizando la metodología IDF.

El análisis de las interacciones entre las moléculas estudiadas y la CYP21A2 mostró que las poses de la diosgenina, 5aOHLaxo, oxima5aOHLaxo, glydiosgenina y glyiesteroide, interactúan a través de la Arg234 mediante un puente de hidrógeno con el sitio catalítico de la enzima. Adicionalmente, se mostró este tipo de interacción con los residuos: Asp107, Ile,291, Gly292, Thr296, Ser469, Asp288 (Tabla 12).

Tabla 12: Resultados del acoplamiento molecular de las moléculas estudiadas con CYP21A2.

Molécula	Energía de acoplamiento (kcal/mol)	Residuos con interacción
progesterona	-10.253	Leu110, Leu199, Trp202, Arg234 , Ile291, HEM
abiraterona	-11.36	Val101, Leu110, Trp202, Arg234 , Ile291, Thr296 , Val360, Leu364, HEM
diosgenina	-12.690	Val101, Leu110 , Val198, Trp202, Leu227, Ile231, Arg234 , Val287, Ile291, Val360,

		Leu364, Val470, HEM
5aOHLaxo	-11.986	Val101, Val198, Trp202, Leu227, Ile231, Arg234 , Ile291, Gly292 , Thr296 , Val360, HEM
acetato5aOHLaxo	-11.313	Val101, Leu110 , Val198, Trp202, Leu227, Ile231, Val287, Ile291 , Val360, Leu364, Val470, HEM
oxima- <i>i</i> -esteroide	-11.777	Val101, Leu110 , Val198, Leu199, Trp202, Ile231, Arg234 , Ile291, Thr296, Val360, Leu364, Val470, Ile471, HEM
glydiosgenina	-8.577	Leu40, Asp107 , Leu110 , Arg234 , leu364, Pro365, Ser469 , Val470,
<i>i</i> -esteroide	-11.157	Val101, Val198, Leu199, Trp202, Gly292, Val360, Val470, Ile471, HEM
glyiesterioide	-10.386	Tyr98, Pro95, Leu110 , Asp107 , Leu199, Trp202, Arg234 , Asp288 , Ile291, Leu364, Pro365, Val470, HEM
oxima5aOHLaxo	-11.313	Val101, Lau110 , Val198, Trp202, Ile221, Leu227, Arg234 , Val287, Ile291 , Thr296 , Val360, Leu364, Val470 HEM

En negritas residuos que coinciden con aquellos considerados catalíticos.

En verde aquellos con los cuales presenta puentes de hidrógeno.

En negro se agruparon todas aquellas interacciones débiles.

En rojo los residuos con interacciones desfavorables.

Las sapogeninas que presentaron un mayor número de interacciones fuertes con CYP21A2 que se traduce en la formación de un complejo más estable son: 5aOHLaxo, glyiesterioide, glydiosgenina oxima5aOHLaxo (Figura 17), teniendo en total 3 puentes de hidrógeno con los residuos del sitio activo, entre los que se incluye el residuo Arg234, por lo que estas 4 estructuras serían propensas a bloquear el sitio activo de la enzima. Adicionalmente, la diosgenina presenta la interacción necesaria con la Arg234, para unirse de manera selectiva a la CYP21A2, lo cual la hace un posible inhibidor.

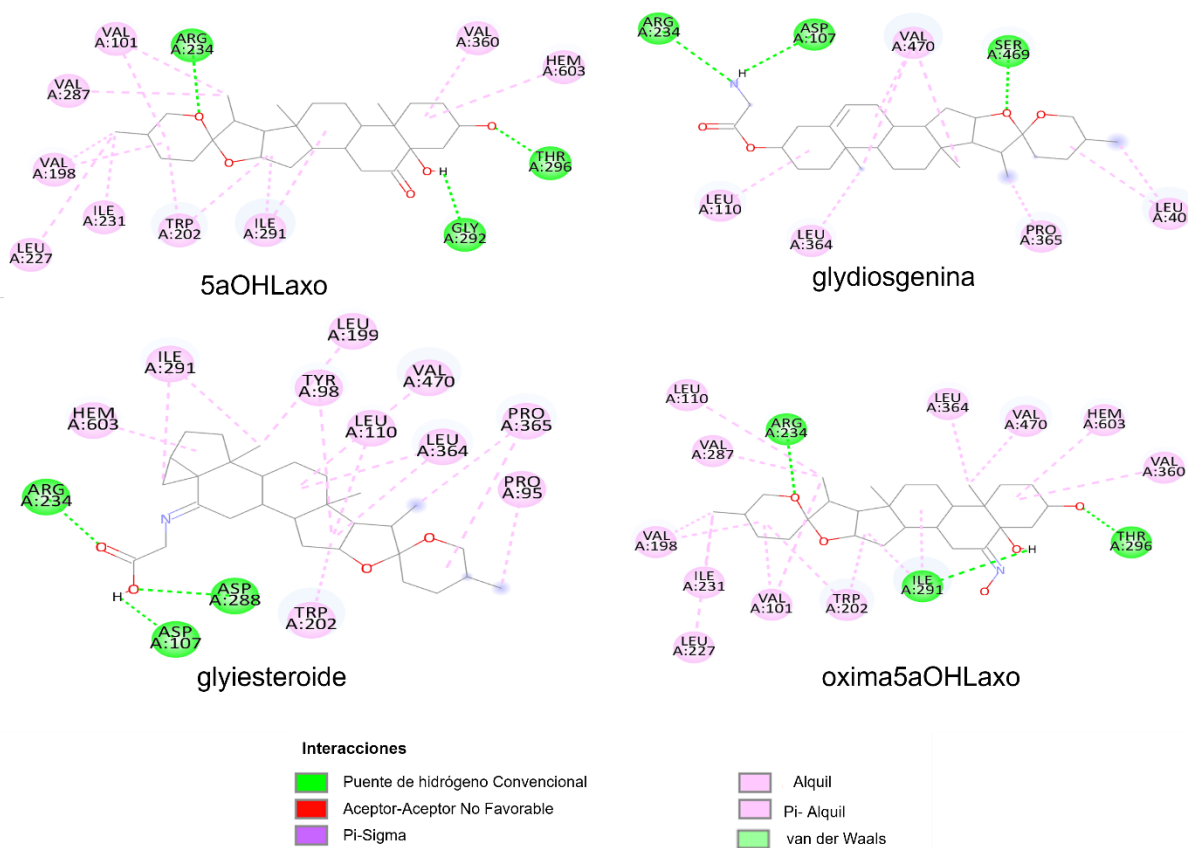
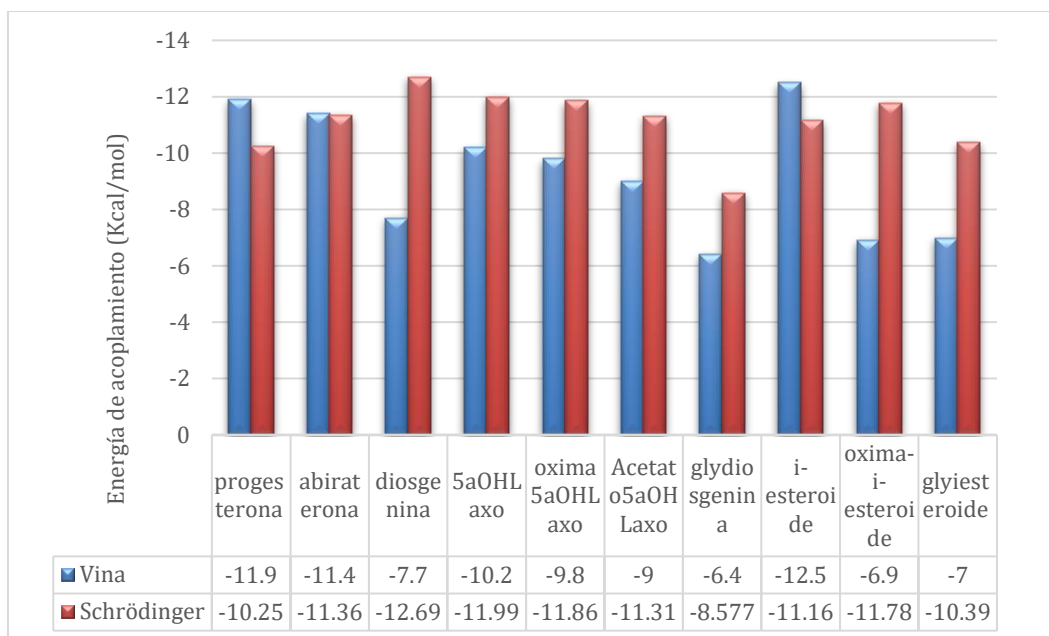


Figura 17: Diagramas 2D obtenidos de interacción de los ligandos 5aOHLaxo, glyliesteroide, glydiosgenina y oxima5aOHLaxo con la enzima CYP21A2.

6.6 Comparación de los resultados entre Autodock Vina y Schrödinger del acoplamiento molecular entre la enzima CYP17A2 y las sapogeninas

Tal como se hizo con la CYP17A1, se compararon los resultados obtenidos de ambos programas para el acoplamiento de las sapogeninas con CYP21A2 y se observó que no todas las energías de acoplamiento obtenidas con la metodología de IDF eran menores a la de las de AutoDock Vina. Siendo los valores de energía para los complejos de progesterona y abiraterona menores en AutoDock Vina (Gráfica 6).



Gráfica 6: Comparación de las energías de acoplamiento obtenidas con los dos programas utilizados para el acoplamiento de las 8 sapogeninas estudiadas con la enzima CYP21A2.

Para seleccionar y proponer cuáles estructuras podrían fungir como inhibidores de la actividad de la CYP21A2, se decidió usar como parámetro selectivo la interacción con Arg234, por lo que, basándose en los resultados de AutoDock Vina, diosgenina, glydiosgenina y glyiesteroide fueron seleccionados como posibles inhibidores cuya acción sería específica. Por otra parte, glydiosgenina, 5aOHLaxo, oxima5aOHLaxo y glyiesteroide fueron seleccionados, con base en los resultados de la Tabla 13. De estas moléculas, ambos programas concuerdan en que la glydiosgenina y glyiesteroide podrían bloquear la actividad de la enzima de manera específica.

Tabla 13: Estructuras seleccionadas como inhibidores específicos y no específicos de CY21A2 basados en los resultados con los dos programas empleados.

	AutoDock Vina	Schrödinger
Estructura con posible actividad de inhibición específica con la enzima CYP21A2	diosgenina, glydiosgenina y glyiesteroide.	glydiosgenina, 5aOHLaxo y oxima5aOHLaxo y glyiesteroide.
Estructura con	5aOHLaxo	acetato5aOHLaxo.

<p>posible actividad de inhibición inespecífica con la enzima CYP21A2</p>	<p>y oxima5aOHLaxo.</p>	
--	-------------------------	--

La superposición de las poses obtenidas para la glydiosgenina y glyiesteroide que se obtuvieron con ambos programas (Figura 18) muestran un comportamiento parecido al obtenido con CYP17A1 que, si bien hay acoplamiento de las estructuras, no se realiza en la misma región del sitio activo además de que no se superpone ninguna parte de las estructuras de las dos moléculas.

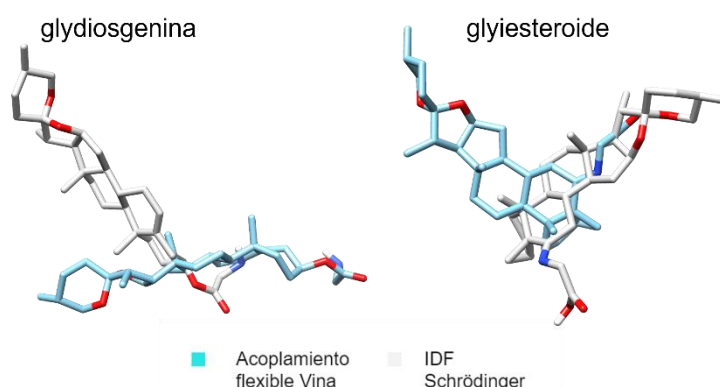


Figura 18: Superposición de las poses de las moléculas cuya actividad se propone puede ser inhibidora específica de CYP21A2 y que concuerda en ambos programas utilizados.

6.7 Comparación de los resultados entre Autodock Vina y Schrödinger del acoplamiento molecular entre las enzimas CYP17A1 y CYP21A2

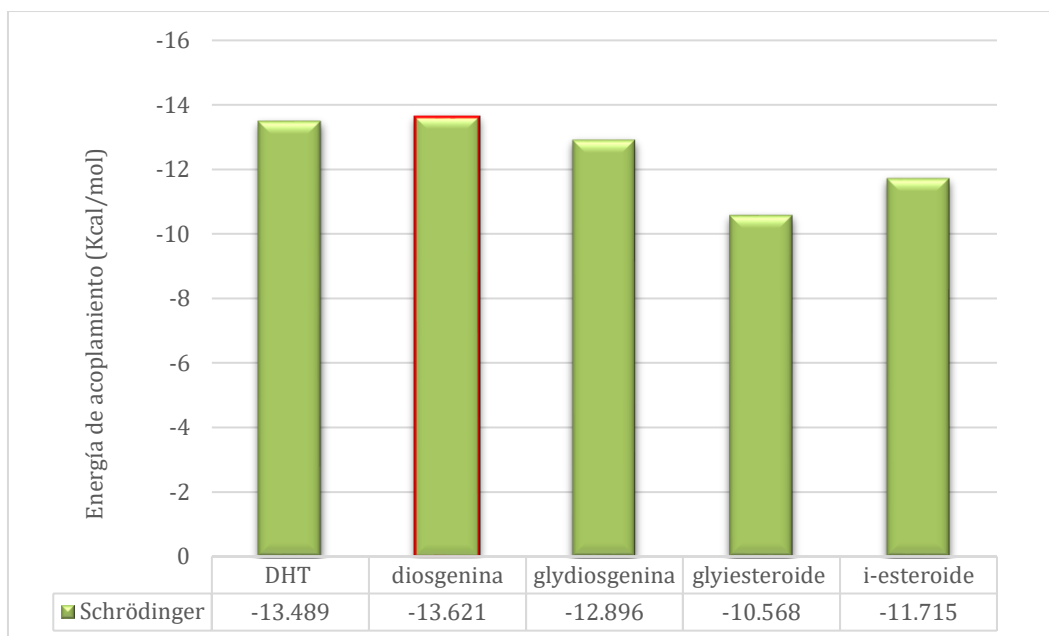
La realización del docking de las ocho sapogeninas estudiadas con las dos enzimas utilizadas en este trabajo, fue para asegurar que las moléculas interactúan con la CYP17A1 y pudieran bloquear su sitio activo, no lo hicieran con la CYP21A2. Permitiendo seleccionar posibles inhibidores específicos para la CYP17A1 que sirvieran para tratar el PCRC y evitarán los efectos secundarios por bloquear otras enzimas de la misma familia, como el síndrome de exceso de mineralocorticoides [135].

Con base en los resultados de los acoplamientos presentados anteriormente y a las moléculas seleccionadas en las Tablas 9 y 12, se propone como posible inhibidor

específico de la CYP17A1 al oxima-*i*-esteroide, debido a que es la única estructura que se menciona bloquea la enzima CYP17A1 y no a la enzima CYP21A2 ya sea de manera específica o inespecífica. Aunque estos resultados deben validarse por metodologías experimentales, también es posible realizar previamente la dinámica molecular de los complejos obtenidos, para comprobar las interacciones entre las moléculas y las proteínas, permitiendo ver si el resto de las moléculas no tiene posible capacidad inhibitoria específica que no se pudo determinar por medio de este análisis *in silico*. Además, con base en los resultados de AutoDock Vina, se sugiere que el glyiesteroide puede llegar a tener una actividad que bloquee a ambas de manera específica mientras que, con los resultados de Schrödinger, la 5aOHLaxo es la estructura que puede inhibir ambas mediante la interacción algún residuo catalítico importante.

6.8 Receptor de andógenos (RA)

De las 8 estructuras de sapogeninas estudiadas a lo largo del trabajo, únicamente la diosgenina, glydiosgenina, glyiesteroide y *i*-esteroide mostraron un acoplamiento por IDF con el dominio de unión a ligando del RA, haciendo que solo cuatro de ocho estructuras estudiadas tengan potencial para unirse a este sitio. Al comparar la energía de acoplamiento de las cuatro moléculas mencionadas y compararlas con un activador endógeno como lo es la dihidrotestosterona (Gráfica 7), se observa que la Diosgenina muestra energía de unión ligeramente más baja a la del DHT, variando únicamente en 0.132 kcal/mol. En segundo lugar, por encima de la energía del activador está la glydiosgenina, que se acopla con una diferencia de energía de 0.593 kcal/mol. Las dos moléculas restantes, por otro lado, varían en energía de acoplamiento por más de 2 kcal/mol.



Gráfica 7: Energías de acoplamiento de las sapogeninas estudiadas en el dominio de unión a ligando del RA.

Del mecanismo de activación del RA se conocen los residuos que hacen que este receptor nuclear adquiera la conformación necesaria para activarse y llevar a cabo sus actividades. Al encontrarse en estado inactivado, el RA se encuentra en complejo con proteínas de choque térmico y chaperonas, pero al unirse un activador al dominio de unión a ligando, se generan cambios conformacionales que causan el desplazamiento de la hélice 12 sobre éste [136]. Los residuos clave necesarios para mediar esta activación de agonistas como la DHT y testosterona son la Gln711, Arg752, Asn705 y Thr877 [137].

La realización del acoplamiento de ajuste inducido con la DHT recreó las interacciones importantes que se han encontrado y que son responsables de la unión de esta molécula en el LBD y la activación de éste. Obteniéndose los puentes de hidrógeno con los residuos Gln711, Arg752, Asn705 y Thr877 (Tabla 14). De las sapogeninas estudiadas, la diosgenina logra interactuar en este sitio mediante puentes de hidrógeno con la Gln711, Arg752 y Met742, teniendo algunas de las interacciones clave para su activación. La glydiosgenina interactúa igual mediante los residuos Gln711 y Arg752. Por otro lado, los compuestos restantes *i*-esteroide y glyiesteroide si interactúan en el sitio de unión a ligando, pero no lo hacen mediante alguna interacción de tipo fuerte, únicamente mediante interacciones débiles de tipo alquilo.

Tabla 14: Resultados del acoplamiento molecular de las moléculas estudiadas y la DHT en el sitio de unión a ligando del RA.

Molécula	Energía de acoplamiento (Kcal/mol)	Residuos con interacción
DHT	-13.197	Leu704, Asn705 , Gln711 , Trp741, Met742, Met745, Arg752 , Met780, Leu873, Thr877 , Phe876
diosgenina	-13.621	Phe697, Leu701, Leu704, Gln711 , Trp741, Met742, Met745 , Arg752 , Ser778, Arg779, Met780, Phe873, Leu880, Phe891
glydiosgenina	-12.896	Leu701, Leu704, Gln711 , Met745, Arg752 , Phe764, Ser778, Arg779, Leu873, Phe876, Phe891
<i>i</i> -esteroide	-11.715	Leu701, Leu704, Leu707, Trp741, Met742, Met745, Ser778, Arg779, Met780, Phe876, Leu880, Phe891.
glyiesteroide	-10.568	Leu701, Leu704, Leu707, Met745, Arg779, Met780, Phe876, Leu880, Phe891

En negritas residuos que coinciden con aquellos considerados catalíticos.

En verde aquellos con los cuales presentan puentes de hidrógeno.

En egro se agruparon todas aquellas interacciones débiles.

En rojo los residuos con interacciones desfavorables

Por los tipos de interacción obtenidos, parece que la diosgenina y glydiosgenina pueden actuar como activadores del RA, pero dado el tamaño de las moléculas se plantea que no permitirían que el LBD adquiriera una conformación necesaria para activar el receptor. Sin embargo, es necesario realizar la dinámica molecular del complejo predicho para ver el efecto de estas estructuras sobre el dominio de unión. Adicionalmente, el *i*-esteroide y glyiesteroide podrían tener un efecto de bloqueo en el sitio de unión para su activación, pero dada la energía de acoplamiento no impedirían la unión de sus activadores como la DHT.

6.9 Análisis bioinformático

Debido a que hubo acoplamiento de las ocho sapogeninas con las dos enzimas CYP, así como interacciones fuertes con algunos residuos del sitio activo, se decidió estudiar más a fondo la secuencia, estructura y características fisicoquímicas del sitio activo de las enzimas. Como resultado del alineamiento de secuencias proteicas realizado en BLASTP, se obtuvo que se tiene una identidad del 31.99% entre las enzimas, con una similitud del 52% entre sus aminoácidos y un E-value de 4×10^{-32} , indicándonos que el resultado tiene significancia estadística. Al concentrarse en los residuos catalíticos de ambas enzimas (Figura 19), se observa que existe conservación en la posición de algunos residuos que para una son parte del sitio catalítico y que en la otra no, como lo son la Asp116, Glu305, Arg347, Val366 de la CYP17A1 y la Asp112, Glu295, Arg340 y Val359 de la CYP21A2.

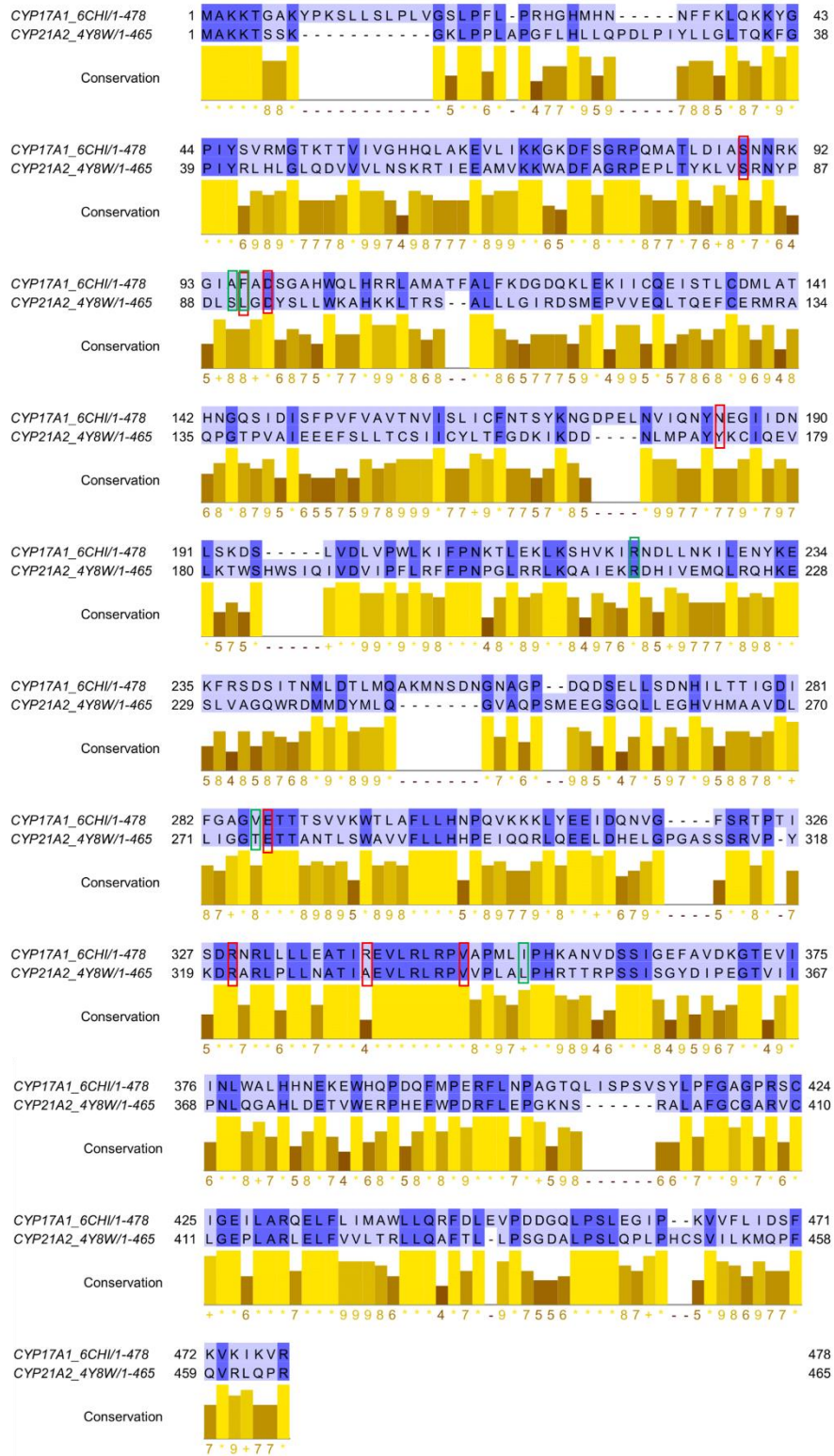


Figura 19: Alinamiento de las enzimas CYP17A1 y CYP21A2 realizado con BLASTP, los residuos catalíticos de la primera se muestran encerrados en un rectángulo rojo y los de la segunda en verde.

A nivel de secuencia, las enzimas CYP17A1 y 21A2 mostraron conservación en algunos residuos que en una u en otra eran considerados parte del sitio catalítico, por lo que, podrían ser la razón por la cual no es posible bloquear una enzima sin inhibir la acción de la otra. Razón por la cual, también se realizó el alineamiento tridimensional de las estructuras del PDB para observar si los residuos alineados con BLASTP se encuentran espacialmente en la misma posición y se pudiera determinar si estos son responsables de que no se pueda inhibir una enzima selectivamente. Con los resultados de PBeFOLD, se resaltaron aquellos residuos que se alinearon tanto en la secuencia como tridimensionalmente en el sitio activo de ambas enzimas (Figura 20). De la CYP17A1 la Arg239, Glu305, Thr306, Val366, Asp298 y Val489 concuerdan con la Arg234, Glu295, Thr296, Val359, Asp288 y Val489 de la CYP21A2. La presencia de residuos polares como la Arg, Thr, Glu y Asp en la misma posición, puede considerarse una de las razones para que la inhibición selectiva de la CYP17A1 sea difícil de realizar, esto debido a sus características fisicoquímicas que les permiten formar puentes de hidrógeno. En algunos casos de las poses obtenidas en los resultados, es apreciable que estos residuos son puntos de anclaje y de interacción de algunas sapogeninas con las enzimas.

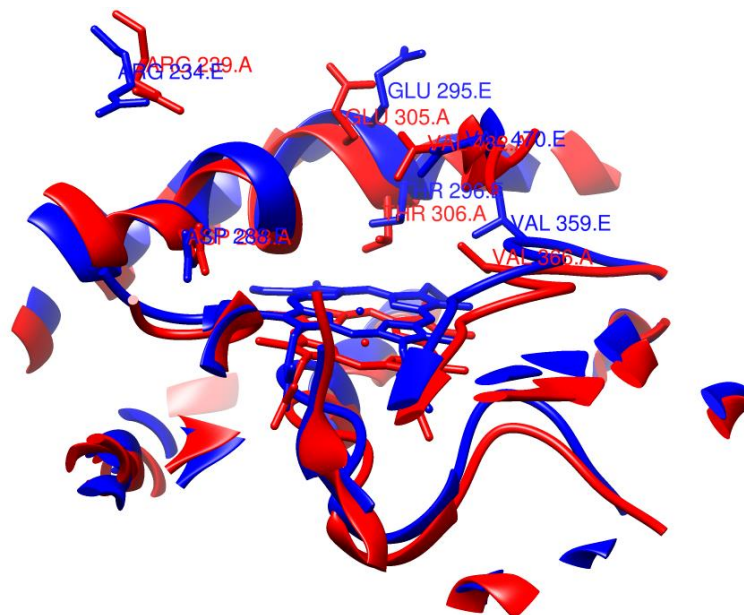


Figura 20: Superposición del sitio activo de las enzimas CYP17A1 (Rojo) y CYP21A2 (Azul) resultante del alineamiento estructural con PBeFold.

Considerando lo anterior, se observó que de las ocho sapogeninias acopladas en el programa de AutoDock Vina, la aceto5aOHLaxo y glydiosgenina interactúan mediante puente de hidrógeno con la Arg239 con la CYP17A1, haciéndolas candidatas a interactuar de manera no específica con la CYP21A2 a causa de la Arg234. Los resultados del acoplamiento con AutoDock Vina de la CYP21A2 no dieron indicios de una posible interacción de las dos moléculas con la Arg234, siendo la glydiosgenina la única que si interactúa con este residuo. Por otro lado, según los resultados que se obtuvieron para la CYP17A1 con AutoDock Vina, la aceto5aOHLaxo, glydiosgenina y *l*-esteroide son 3 estructuras que mostraron interacción con la Arg239 y de estas solo con la glydiosgenina se mostró interacción con la Arg234 de la CYP21A2.

Otro de los residuos con el cual tuvieron interacción las moléculas estudiadas y que concuerdan con aquellos que se plantean son la causa de la difícil inhibición selectiva de las CYP es la Thr306 de la CYP17A1 y Thr296 de la CYP21A2. Residuo con el cual, el *l*-esteroide de los resultados de AutoDock Vina para la CYP17A1, forma un puente de hidrógeno, y el glyiesteroide de IDF también interactúa. Concordando únicamente el glyiesteroide con el mismo residuo de la CYP21A2 que se obtuvo con el IDF.

Adicionalmente a los alineamientos de secuencias y tridimensional de las enzimas CYP17A1 Y CYP21A2, también se analizó la similitud fisicoquímica de los sitios activos de ambas enzimas, realizando los mapas de hidrofobicidad y de puentes de hidrógeno de la cavidad del sitio activo, localizado sobre el grupo hemo de las enzimas (Figura 21). En el caso de la CYP17A1 la enzima muestra un sitio activo que muestra ser más del 50% hidrofóbico con una región neutra y ligeramente polar en la parte superior derecha, zona donde se encuentra la Asn202 y la Arg234. En cuanto a las zonas de especies donadoras yceptoras de puentes de hidrógeno, se observa que exactamente donde la hidrofobicidad del sitio activo de la CYP17A1 disminuye, es donde se encuentra una zona donadora de puentes de hidrógeno que es la Arg234 y una zona aceptora que es la Asn202. A diferencia, la CYP21A2 muestra tener un sitio activo casi completamente hidrofóbico, con zonas ligeramenteceptoras de puentes de hidrógeno en la parte inferior derecha.

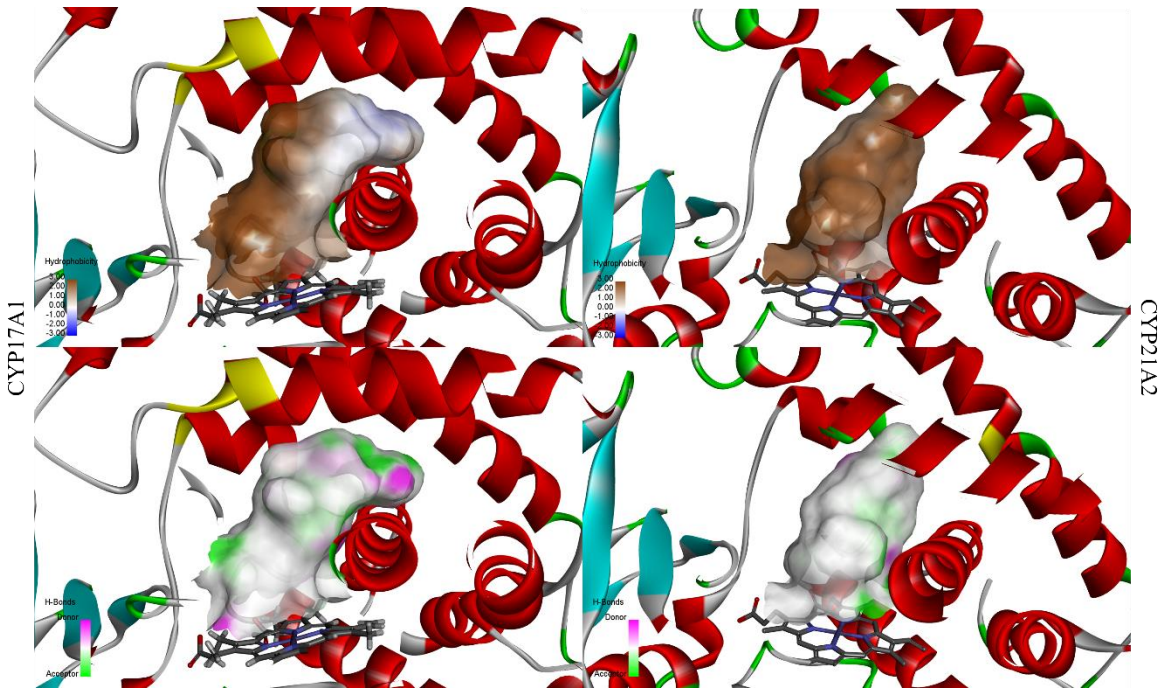


Figura 21: Contorno de superficie del sitio activo de la CYP17A1 (lado derecho) y CYP21A2 (lado izquierdo)

Considerando las características hidrofóbicas y aceptoras/donadoras de puente de hidrógeno de los sitios activos de las enzimas estudiadas, se tiene que la CYP21A2 muestra un sitio activo más hidrofóbico y con menos zonas para realizar puentes de hidrógeno con los inhibidores que sirven para bloquear a la CYP17A1.

Capítulo 7

Conclusiones

Después de llevar a cabo un análisis y discusión de los resultados obtenidos usando diferentes herramientas basadas en la química cuántica computacional, las cuales han servido para describir y/o predecir las posibles interacciones de ocho sapogeninas para su aplicación en el tratamiento del cáncer de próstata resistente a la castración (CPRC), se han obtenido las siguientes conclusiones:

1. Las ocho sapogeninas estudiadas presentan la capacidad de acoplarse tanto con el sitio activo de la enzima CYP17A1 como de la enzima CYP21A2, siendo diferentes los resultados obtenidos al utilizar la metodología de acoplamiento flexible de AutoDock Vina y la de acoplamiento de ajuste inducido de Schrödinger. Con los resultados de AutoDock VINA, dada la interacción con la Asn202 y las energías de acoplamiento obtenidas, se propone que los siguientes ligandos: 5aOHLaxo, oxima-*i*-esteroide y glyiesteroide pueden ser inhibidores específicos de la enzima CYP17A. Mientras que, con base en los resultados obtenidos con el software Schrödinger, la diosgenina, 5aOHLaxo y oxima-*i*-esteroide son las que pueden tener esta actividad.
2. El uso de los resultados de ambas plataformas permite proponer como posible inhibidor específico de la CYP17A1 al oxima-*i*-esteroide, debido a que es la única estructura que bloquea la CYP17A1 y no a la CYP21A2 ya sea de manera específica o inespecífica.
3. Las moléculas diosgenina, glydiosgenina, glyiesteroide y *i*-esteroide muestran acoplamiento con el LBD del RA. Siendo la diosgenina la molécula que forma un complejo más estable que el ligando endógeno DHT, presentando interacción con los residuos involucrados en la activación del RA. Las cuatro moléculas dado el tamaño molecular que presentan se sugieren tienen la posibilidad de bloquear la activación del RA. La realización de una dinámica

molecular del LBD del RA con estas cuatro moléculas permitiría validar esta idea.

4. La conservación a nivel estructural de los residuos Arg239, Glu305, Thr306, Val366, Asp298 y Val489 de la CYP17A1 con la Arg234, Glu295, Thr296, Val359, Asp288 y Val470 de la CYP21A2 se considera una de las principales razones por la cual es difícil realizar la inhibición específica de la CYP17A1.

Capítulo 8

Bibliografía

[1] Organización Mundial de la Salud (3 de marzo de 2021). *Cáncer*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.

[2] Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, *et al.* (2020). *Global Cancer Observatory: Cancer Today*. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2020. <https://gco.iarc.fr/today>

[3] Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). *Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. *CA: a cancer journal for clinicians*, 71(3), 209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>

[4] Dembitsky, V. M., Savidov, N., Poroikov, V. V., Glorizova, T. A., & Imbs, A. B. (2018). *Naturally occurring aromatic steroids and their biological activities*. *Applied microbiology and biotechnology*, 102(11), 4663-4674. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8968-7>

[5] Vil, V. A., Terent'ev, A. O., Savidov, N., Glorizova, T. A., Poroikov, V. V., Pounina, T. A., & Dembitsky, V. M. (2019). *Hydroperoxy steroids and triterpenoids derived from plant and fungi: Origin, structures and biological activities*. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 190, 76-87. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2019.03.020>

[6] Lossignol, D. (2016). *A little help from steroids in oncology*. *Journal of Translational Internal Medicine*, 4(1) 52-54. <https://doi.org/10.1515/jtim-2016-0011>

[7] Cancer Research UK. (3 de julio de 2019). *Steroids (dexamethasone, prednisolone, methylprednisolone and hydrocortisone)*. <https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/cancer-in-general/treatment/cancer-drugs/drugs/steroids>

[8] BECKETT, V. L., & BRENNAN, M. J. (1959). *Treatment of advanced breast cancer with fluoxymesterone (halotestin)*. *Surgery, gynecology & obstetrics*, 109(2), 235–239.

[9] Xiao, Z., Morris-Natschke, S. L., & Lee, K. H. (2016). *Strategies for the Optimization of Natural Leads to Anticancer Drugs or Drug Candidates*. *Medicinal research reviews*, 36(1), 32–91. <https://doi.org/10.1002/med.21377>

- [10] Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2020). *Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019*. *Journal of natural products*, 83(3), 770-803. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285>
- [11] Carrasco-Caballero, A. (2018). *Síntesis y Evaluación Biológica de Nuevos Agentes Anticancerígenos y Promotores de Crecimiento Vegetal a Partir de Sapogeninas Esteroidales*. [Tesis de maestría]. BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
- [12] Suárez-Santana, C. M. (2017). *Estudio morfológico, histológico y patológico de las próstatas de cetáceos odontocetos*. [Tesis doctoral]. Universidad De Las Palmas De Gran Canaria.
- [13] Robles Rodríguez, Alfredo, Garibay Huarte, Tania Rocío, Acosta Arreguín, Eduardo, & Morales López, Sara. (2019). *La próstata: generalidades y patologías más frecuentes*. *Revista de la Facultad de Medicina*. <https://doi.org/10.22201/fm.24484865e.2019.62.4.07>
- [14] Lee, S. H., & Shen, M. M. (2015). Cell types of origin for prostate cancer. *Current opinion in cell biology*, 37, 35-41. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.10.002>
- [15] Rodríguez, A. R., Huarte, T. R. G., Arreguín, E. A., & López, S. M. (2019). (2019) *The prostate: generalities and most frequent pathologies*. *Rev Fac Med UNAM*. 2019;62(4):41-54. <https://doi.org/10.22201/fm.24484865e.2019.62.4.07>
- [16] Kinter, K. J., & Anekar, A. A. (2022). *Biochemistry, Dihydrotestosterone*. In *StatPearls* [Internet]. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557634/>
- [17] Banerjee, P. P., Banerjee, S., Brown, T. R., & Zirkin, B. R. (2018). *Androgen action in prostate function and disease*. *American journal of clinical and experimental urology*, 6(2), 62–77. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5902724/>
- [18] Huggins, C., & Hodges, V.C. (2005). *The Effect of Castration, Of Estrogen and of Androgen Injection on Serum Phosphatases in Metastatic Carcinoma of the Prostate*. *The Endocrinologist*, 15(6), 335–339. <https://doi.org/10.1097/01.ten.0000196289.33630.45>
- [19] Takizawa, I., Nishiyama, T., Hara, N., Isahaya, E., Hoshii, T., & Takahashi, K. (2010). *Serum prostate-specific antigen levels reflect the androgen milieu in patients with localized prostate cancer receiving androgen deprivation therapy: Tumor malignant potential and androgen milieu*. *The Prostate*, 70(13), 1395–1401. doi:10.1002/pros.21174
- [20] American Cancer Society. (s.f). *Cómo entender su informe de patología: cáncer de próstata*. <https://www.cancer.org/es/tratamiento/como-comprender-su-diagnostico/pruebas/como-comprender-su-informe-de-patologia/patologia-de-la-prostata/patologia-del-cancer-de->

prostata.html#:~:text=%C2%BFQu%C3%A9%20es%20el%20adenocarcinoma%3F,encuentra%20en%20la%20gl%C3%A1ndula%20prost%C3%A1tica

[21] Bolaños Morera, Pamela, & Chacón Araya., Carolina. (2017). *Escala patológica de Gleason para el cáncer de próstata y sus modificaciones. Medicina Legal de Costa Rica*, 34(1), 237-243. http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-00152017000100237&lng=en&tling=es.

[22] Buyyounouski, M. K., Choyke, P. L., McKenney, J. K., Sartor, O., Sandler, H. M., Amin, M. B., ... & Lin, D. W. (2017). *Prostate cancer—major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. CA: a cancer journal for clinicians*, 67(3), 245-253. <https://doi.org/10.3322/caac.21391>

[23] American Joint Committee on Cancer. (2017). *Prostate. en Nuyyounousli, M.K et al. (Ed.) AJCC Cancer Staging Manual (8vo ed., pp. 723-724). Springer*

[24] Dunn, M. W., & Kazer, M. W. (2011). *Prostate cancer overview. In Seminars in oncology nursing*, 27(4), 241-250. <https://doi.org/10.1016/j.soncn.2011.07.002>

[25] Instituto Nacional del Cáncer. (s.f). *castración*. <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/castracion>

[26] American Cancer Society. (23 de septiembre de 2021). *Hormone Therapy for Prostate Cancer*. <https://www.cancer.org/cancer/prostate-cancer/treating/hormone-therapy.html>

[27] Dongre, A., Prabhash, K., & Noronha, V. (2012). *The changing landscape of hormonal therapy in castration-resistant prostate cancer. South Asian journal of cancer*, 1(2), 53–55. <https://doi.org/10.4103/2278-330X.103707>

[28] Chowdhury, S., Beitel, L. K., Lumbroso, R., Purisima, E. O., Paliouras, M., & Trifiro, M. (2019). *A targeted bivalent androgen receptor binding compound for prostate cancer therapy. Hormones and Cancer*, 10(1), 24-3. <https://doi.org/10.1007/s12672-018-0353-6>

[29] Harris, W. P., Mostaghel, E. A., Nelson, P. S., & Montgomery, B. (2009). *Androgen deprivation therapy: progress in understanding mechanisms of resistance and optimizing androgen depletion. Nature clinical practice. Urology*, 6(2), 76–85. <https://doi.org/10.1038/ncpuro1296>

[30] Pienta, K. J., & Bradley, D. (2006). *Mechanisms underlying the development of androgen-independent prostate cancer. Clinical cancer research*, 12(6), 1665-1671. 10.1158/1078-0432.CCR-06-0067

[31] Marques, R. B., Dits, N. F., Erkens-Schulze, S., Van Weerden, W. M., & Jenster, G. (2010). *Bypass mechanisms of the androgen receptor pathway in therapy-resistant prostate cancer cell models. PloS one*, 5(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013500>

- [32] Crowley, F., Sterpi, M., Buckley, C., Margetich, L., Handa, S., & Dovey, Z. (2021). *A review of the pathophysiological mechanisms underlying castration-resistant prostate cancer*. *Research and Reports in Urology*, 13, 457. [10.2147/RRU.S264722](https://doi.org/10.2147/RRU.S264722)
- [33] Huang, Y., Jiang, X., Liang, X., & Jiang, G. (2018). *Molecular and cellular mechanisms of castration resistant prostate cancer*. *Oncology letters*, 15(5), 6063–6076. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8123>
- [34] Scognamiglio, M., Severino, V., D'Abrosca, B., Chambery, A., & Fiorentino, A. (2015). *Structural elucidation of saponins: a combined approach based on high-resolution spectroscopic techniques*. *Studies in natural products chemistry*, 45, 85-120.
- [35] Hostettmann, K. & Marston, A. (1995). *Introduction, Saponins (pp.1-17)*. Cambridge University Press.
- [36] Tantry, M. A., & Khan, I. A. (2013). *Saponins from Glycine max Merrill (soybean)*. *Fitoterapia*, 87, 49-56. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2013.03.021>
- [37] Kregiel, D., Berlowska, J., Witonska, I., Hubert Antolak, H., Proestos, C., Babic, M., & Zhang, L. B. a. (2017). *Saponin-Based, Biological-Active Surfactants from Plants*. In (Ed.), *Application and Characterization of Surfactants*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/68062>
- [38] Bautista-Cruz, A., Arnaud-Vintilde, M. R., Martínez-Gutiérrez, G. A., Sánchez-Medina, P. S., & Pacheco, R. P. (2011). *The traditional medicinal and food uses of four plants in Oaxaca, Mexico*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(15), 3404-3411. <https://doi.org/10.5897/JMPR.9001240>
- [39] Govea-Salas, M., Morlett-Chávez, J., Rodríguez-Herrera, R., & Ascacio-Valdés, J. (2017). *Some Mexican plants used in traditional medicine*. *Aromatic and Medicinal Plants-Back to Nature*, 191-200. <http://dx.doi.org/10.5772/66637>
- [40] Man, S., Gao, W., Zhang, Y., Huang, L., & Liu, C. (2010). *Chemical study and medical application of saponins as anti-cancer agents*. *Fitoterapia*, 81(7), 703-714.
- [41] Fayyad, R. J., Ali, A. N. M., Dwaish, A. S., & Abboodi, A. K. (2019). *Anticancer activity of Spirulina platensis methanolic extracts against L20B and MCF7 human cancer cell lines*. *Plant Arch*, 19(1), 1419-26. [0972-5210](https://doi.org/10.5772/66637)
- [42] Podolak, I., Galanty, A., & Sobolewska, D. (2010). *Saponins as cytotoxic agents: a review*. *Phytochemistry Reviews*, 9(3), 425-474. <https://doi.org/10.1007/s11101-010-9183-z>
- [43] Sung, B., Prasad, S., Gupta, S. C., Patchva, S., & Aggarwal, B. B. (2012). *Regulation of inflammation-mediated chronic diseases by botanicals*. In *Advances in botanical research* (Vol. 62, pp. 57-132). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394591-4.00003-9>

- [44] Al Jasem, Y., Khan, M., Taha, A., & Thiemann, T. (2014). *Preparation of steroidal hormones with an emphasis on transformations of phytosterols and cholesterol-a review. Mediterranean Journal of Chemistry*, 3(2), 796-830.
- [45] Sethi, G., Shanmugam, M. K., Warriar, S., Merarchi, M., Arfuso, F., Kumar, A. P., & Bishayee, A. (2018). *Pro-apoptotic and anti-cancer properties of diosgenin: a comprehensive and critical review. Nutrients*, 10(5), 645. [10.3390/nu10050645](https://doi.org/10.3390/nu10050645)
- [46] Das, S., Dey, K. K., Dey, G., Pal, I., Majumder, A., MaitiChoudhury, S., ... & Mandal, M. (2012). *Antineoplastic and apoptotic potential of traditional medicines thymoquinone and diosgenin in squamous cell carcinoma. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046641*
- [47] Jiang, S., Fan, J., Wang, Q., Ju, D., Feng, M., Li, J., ... & Ye, L. (2016). *Diosgenin induces ROS-dependent autophagy and cytotoxicity via mTOR signaling pathway in chronic myeloid leukemia cells. Phytomedicine*, 23(3), 243-252. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2016.01.010>
- [48] Li, F., Fernandez, P. P., Rajendran, P., Hui, K. M., & Sethi, G. (2010). *Diosgenin, a steroidal saponin, inhibits STAT3 signaling pathway leading to suppression of proliferation and chemosensitization of human hepatocellular carcinoma cells. Cancer letters*, 292(2), 197-207. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2009.12.003>
- [49] Isin, E. M., & Guengerich, F. P. (2007). *Complex reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1770(3), 314-329. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2006.07.003>
- [50] Guengerich, F. P. (2015). *Human Cytochrome P450 Enzymes. Cytochrome P450*, 523–785. doi:10.1007/978-3-319-12108-6_9.
- [51] GeneCards. (s.f). *CYP17A1 Gene - Cytochrome P450 Family 17 Subfamily A Member 1. https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CYP17A1*
- [52] Picado-Leonard, J. A. M. E. S., & MILLER, W. L. (2009). *Cloning and sequence of the human gene for P450c17 (steroid 17 α -hydroxylase/17, 20 lyase): similarity with the gene for P450c21. Dna*, 6(5), 439-448. <https://doi.org/10.1089/dna.1987.6.439>
- [53] Bastian, F. B., Roux, J., Niknejad, A., Comte, A., Fonseca Costa, S. S., De Farias, T. M., ... & Robinson-Rechavi, M. (2021). *The Bgee suite: integrated curated expression atlas and comparative transcriptomics in animals. Nucleic acids research*, 49(D1), D831-D847. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa793>
- [54] Biason-Lauber, A., Kempken, B., Werder, E., Forest, M. G., Einaudi, S., Ranke, M. B., ... & Zachmann, M. (2000). *17 α -hydroxylase/17, 20-lyase deficiency as a model to study enzymatic activity*

regulation: role of phosphorylation. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 85(3), 1226-1231. <https://doi.org/10.1210/jcem.85.3.6475>

[55] Sherbet, D. P., Tiosano, D., Kwist, K. M., Hochberg, Z., & Auchus, R. J. (2003). *CYP17 mutation E305G causes isolated 17, 20-lyase deficiency by selectively altering substrate binding. Journal of Biological Chemistry*, 278(49), 48563-48569. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307586200>.

[56] Gregory, M. C., Mak, P. J., Khatri, Y., Kincaid, J. R., & Sligar, S. G. (2018). Human P450 CYP17A1: control of substrate preference by asparagine 202. *Biochemistry*, 57(5), 764-771. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b01067>

[57] Geller, D. H., Auchus, R. J., & Miller, W. L. (1999). *P450c17 mutations R347H and R358Q selectively disrupt 17, 20-lyase activity by disrupting interactions with P450 oxidoreductase and cytochrome b5. Molecular endocrinology*, 13(1), 167-175. <https://doi.org/10.1210/mend.13.1.0219>

[58] Van Den Akker, E. L., Koper, J. W., Boehmer, A. L., Themmen, A. P., Verhoef-Post, M., Timmerman, M. A., ... & De Jong, F. H. (2002). *Differential inhibition of 17 α -hydroxylase and 17, 20-lyase activities by three novel missense CYP17 mutations identified in patients with P450c17 deficiency. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 87(12), 5714-5721. <https://doi.org/10.1210/jc.2001-011880>

[59] Petrunak, E. M., DeVore, N. M., Porubsky, P. R., & Scott, E. E. (2014). *Structures of human steroidogenic cytochrome P450 17A1 with substrates. Journal of Biological Chemistry*, 289(47), 32952-32964. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.610998>

[60] Miller, W. L., & Auchus, R. J. (2011). *The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. Endocrine reviews*, 32(1), 81-151. <https://doi.org/10.1210/er.2010-0013>

[61] Porubek, D. (2013). *CYP17A1: a biochemistry, chemistry, and clinical review. Current topics in medicinal chemistry*, 13(12), 1364-1384. [10.2174/1568026611313120002](https://doi.org/10.2174/1568026611313120002)

[62] Martinez-Arguelles, D. B. & Papadopoulos, V. (2019). *Adrenal Steroidogenesis, Encyclopedia of Endocrine Diseases*, 2, 56-63. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.66177-9>

[63] Estrada, D. F., Laurence, J. S., & Scott, E. E. (2013). *Substrate-modulated cytochrome P450 17A1 and cytochrome b5 interactions revealed by NMR. Journal of Biological Chemistry*, 288(23), 17008-17018. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.468926>

[64] Harris, W. P., Mostaghel, E. A., Nelson, P. S., & Montgomery, B. (2009). *Androgen deprivation therapy: progress in understanding mechanisms of resistance and optimizing androgen depletion. Nature clinical practice Urology*, 6(2), 76-85. <https://doi.org/10.1038/ncpuro1296>

- [65] Feng, Q., & He, B. (2019). *Androgen receptor signaling in the development of castration-resistant prostate cancer*. *Frontiers in oncology*, 858. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00858>
- [66] Durán, F. R., Denes, J. M., Cid, A. H. S., Abreu, G. E. A., Aguilar, E. J., Ávila, G. A. C., ... & Hernández, M. E. (2011). *El receptor a andrógenos en la fisiopatología prostática*. *eNeurobiología*, 2(4), 1-15.
- [67] Gregory, C. W., Johnson, R. T., Mohler, J. L., French, F. S., & Wilson, E. M. (2001). *Androgen receptor stabilization in recurrent prostate cancer is associated with hypersensitivity to low androgen*. *Cancer research*, 61(7), 2892-2898.
- [68] Sivonova, M. K., Jurecekova, J., Tatarkova, Z., Kaplan, P., Lichardusova, L., & Hatok, J. (2017). The role of CYP17A1 in prostate cancer development: structure, function, mechanism of action, genetic variations and its inhibition. *Gen Physiol Biophys*, 36(5), 487-499. doi: 10.4149/gpb_2017024
- [69] Vasaitis, T. S., Bruno, R. D., & Njar, V. C. (2011). *CYP17 inhibitors for prostate cancer therapy*. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 125(1-2), 23-31. [ps://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2010.11.005](https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2010.11.005)
- [70] Yadav, R., Petrunak, E. M., Estrada, D. F., & Scott, E. E. (2017). *Structural insights into the function of steroidogenic cytochrome P450 17A1*. *Molecular and cellular endocrinology*, 441, 68-75. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.08.035>
- [71] Logothetis, C. J., Efstathiou, E., Manuguid, F., & Kirkpatrick, P. (2011). *Abiraterone acetate*. *Nature reviews. Drug discovery*, 10(8), 573–574. <https://doi.org/10.1038/nrd3516>
- [72] Antonarakis, E. S., Lu, C., Wang, H., Luber, B., Nakazawa, M., Roeser, J. C., ... & Luo, J. (2014). *AR-V7 and resistance to enzalutamide and abiraterone in prostate cancer*. *New England Journal of Medicine*, 371(11), 1028-1038. 10.1056/NEJMoa1315815
- [73] Gomez, L., Kovac, J. R., & Lamb, D. J. (2015). *CYP17A1 inhibitors in castration-resistant prostate cancer*. *Steroids*, 95, 80-87. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2014.12.021>
- [74] Udhane, S. S., Dick, B., Hu, Q., Hartmann, R. W., & Pandey, A. V. (2016). *Specificity of anti-prostate cancer CYP17A1 inhibitors on androgen biosynthesis*. *Biochemical and biophysical research communications*, 477(4), 1005-1010.
- [75] Biotech Janssen. (Septiembre de 2012). *ZYTIGA (abiraterone acetate) tablets*. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2012/202379s004lbl.pdf
- [76] CHHABRA, H., & THANGAM, K. (2013). *COMPUTER ASSISTED FRAGMENT BASED ANALYSIS OF PREGNENOLONE ANALOGUES AGAINST CYP17A1 RECEPTOR: A DOCKING APPROACH*. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 6(2), 118-122.

- [77] Al-Masoudi, N. A., Ali, D. S., Saeed, B., Hartmann, R. W., Engel, M., Rashid, S., & Saeed, A. (2014). *New CYP17 hydroxylase inhibitors: synthesis, biological evaluation, QSAR, and molecular docking study of new pregnenolone analogs*. *Archiv der Pharmazie*, 347(12), 896-907. <https://doi.org/10.1002/ardp.201400255>
- [78] Ahmad, S., Khan, M. F., Parvez, S., Akhtar, M., & Raisuddin, S. (2017). *Molecular docking reveals the potential of phthalate esters to inhibit the enzymes of the glucocorticoid biosynthesis pathway*. *Journal of Applied Toxicology*, 37(3), 265-277.
- [79] Ai, C. Z., Man, H. Z., Saeed, Y., Chen, D. C., Wang, L. H., & Jiang, Y. Z. (2019). *Computational insight into crucial binding features for metabolic specificity of cytochrome P450 17A1*. *Informatics in Medicine Unlocked*, 15, 100172.
- [80] Chou, F. P., Hsu, W. C., Huang, S. C., Chang, C. Y., Chiou, Y. S., Tsai, C. T., ... & Wu, T. K. (2020). *Pregnenolonyl- α -glucoside exhibits marked anti-cancer and CYP17A1 enzymatic inhibitory activities*. *Chemical Communications*, 56(11), 1733-1736. <https://doi.org/10.1039/C9CC09415F>
- [81] Gelmann, E. P. (2002). *Molecular biology of the androgen receptor*. *Journal of Clinical Oncology*, 20(13), 3001-3015. 10.1200/JCO.2002.10.018
- [82] Karlsson, M., Zhang, C., Méar, L., Zhong, W., Digre, A., Katona, B., ... & Lindskog, C. (2021). *A single-cell type transcriptomics map of human tissues*. *Science Advances*, 7(31), eabh2169. DOI: 10.1126/sciadv.abh2169
- [83] Cantin, L., Faucher, F., Couture, J. F., de Jésus-Tran, K. P., Legrand, P., Ciobanu, L. C., ... & Breton, R. (2007). *Structural characterization of the human androgen receptor ligand-binding domain complexed with EM5744, a rationally designed steroidal ligand bearing a bulky chain directed toward helix 12*. *Journal of biological chemistry*, 282(42), 30910-30919. <https://doi.org/10.1074/jbc.M705524200>
- [84] Rathkopf, D., & Scher, H. I. (2013). *Androgen receptor antagonists in castration-resistant prostate cancer*. *Cancer journal (Sudbury, Mass.)*, 19(1), 43-49. <https://doi.org/10.1097/PPO.0b013e318282635a>
- [85] Singh, A.N., Baruah, M.M. & Sharma, N. Structure Based docking studies towards exploring potential anti-androgen activity of selected phytochemicals against Prostate Cancer. *Sci Rep* 7, 1955 (2017). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02023-5>
- [86] Zhou, W., Duan, M., Fu, W., Pang, J., Tang, Q., Sun, H., ... & Hou, T. (2018). *Discovery of novel androgen receptor ligands by structure-based virtual screening and bioassays*. *Genomics, proteomics & bioinformatics*, 16(6), 416-427.

- [87] Galli, C. L., Sensi, C., Fumagalli, A., Parravicini, C., Marinovich, M., & Eberini, I. (2014). A computational approach to evaluate the androgenic affinity of iprodione, procymidone, vinclozolin and their metabolites. *PloS one*, 9(8), e104822.
- [88] International Agency for Research on Cancer. (2020). *Mexico*. World Health Organization. <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/484-mexico-fact-sheets.pdf>
- [89] Pereira, F., & Aires-de-Sousa, J. (2018). Computational Methodologies in the Exploration of Marine Natural Product Leads. *Marine drugs*, 16(7), 236. <https://doi.org/10.3390/md16070236>
- [90] Gabriel, C., & Fernando, C. (2003). *Introducción a la química computacional*. México: FONDO DE CULTURA ECONÓMICA.
- [91] Levine, I. N. (2001). *Química cuántica*. Pearson educación.
- [92] Cruz-Garriz, D., & GARRITZ, A. (1991). *Un Enfoque Químico*. Addison-Wesley Iberoamericana: USA.
- [93] Madhavalatha, K. N., & Babu, G. R. M. (2019, May). *Systematic approach for enrichment of docking outcome using consensus scoring functions*. In *Journal of Physics: Conference Series* (Vol. 1228, No. 1, p. 012019). IOP Publishing.
- [94] Pagadala, N. S., Syed, K., & Tuszynski, J. (2017). *Software for molecular docking: a review*. *Biophysical reviews*, 9(2), 91-102.
- [95] Halperin, I., Ma, B., Wolfson, H., & Nussinov, R. (2002). *Principles of docking: An overview of search algorithms and a guide to scoring functions*. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 47(4), 409-443.
- [96] Kadukova, M., & Grudin, S. (2017). *Convex-PL: a novel knowledge-based potential for protein-ligand interactions deduced from structural databases using convex optimization*. *Journal of computer-aided molecular design*, 31(10), 943-958.
- [97] Guedes, I. A., Pereira, F. S., & Dardenne, L. E. (2018). *Empirical scoring functions for structure-based virtual screening: applications, critical aspects, and challenges*. *Frontiers in pharmacology*, 1089.
- [98] Xue, M., Zheng, M., Xiong, B., Li, Y., Jiang, H., & Shen, J. (2010). *Knowledge-based scoring functions in drug design. 1. Developing a target-specific method for kinase– ligand interactions*. *Journal of chemical information and modeling*, 50(8), 1378-1386.
- [99] Ain, Q. U., Aleksandrova, A., Roessler, F. D., & Ballester, P. J. (2015). *Machine-learning scoring functions to improve structure-based binding affinity prediction and virtual screening*. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, 5(6), 405-424.
- [100] Lyne, P. D. (2002). *Structure-based virtual screening: an overview*. *Drug discovery today*, 7(20), 1047-1055.

- [101] Tripathi, A., & Bankaitis, V. A. (2017). Molecular docking: From lock and key to combination lock. *Journal of molecular medicine and clinical applications*, 2(1).
- [102] Rosenfeld, R., Vajda, S., & DeLisi, C. (1995). *Flexible docking and design*. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, 24(1), 677-700.
- [103] Yan, C., & Zou, X. (2017). Modeling Protein Flexibility in Molecular Docking.
- [104] Shamsara, J. (2016). *CrossDocker: a tool for performing cross-docking using Autodock Vina*. *SpringerPlus*, 5(1), 1-5.
- [105] Sherman, W., Beard, H. S., & Farid, R. (2006). *Use of an induced fit receptor structure in virtual screening*. *Chemical biology & drug design*, 67(1), 83-84.
- [106] Blast, N. C. B. I. (2015). Basic local alignment search tool. *Natl. Libr. Med. Natl. Cent. Biotechnol. Inf*, 43(D1), D6-D17.
- [107] Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). *Basic local alignment search tool*. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410. doi:10.1016/s0022-2836(05)80360-2
- [108] Krissinel, E., & Henrick, K. (2004). *Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions*. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 60(12), 2256-2268.
- [109] Bochevarov, A. D., Harder, E., Hughes, T. F., Greenwood, J. R., Braden, D. A., Philipp, D. M., ... & Friesner, R. A. (2013). *Jaguar: A high-performance quantum chemistry software program with strengths in life and materials sciences*. *International Journal of Quantum Chemistry*, 113(18), 2110-2142.
- [110] Gaussian 09, Revision D.01, Frisch, M.J., Trucks, G.W., Schlegel, H.B., Scuseria, G.E., Robb, M.A., Cheeseman, J.R., Scalmani, G., Barone, V., Petersson, G.A., Nakatsuji, H., Li, X., Caricato, M., Marenich, A.V., Bloino, J., Janesko, B.G., Gomperts, R., Mennucci, B., Hratchian, H.P., Ortiz, J.V., Izmaylov, A.F., Sonnenberg, J.L., Williams-Young, D., Ding, F., Lipparini, F., Egidi, F., Goings, J., Peng, B., Petrone, A., Henderson, T., Ranasinghe, D., Zakrzewski, V.G., Gao, J., Rega, N., Zheng, G., Liang, W., Hada, M., Ehara, M., Toyota, K., Fukuda, R., Hasegawa, J., Ishida, M., Nakajima, T., Honda, Y., Kitao, O., Nakai, H., Vreven, T., Throssell, K., Montgomery, J.A. Jr, Peralta, J.E., Ogliaro, F., Bearpark, M.J., Heyd, J.J., Brothers, E.N., Kudin, K.N., Staroverov, V.N., Keith, T.A., Kobayashi, R., Normand, J., Raghavachari, K., Rendell, A. P., Burant, J.C., Iyengar, S.S., Tomasi, J., Cossi, M., Millam, J.M., Klene, M., Adamo, C., Cammi, R., Ochterski, J.W., Martin, R.L., Morokuma, K., Farkas, O., Foresman, J.B., Fox, D.J. (2009) Gaussian, Inc., Wallingford CT
- [111] Trott, O., & Olson, A. J. (2010). *AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading*. *Journal of computational chemistry*, 31(2), 455-461.

- [112] Halgren, T. A., Murphy, R. B., Friesner, R. A., Beard, H. S., Frye, L. L., Pollard, W. T., & Banks, J. L. (2004). *Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring*. 2. Enrichment factors in database screening. *Journal of medicinal chemistry*, 47(7), 1750-1759.
- [113] Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S. & Olson, A. J. (2009) *AutoDock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility*. *J. Computational Chemistry* 2009, 16: 2785-91.
- [114] Trott, O., & Olson, A. J. (2018). *Vina Video Tutorial*. Autodock Vina. <https://vina.scripps.edu/tutorial/>
- [115] Bayly, C. I., Cieplak, P., Cornell, W., & Kollman, P. A. (1993). *A well-behaved electrostatic potential based method using charge restraints for deriving atomic charges: the RESP model*. *The Journal of Physical Chemistry*, 97(40), 10269-10280.
- [116] Wang, J. (2017). *On contribution of known atomic partial charges of protein backbone in electrostatic potential density maps*. *Protein Science*, 26(6), 1098-1104.
- [117] Zhao, B., Lei, L., Kagawa, N., Sundaramoorthy, M., Banerjee, S., Nagy, L. D., Guengerich, F. P., & Waterman, M. R. (2012). *Three-dimensional structure of steroid 21-hydroxylase (cytochrome P450 21A2) with two substrates reveals locations of disease-associated variants*. *The Journal of biological chemistry*, 287(13), 10613–10622. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.323501>
- [118] Dassault Systèmes BIOVIA, Discovery Studio Modeling Environment, Release 2017, San Diego: Dassault Systèmes, 2016
- [119] Gasteiger, J., & Marsili, M. (1978). *A new model for calculating atomic charges in molecules*. *Tetrahedron letters*, 19(34), 3181-3184.
- [120] Duggal, R., Denisov, I. G., & Sligar, S. G. (2018). *Cytochrome b 5 enhances androgen synthesis by rapidly reducing the CYP17A1 oxy-complex in the lyase step*. *FEBS Letters*, 592(13), 2282–2288. doi:10.1002/1873-3468.13153
- [121] McGinnis, S., & Madden, T. L. (2004). *BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools*. *Nucleic Acids Research*, 32(Web Server), W20–W25. doi:10.1093/nar/gkh435
- [122] E. Krissinel and K. Henrick (2004). *Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions*. *Acta Cryst. D* **60**, 2256---2268
- [123] Fehl, C., Vogt, C. D., Yadav, R., Li, K., Scott, E. E., & Aubé, J. (2018). *Structure-based design of inhibitors with improved selectivity for steroidogenic cytochrome P450 17A1 over cytochrome P450 21A2*. *Journal of medicinal chemistry*, 61(11), 4946-4960.

- [124] Kufareva, I., & Abagyan, R. (2011). *Methods of protein structure comparison. In Homology modeling* (pp. 231-257). Humana Press.
- [125] Hernández-Rodríguez, M., Correa-Basurto, J., Gutiérrez, A., Vitorica, J., & Rosales-Hernández, M. C. (2016). *Asp32 and Asp228 determine the selective inhibition of BACE1 as shown by docking and molecular dynamics simulations. European journal of medicinal chemistry, 124*, 1142-1154.
- [126] Bonomo, S., Hansen, C. H., Petrunak, E. M., Scott, E. E., Styrisshave, B., Jørgensen, F. S., & Olsen, L. (2016). *Promising tools in prostate cancer research: selective non-steroidal cytochrome P450 17A1 inhibitors. Scientific reports, 6(1)*, 1-11.
- [127] Xiao, F., Yang, M., Xu, Y., & Vongsangnak, W. (2015). *Comparisons of prostate cancer inhibitors abiraterone and TOK-001 binding with CYP17A1 through molecular dynamics. Computational and structural biotechnology journal, 13*, 520-527.
- [128] Bonomo, S., Hansen, C. H., Petrunak, E. M., Scott, E. E., Styrisshave, B., Jørgensen, F. S., & Olsen, L. (2016). *Promising tools in prostate cancer research: selective non-steroidal cytochrome P450 17A1 inhibitors. Scientific reports, 6(1)*, 1-11.
- [129] Castro-Alvarez, A., Costa, A. M., & Vilarrasa, J. (2017). *The performance of several docking programs at reproducing protein–macrolide-like crystal structures. Molecules, 22(1)*, 136.
- [130] Boittier, E. D., Tang, Y. Y., Buckley, M. E., Schuurs, Z. P., Richard, D. J., & Gandhi, N. S. (2020). *Assessing molecular docking tools to guide targeted drug discovery of CD38 inhibitors. International journal of molecular sciences, 21(15)*, 5183.
- [131] Boittier, E. D., Tang, Y. Y., Buckley, M. E., Schuurs, Z. P., Richard, D. J., & Gandhi, N. S. (2020). *Assessing molecular docking tools to guide targeted drug discovery of CD38 inhibitors. International journal of molecular sciences, 21(15)*, 5183.
- [132] Lokwani, D. K., Sarkate, A. P., Karnik, K. S., Nikalje, A. P. G., & Seijas, J. A. (2020). *Structure-based site of metabolism (SOM) prediction of ligand for CYP3A4 enzyme: comparison of Glide XP and Induced Fit Docking (IFD). Molecules, 25(7)*, 1622.
- [133] Zhao, B., Lei, L., Kagawa, N., Sundaramoorthy, M., Banerjee, S., Nagy, L. D., Guengerich, F. P., & Waterman, M. R. (2012). *Three-dimensional structure of steroid 21-hydroxylase (cytochrome P450 21A2) with two substrates reveals locations of disease-associated variants. The Journal of biological chemistry, 287(13)*, 10613–10622. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.323501>

- [134] Malikova, J., Zingg, T., Fingerhut, R., Sluka, S., Grössl, M., Brixius-Anderko, S., ... & Flück, C. E. (2019). *HIV drug efavirenz inhibits CYP21A2 activity with possible clinical implications. Hormone research in paediatrics*, 91(4), 262-270.
- [135] Pia, A., Vignani, F., Attard, G., Tucci, M., Bironzo, P., Scagliotti, G., Arlt, W., Terzolo, M., & Berruti, A. (2013). *Strategies for managing ACTH dependent mineralocorticoid excess induced by abiraterone. Cancer treatment reviews*, 39(8), 966–973. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2013.03.00>
- [136] Wahl, J., & Smieško, M. (2018). *Endocrine Disruption at the Androgen Receptor: Employing Molecular Dynamics and Docking for Improved Virtual Screening and Toxicity Prediction. International journal of molecular sciences*, 19(6), 1784. <https://doi.org/10.3390/ijms19061784>
- [137] Tan, M. H., Li, J., Xu, H. E., Melcher, K., & Yong, E. L. (2015). *Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery. Acta Pharmacologica Sinica*, 36(1), 3-23.

Apendice A

Abreviaturas

ADT Terapia de Privación de Andrógenos

CPa Cáncer de Próstata

CPRC Cáncer de Próstata Resistente a la Castración

Cytb5 Citocromo b5

DFT Teoría del Funcional de la Densidad

DHEA Dehidroepiandrosterona

DHT Dihidrotestosterona

DZ Base Doble Zeta

DZV Base de Valencia Dividida

IDF Acoplamiento Molecular de Ajuste Inducido

LHRH Hormona Liberadora de la Hormona Leutilizante

PSA Antígeno Prostático Específico

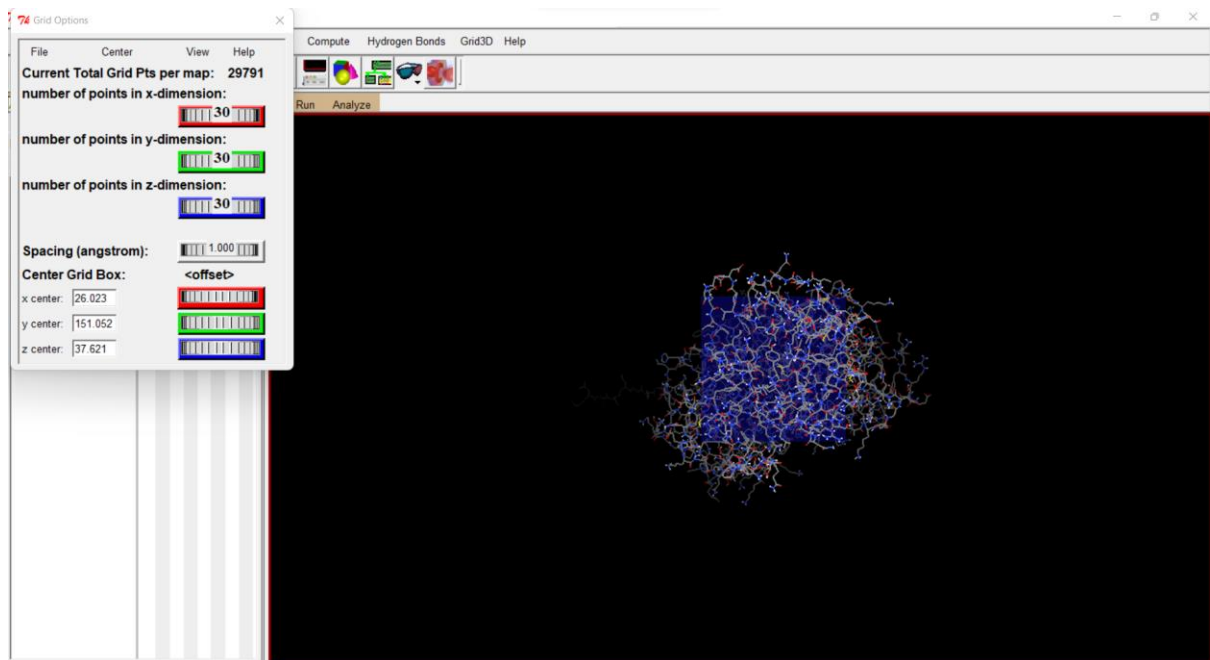
POR Citocromo P40 Reductasa

RA Receptor de Andrógenos

Apendice B

Localización de las cajas *grid* en Autodock Tools

Acoplamiento molecular en el sitio activo de la CYP17A1



$center_x = 26.023$

$center_y = 151.052$

$center_z = 37.621$

$Spacing = 1.0$

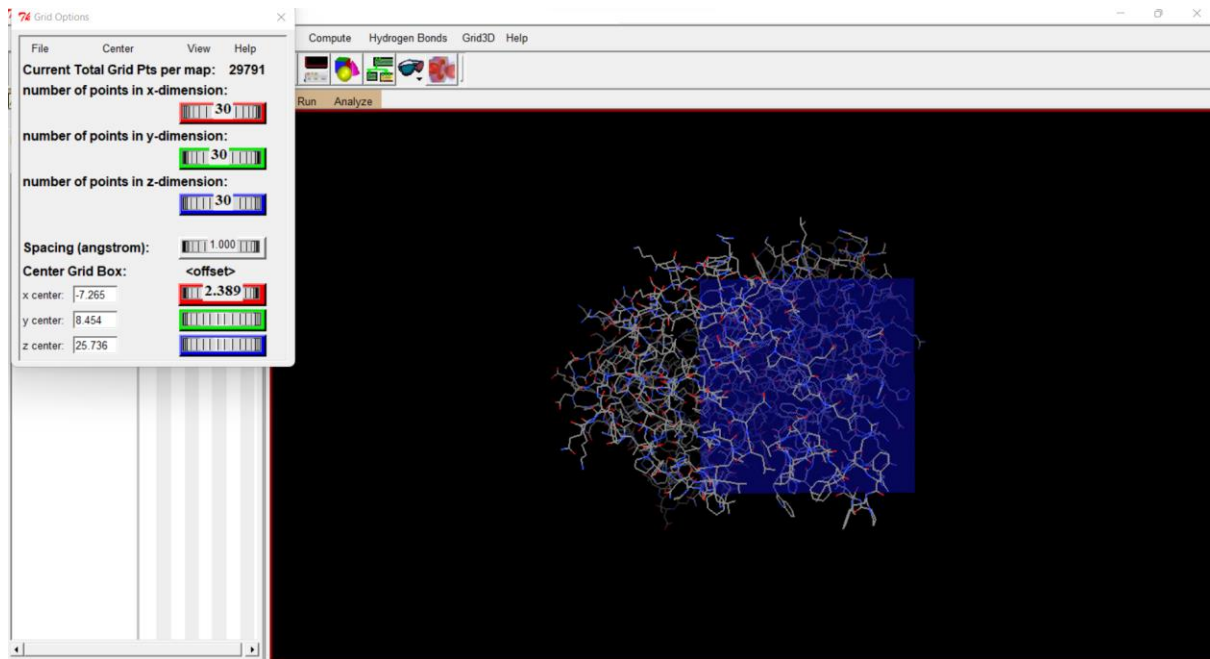
$size_x = 30$

$size_y = 30$

$size_z = 30$

$exhaustiveness = 8$

Acoplamiento molecular en el sitio activo de la CYP21A2



$center_x = -7.265$

$center_y = 8.454$

$center_z = 25.756$

$Spacing = 1.0$

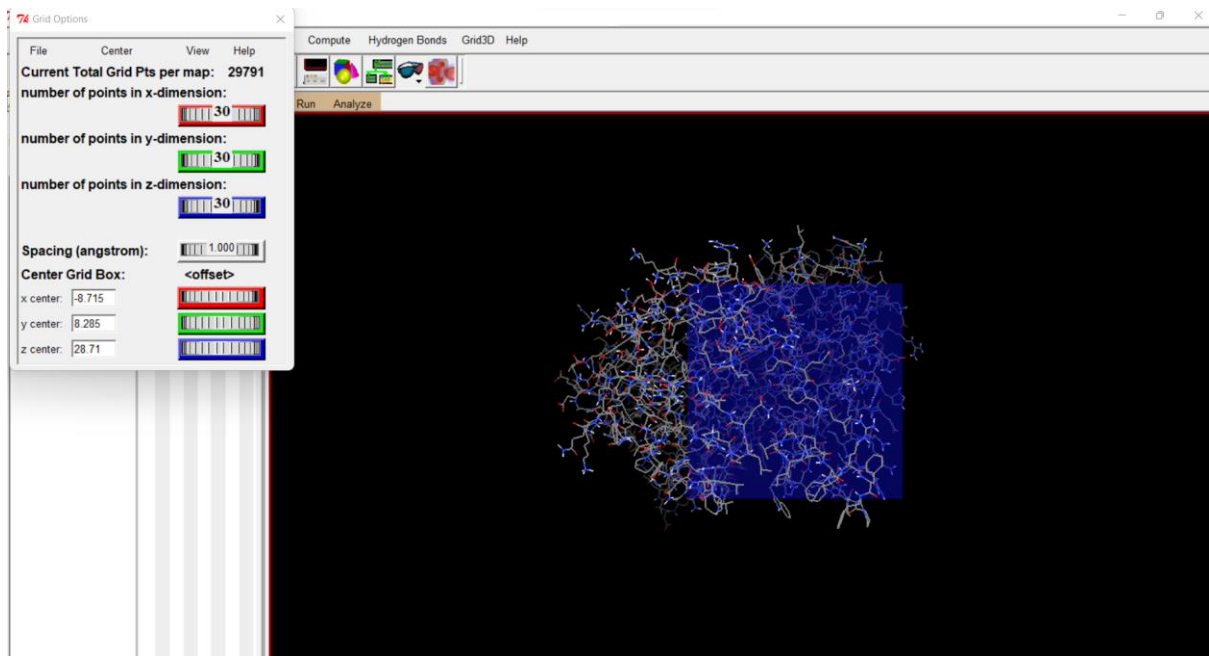
$size_x = 30$

$size_y = 30$

$size_z = 30$

$exhaustiveness = 8$

Acoplamiento molecular en el LBD del Receptor de Andr6genos



$center_x = -8.715$

$center_y = 8.285$

$center_z = 28.71$

$Spacing = 1.0$

$size_x = 20$

$size_y = 20$

$size_z = 20$

$exhaustiveness = 8$

Apendice C

Formatos FASTA de las enzimas CYP's estudiadas

>CYP17A1|6CHI

MAKKTGAKYPKSLLSLPLVGSLPFLPRHGHMHNFFKLQKKYGPIYSVRMGTKTTVI
VGHHQLAKEVLIKKGKDFSGRPQMATLDIASNNRKGIAFADSGAHWQLHRRLAMAT
FALFKDGDQKLEKIICQEISTLCDMLATHNGQSIDISFPVFVAVTNVISLICFNTSYKN
GDPELNVIQNYNEGIIDNLSKDSLVDLVPWLKIFPNKTLEKLSHVKIRNDLLNKILEN
YKEKFRSDSITNMLDTLMQAKMNSDNGNAGPDQDSELLSDNHILTTIGDIFGAGVET
TTSVVKWTLAFLHNPQVKKLYEEIDQNVGFSRTPTISDRNRLLLLLEATIREVLRRLR
PVAPMLIPHKANVDSSIGEFVAVDKGTEVIINLWALHHNEKEWHQPDQFMPERFLNP
AGTQLISPSVSYLPFGAGPRSCIGEILARQELFLIMAWLLQRFDLEVPDDGQLPSLE
GIPKVVFLIDSFVKIKVRQAWREAQAEGSTHHHH

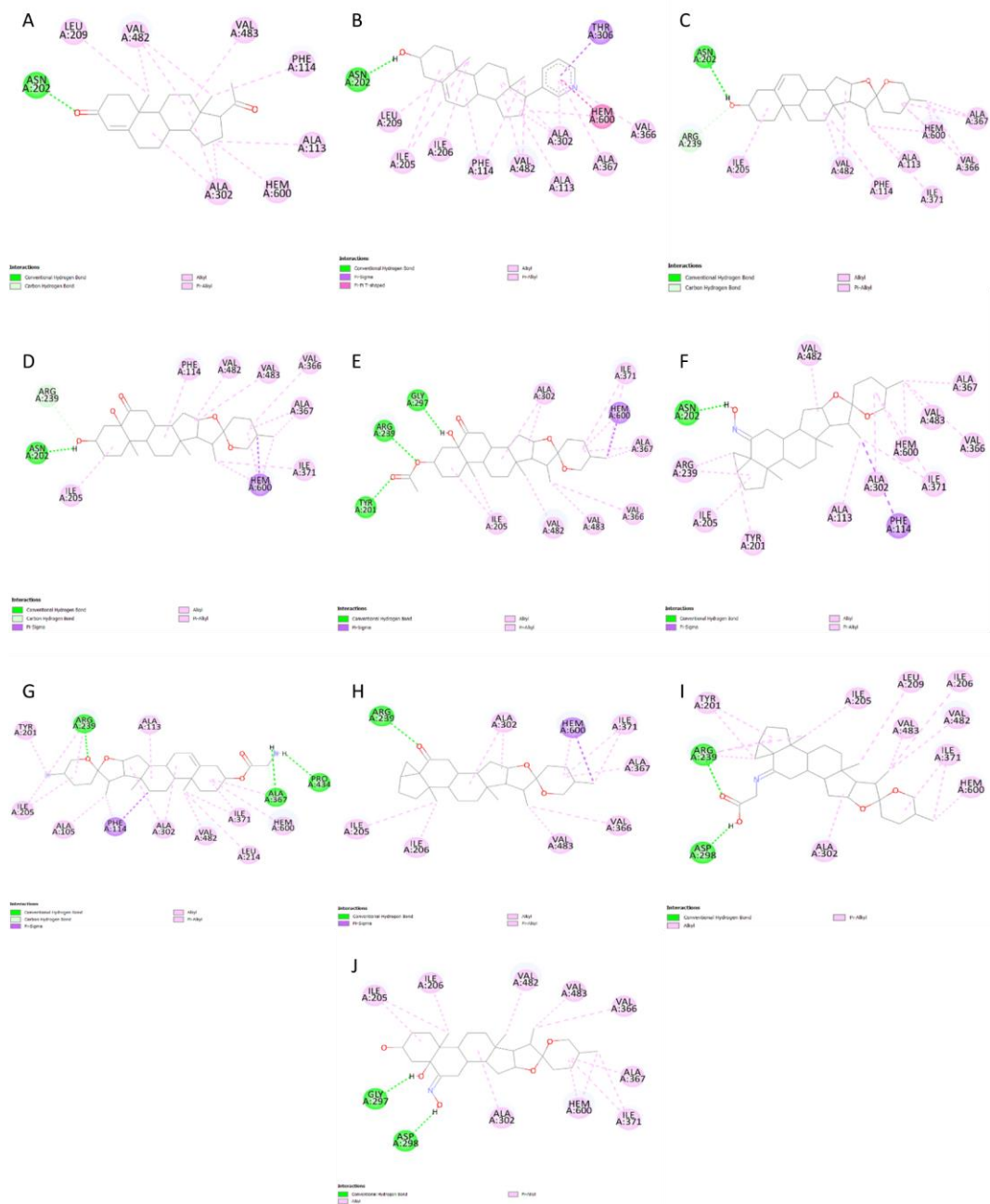
>CYP21A2|4Y8W

MAKKTSSKGKLPPLAPGFLHLLQPDLPIYLLGLTQKFGPIYRLHLGLQDVVVLNSKR
TIEEAMVKKWADFAGRPEPLTYKLVSRNYPDLSLGDYSLLWKAHKKLTRSALLLGIR
DSMEPVVEQLTQEFCEMRAQPGTPVAIEEEFSLTCSIICYLTFGDKIKDDNLMPA
YYKCIQEVLKTWSHWSIQIVDVIPFLRFFPNPGLRRLKQAIEKRDHIVEMQLRQHKES
LVAGQWRDMMDYMLQGVAQPSMEEGSGQLLEGHVHMAAVDLLIGGTETTANTLS
WAVVFLHHPHPEIQRLQEELDHELPGGASSSRVPYKDRARLPLLNATIAEVLRLRPV
VPLALPHRTTRPSSISGYDIPEGTVIIPNLQGAHLDETVERPHEFWPDRFLEPGKN
SRALAFGCGARVCLGEPLARLELFVVLTRLLQAFTLLPSGDALPSLQPLPHCSVILK
MQPFQVRLQPRGMGAHSPGQSQHSHHHHH

Apendice D

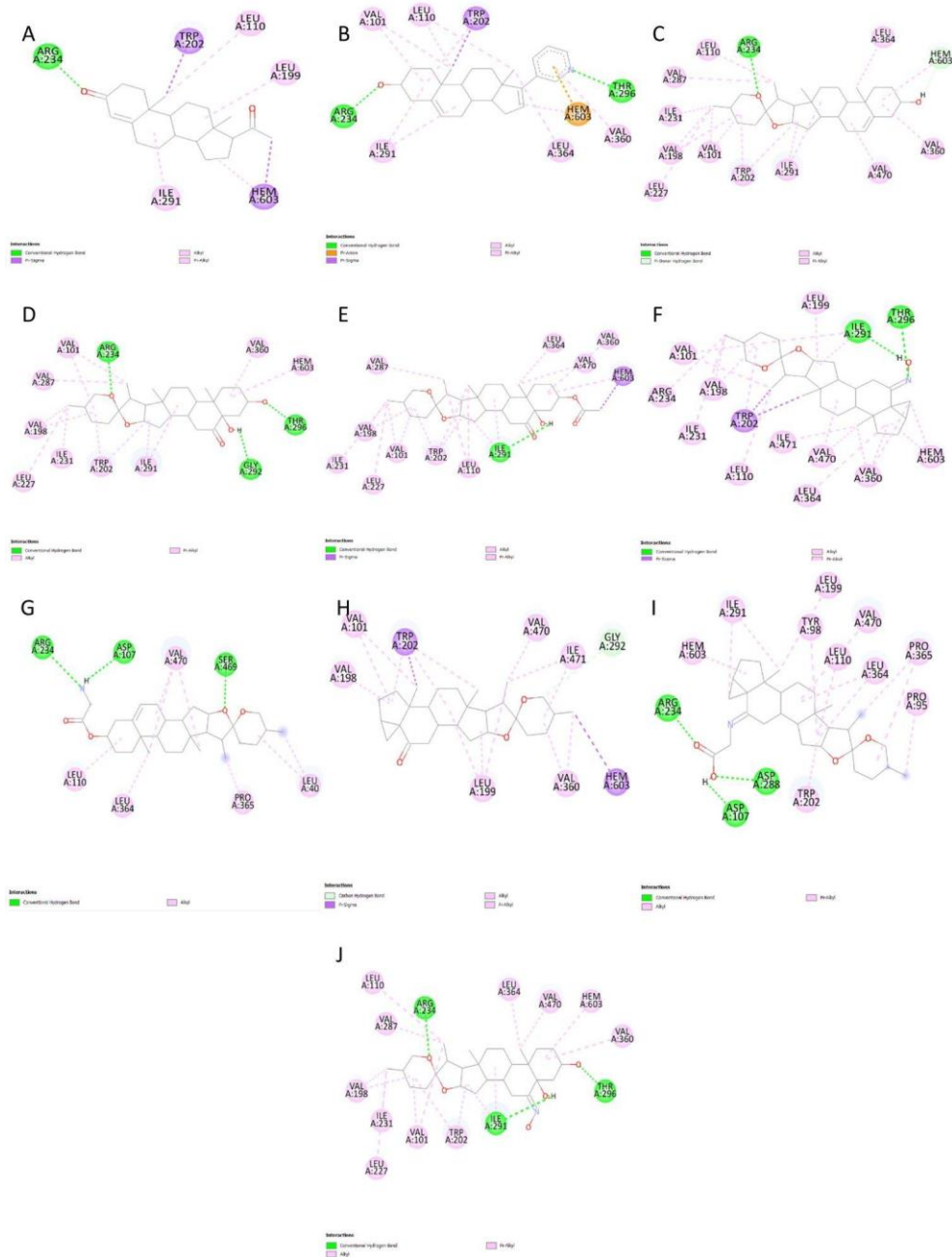
Diagramas 2D de los resultados del acoplamiento molecular en Vina de la CYP17A1

Diagramas 2D de los resultados del IDF de la CYP17A1



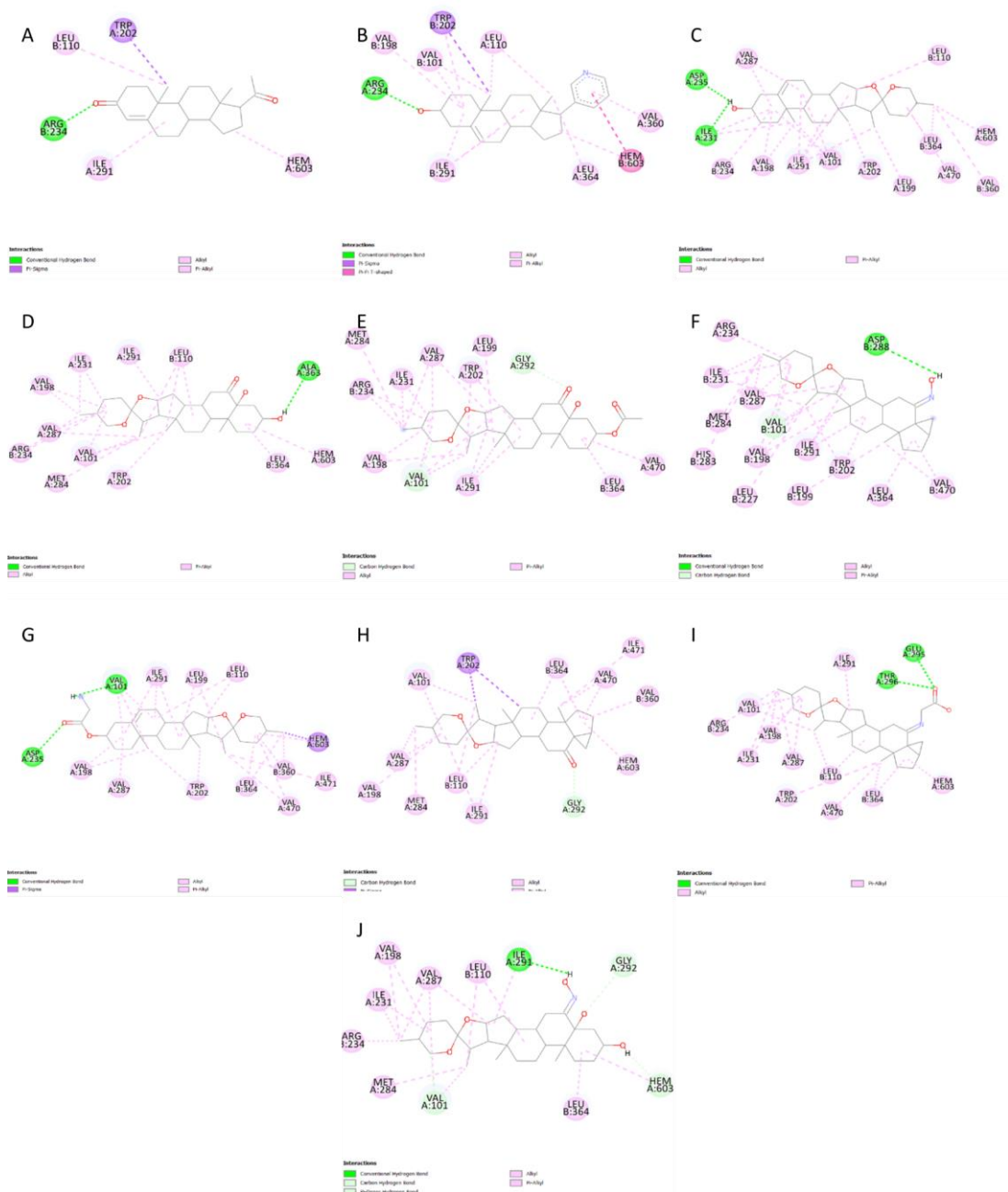
A: Progesterona. B: Abiraterona. C: Diosgenina. D: 5aOHLaxo. E: Acetato5aOHLaxo. F: Oxima-i-esteroide. G: Glidiosgenina. H: I-esteroide. I: Glyi-esteroide. J: Oxima5aOHLaxo

Diagramas 2D de los resultados del acoplamiento molecular en Vina de la CYP21A2



A: Progesterona. B: Abiraterona. C: Diosgenina. D: 5aOHLaxo. E: Acetato5aOHLaxo. F: Oxima-i-esteroide. G: Glidiosgenina. H: I-esteroide. I: Glyi-esteroide. J: Oxima5aOHLaxo

Diagramas 2D de los resultados del IDF de en la CYP21A2



A: Progesterona. B: Abiraterona. C: Diosgenina. D: 5aOHLaxo. E: Acetato5aOHLaxo. F: Oxima-i-esteroide. G: Glidiosgenina. H: I-esteroide. I: Glyi-esteroide. J: Oxima5aOHLaxo

