



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

LICENCIATURA EN BIOTECNOLOGÍA

“ANÁLISIS *IN SILICO* DEL EFECTO DE HETEROESTEROIDES EN
LAS VIAS DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADAS EN LA
REGULACIÓN MUSCULAR”

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE:

LICENCIADA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

ANDREA PAOLA URIBE GUAJARDO

DIRECTORA DE TESIS:

D.C.Q. MAURA CÁRDENAS GARCIA

ASESOR DE TESIS:

D.C. SYLVAIN JEAN BERNÈS FLOURIOT

Abril 2024

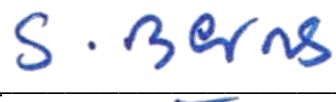


DIRECTORA DE TESIS



D.C. Maura Cárdenas García

ASESOR DE TESIS

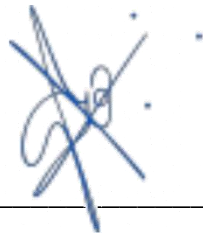


D.C. Sylvain Jean Bernès Flouriot

REVISORES DE TESIS



D.C. MARIA GUADALUPE HERNANDEZ LINARES



D.C. GABRIEL GUERRERO LUNA

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mi directora de tesis, la D.C. Maura Cárdenas García y a mi asesor el D.C. Sylvain Jean Bernès Flouriot, por su tiempo, asesoría, enseñanzas y colaboración durante todo el proceso de investigación. También agradezco a la D. C. María Guadalupe Hernández Linares por siempre estar presente cuando se presentaba algún inconveniente, por su paciencia y apoyo, ya que, sin su conocimiento y experiencia, este proyecto no hubiera sido posible.

A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y la Facultad de Ciencias Biológicas, incluyendo a todo el cuerpo administrativo y docente que brinda siempre el soporte e impulso necesario para que cada estudiante mejore y aprenda de sus errores.

A todos los integrantes del Laboratorio de Fisiología Celular de la BUAP en la Facultad de Medicina, en especial a Alex Y Nadia que siempre fueron un apoyo para mejorar y que durante los seminarios siempre aportaban ideas y puntos de vista únicos.

Agradezco al apoyo que me otorgó el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través de su beca con número de apoyo 1255307, y al proyecto CONACYT 171508.

DEDICATORIA.

A mi madre Christian, mi padre Gonzalo, y a toda mi familia que siempre tiene palabras de aliento para mí.

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: El tejido más abundante en el cuerpo humano es el músculo esquelético estriado, cuya regulación se lleva a cabo principalmente mediante dos vías de señalización interconectadas. Estas vías, controladas por el Factor de Crecimiento Similar a la Insulina 1 (IGF-1) y la miostatina, desempeñan roles fundamentales en el crecimiento y la homeostasis muscular. Mientras que la vía del IGF-1 impulsa el crecimiento y la hipertrofia muscular, la miostatina regula la degradación proteica y la atrofia muscular. Ante los problemas de salud asociados con la atrofia muscular, se busca activamente nuevas alternativas para la prevención y tratamiento, explorando el uso de heteroesteroides como mediadores en estas vías.

OBJETIVO: El propósito de este estudio es determinar, mediante acoplamiento molecular, si los heteroesteroides pueden efectivamente unirse a las proteínas clave en las vías de señalización implicadas en el crecimiento del músculo esquelético, regulando así su desarrollo.

MATERIALES Y MÉTODOS: Se llevó a cabo una revisión bibliográfica para identificar proteínas potenciales como dianas, seguido por la creación de modelos tridimensionales de heteroesteroides utilizando códigos SMILES. Posteriormente, se realizó el acoplamiento molecular entre las proteínas diana y los heteroesteroides utilizando el software GOLD desarrollado por el CCDC. Los resultados se analizaron mediante el software Discovery Studio, evaluando las interacciones presentadas. Se realizó una verificación adicional de los mejores resultados utilizando claves adicionales para las proteínas diana.

RESULTADOS: El análisis de más de 160 resultados de acoplamiento molecular reveló que el heteroesteroide con la clave D8 mostraba las mejores interacciones con las proteínas ERK1 y MAP2K1. Estas interacciones incluían puentes de hidrógeno con distancias y ángulos favorables, respaldados por interacciones hidrofóbicas, sugiriendo un acoplamiento exitoso.

CONCLUSIÓN: De acuerdo con los experimentos *in silico*, el heteroesteroide D8 demostró la mejor interacción con dos proteínas clave: ERK1, promoviendo la hipertrofia muscular, y MAP2K1, previniendo la atrofia muscular. Estos hallazgos sugieren que el compuesto D8 podría ser una opción prometedora para modular las vías de señalización y, por ende, regular el crecimiento muscular.

PALABRAS CLAVE: Heteroesteroides, acoplamiento molecular, atrofia, hipertrofia, *in silico*.

ÍNDICE

CAPÍTULO 1.....	8
1. INTRODUCCIÓN.....	8
1.1. El Músculo Esquelético.....	8
1.2. Antecedentes generales.....	10
1.3. Atrofia muscular.....	10
1.4. Hipertrofia muscular.....	12
1.5. Saponinas y Sapogeninas.....	14
1.6. Acoplamiento molecular.....	15
CAPÍTULO 2.....	19
2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS.....	19
3. HIPÓTESIS CIENTÍFICA.....	22
4. JUSTIFICACIÓN.....	22
5. OBJETIVOS.....	23
5.1. Objetivo general.....	23
CAPÍTULO 3.....	24
6. METODOLOGÍA.....	24
6.1. Revisión bibliográfica de las proteínas blanco.....	24
6.2. Modelado 3D de heteroesteroides a partir de códigos SMILES.....	36
6.3. Identificación de estructuras 3D de proteínas blanco.....	40
6.4. Acoplamiento molecular.....	42
6.5. Análisis de los mejores 11 mejores acoplamientos.....	54
CAPÍTULO 4.....	59
7. RESULTADOS.....	59
7.1. Resultados del estudio previo.....	59
7.2. Resultados de acoplamiento de las 16 interacciones propuestas.....	60
7.3. Resultados más prometedores.....	72
8. DISCUSIÓN.....	75
9. CONCLUSIÓN.....	76
10. LIMITANTES.....	77
11. BIBLIOGRAFÍA.....	78

CAPÍTULO 1.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. El Músculo Esquelético.

El músculo esquelético estriado es el tejido más abundante del cuerpo humano y representa aproximadamente entre el 35% y el 45% de la masa corporal total y contiene entre el 50 y el 75% de las proteínas de todo el cuerpo. A diferencia del músculo cardíaco, el músculo esquelético está controlado por el sistema nervioso somático que permite la contracción voluntaria. Se conocen más de 600 músculos esqueléticos en *Homo sapiens*, de diferentes tamaños y propiedades contráctiles que permiten diversas funciones como la locomoción, el apoyo postural, los movimientos potentes o precisos, y la respiración. El músculo esquelético destaca por su alto potencial de adaptación, siendo conocido por responder al entrenamiento de resistencia para inducir la hipertrofia muscular y aumentar la fuerza. (Dumont et al., 2015).

La composición del musculo se basa principalmente en agua (75%), proteínas (20%) y otras sustancias como sales inorgánicas, minerales, grasas e hidratos de carbono (5%). La masa muscular depende de factores como el estado nutricional, el equilibrio hormonal, la actividad física, las lesiones y las enfermedades. Los componentes proteicos del músculo han recibido una considerable atención científica debido a su impacto en el rendimiento deportivo, la función y la salud.

El músculo esquelético cumple diversas funciones corporales, siendo responsable de convertir la energía química en energía mecánica para generar fuerza y potencia, mantener la postura, realizar movimientos que afectan a la función, permitir la participación en entornos sociales y ocupacionales, y contribuir al metabolismo energético básico almacenando importantes sustratos como aminoácidos e hidratos de carbono (Frontera & Ochala, 2015).

Las fibras musculares, también conocidas como células musculares, son las unidades básicas del músculo esquelético. Formadas por la fusión de varias células embrionarias,

son multinucleadas y están rodeadas por una red de tejido conjuntivo denominada endomisio. Las fibras adyacentes también se agrupan en fascículos, rodeados por un tejido conjuntivo más denso denominado perimisio, y el conjunto forma el músculo, recubierto por un tejido conjuntivo resistente llamado epimisio (Figura 1). (Exeter & Connell, 2010).

Estas vainas de tejido conjuntivo permiten el movimiento de las estructuras neurovasculares y proporcionan continuidad con los tendones y la aponeurosis. El tamaño de las fibras musculares oscila entre 10 y 120 μm y están rodeadas por una membrana plasmática denominada plasmalema, mientras que la combinación de varias capas de membrana plasmática y membrana basal se conoce como sarcolema como se observa en la figura 1.

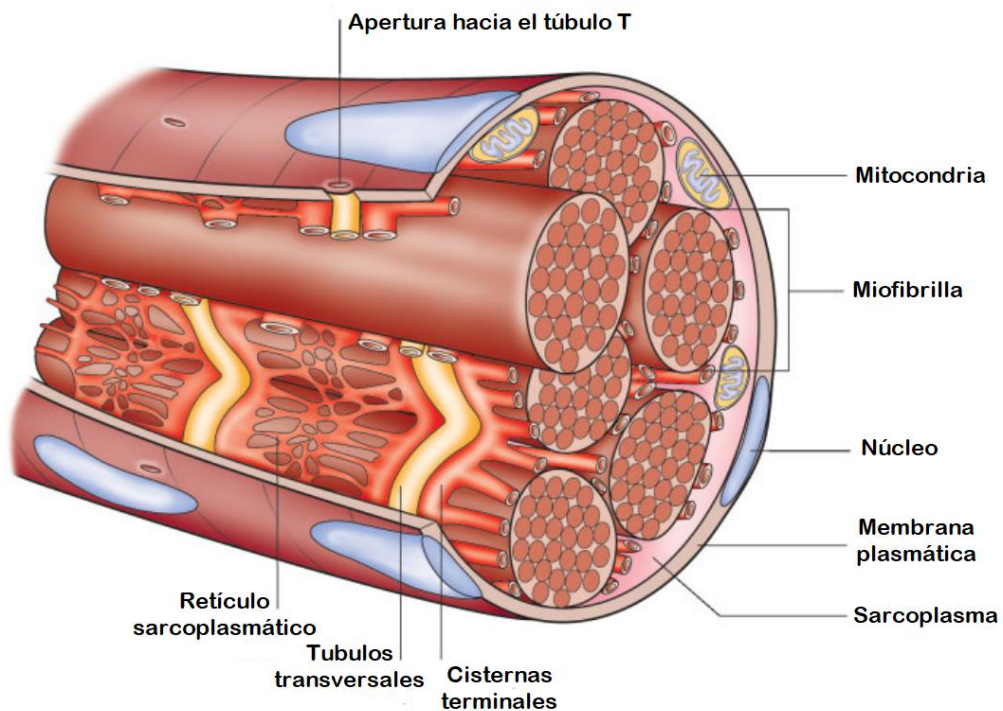


Figura 1. Fascículo conformado por fibras musculares. Tomado y traducido de: (Exeter & Connell, 2010)

Las células precursoras musculares quiescentes, llamadas células satélite, se encuentran situadas debajo de la lámina basal de la fibra muscular, contribuyendo a la regeneración muscular al aportar mionúcleos a las fibras musculares en crecimiento (Morgan & Partridge, 2003).

1.2. Antecedentes generales

La masa muscular en los músculos esqueléticos varía según las condiciones fisiológicas y patológicas del individuo. Se pueden dar dos casos: el crecimiento muscular, denominado hipertrofia, y la pérdida de masa, conocida como atrofia muscular (Schiaffino et al., 2013).

La síntesis y la degradación de proteínas están reguladas de forma coordinada por vías de señalización influidas por el estrés mecánico, la actividad física, la disponibilidad de nutrientes y los factores de crecimiento. Comprender la señalización que regula la masa muscular puede proporcionar posibles dianas terapéuticas para la prevención y el tratamiento del desgaste muscular en enfermedades metabólicas y neuromusculares.(Sandri, 2008).

Los mecanismos moleculares que sustentan al mantenimiento del músculo esquelético implican la interacción entre múltiples vías de señalización. En condiciones fisiológicas normales, una red de señales interconectadas sirve para controlar y coordinar los mensajes hipertroáficos y atróficos, manteniendo un delicado equilibrio entre la síntesis de proteínas musculares y la proteólisis (Egerman & Glass, 2014) .

1.3. Atrofia muscular.

La atrofia del músculo esquelético se manifiesta en animales adultos como resultado de las condiciones de desuso, envejecimiento, inanición y diversas enfermedades. Independientemente de la causa, la atrofia del músculo esquelético se caracteriza por una disminución del contenido proteico, del diámetro de las fibras, de la producción de fuerza y de la resistencia a la fatiga. La atrofia implica diferentes desencadenantes

moleculares y vías de señalización para el desgaste muscular (Jackman & Kandarian, 2004). Durante la atrofia, se acelera la degradación de las proteínas miofibrilares y solubles, y en estado de desgaste sistémico, también disminuye la síntesis proteica, provocando una rápida pérdida de masa muscular y peso corporal, debilidad y aumento de la discapacidad (Cohen et al., 2015).

La miostatina, también conocida como factor de crecimiento y diferenciación 8 (GDF8), es el principal factor involucrado en la atrofia muscular. Forma parte de la superfamilia de proteínas de señalización del factor de crecimiento transformante β (TGF- β) y actúa como regulador negativo del crecimiento del músculo esquelético (Cotton et al., 2018). Se sintetiza como una proteína precursora que se procesa para formar un dímero maduro C-terminal asociado a un propéptido, creando un complejo latente que debe liberarse para provocar su actividad biológica (Carnac et al., 2007).

La miostatina activa se une principalmente al receptor de activina tipo IIB (ActRIIB) y activa la cascada de señalización que inhibe la diferenciación y proliferación de mioblastos.(Elkina et al., 2011). Además de la vía clásica de Smad, la miostatina también utiliza la vía de señalización PI3K-AKT-mTOR y la vía de señalización MAPK para regular la transcripción de factores reguladores miogénicos, MURF-1 y atrogin-1, afectando así la diferenciación miogénica y la calidad del músculo esquelético (Chen et al., 2021).

La señalización de la miostatina también puede ser independiente de la expresión de genes regulados por Smad, por ejemplo, las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK), incluidas las cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK), las cinasas c-Jun N-terminal (JNK) y las proteínas cinasas activadas por mitógenos p38 (p38MAPK) están implicadas en la vía de transducción de señales de la miostatina(Z. Huang et al., 2007) .

1.4. Hipertrofia muscular

La hipertrofia del músculo esquelético, caracterizada por un aumento del tamaño de las miofibras preexistentes en el mamífero adulto, implica un desplazamiento hacia la síntesis proteica y un alejamiento de la degradación proteica. La hipertrofia puede ser inducida por múltiples estímulos anabólicos, entre los cuales el más estudiado es el factor de crecimiento 1 similar a la insulina (IGF1) (Egerman & Glass, 2014).

La señalización de IGF1 implica la unión a su receptor tirosina quinasa (IGF1R), induciendo la transfosforilación del receptor y activando la cascada de señalización PI3K-AKT-mTOR, que inhibe la degradación proteica y favorece la síntesis de proteínas (Egerman & Glass, 2014). Mientras la insulina es producida por el páncreas, el IGF1 se sintetiza principalmente en el hígado bajo la acción de la hormona del crecimiento, actuando como un factor de crecimiento sistémico (Sartori et al., 2021).

En resumen, la regulación del músculo esquelético involucra una compleja red de señalización que coordina procesos como la hipertrofia y la atrofia, ofreciendo posibles objetivos terapéuticos para abordar condiciones de desgaste muscular en diversas enfermedades.

Como se mencionó anteriormente, las principales vías tanto para la atrofia muscular, regulada principalmente por la miostatina, y la vía para la hipertrofia muscular, regulada principalmente por el IGF1, se encuentran interconectadas y dependen una de otra. Por lo tanto, podríamos representar la interconexión de estas vías mediante la Figura 2.

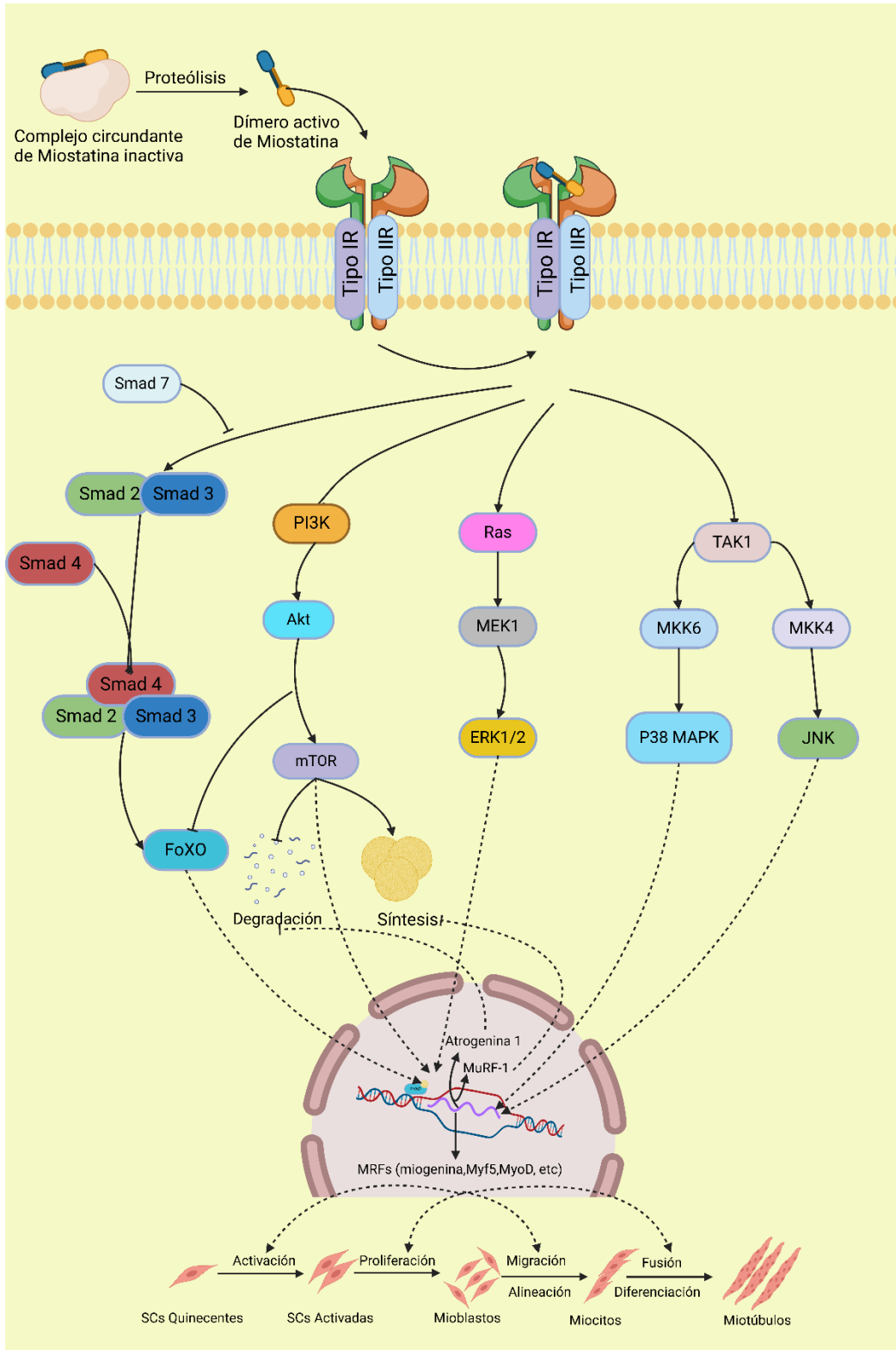


Figura 2. Vía de señalización de la miostatina con las interconexiones entre las diferentes vías de señalización como PI3K-AKT-mTOR y MAPK. Imagen modificada de: (Chen et al., 2021), modificada con BioRender.com.

1.5. Saponinas y Sapogeninas.

Las saponinas son compuestos glucósidos que, de manera diversa es posible encontrarlas en más de 100 especies de plantas y algunos otros organismos vivos como la estrella o el pepino de mar. Estos glucósidos poseen una estructura característica que contiene una aglicona esteroidea, también conocida como sapogenina, y al menos una cadena de azúcares. Gracias a su diversidad estructural y a sus propiedades fisicoquímicas y biológicas, han sido utilizadas en distintas áreas de la industria, como la creación de jabones, en la industria alimenticia, o como agentes espumantes en productos industriales (Guclu-Ustundag & Mazza, 2007) .

Uno de los primeros estudios en los que se reportó la obtención de saponinas esteroides, fue publicado en el año 1947 por Marker y colaboradores. Aislaron por primera vez una sapogenina con carácter esteroideo de plantas pertenecientes a la familia *Liliaceae* y *Dioscoreaceae*. Uno de los compuestos principalmente aislados en el estudio fue la Hecogenina (figura 3), obtenida a partir de dos especies de la familia *Bromeliaceae*, específicamente de *Hechtia texensis*. Este compuesto contiene un grupo hidroxilo y un grupo carbonilo, con una fórmula condensada $C_{27}H_{42}O_4$ (Marker et al., 1947).

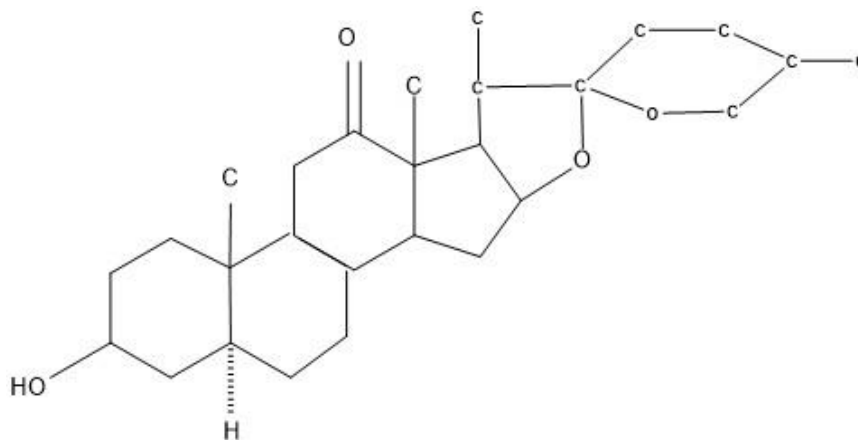


Figura 3. Primera estructura reportada de la Hecogenina sintetizada a partir de *Hechtia texensis*. Imagen modificada de (Marker et al., 1947).

A través de diversos estudios, se ha comprobado que las saponinas tienen diversas actividades biológicas, actuando en el sistema nervioso, cardiovascular y gástrico. También, poseen propiedades antiinflamatorias, y actualmente la Hecogenina se utiliza como un precursor para la creación de fármacos esteroideos, ya que presenta efectos anticonceptivos, antitumorales y antimicrobianos. Su forma más común es en su estructura de acetato que permite una mejor absorción en el cuerpo (da Hora Borges et al., 2023).

En otro estudio publicado en 2020 por Zhang y colaboradores, se determinó mediante la purificación de saponinas y sapogeninas a partir de fenogreco que tres sapogeninas y dos saponinas no mostraron acción como inhibidores de alfa glucosilasa. Esto podría resultar en un retraso en la absorción de carbohidratos y posiblemente reducir el aumento de las concentraciones de glucosa en sangre en pacientes con diabetes mellitus tipo 2. Este estudio resalta el potencial de las saponinas y sapogeninas en el ámbito farmacéutico (Zhang et al., 2020).

Los heteroesteroides estudiados en este trabajo fueron sintetizados a partir de saponinas, sapogeninas, Hecogenina y sus derivados.

1.6. Acoplamiento molecular.

Los métodos basados en estructuras se fundamentan en la información derivada del conocimiento de la estructura tridimensional de una diana de interés, y permiten clasificar bases de datos de moléculas en función de la complementariedad estructural y electrónica de los ligandos con una diana determinada (Pinzi & Rastelli, 2019). El acoplamiento molecular es un método bioinformático que permite predecir y calcular las interacciones más favorables entre dos moléculas. Una de ellas, generalmente de origen proteico y denominada proteína blanco, y la otra llamada ligando, que suele ser un compuesto de interés como un fármaco. Estas interacciones, como puentes de hidrógeno

o fuerzas de van der Waals, pueden desencadenar un cambio conformacional o una alteración en la actividad proteica (Ballón Paucara & Grados Torrez, 2019).

Este proceso generalmente comienza prediciendo la orientación molecular de un ligando dentro de un receptor y luego estima su complementariedad mediante el uso de una función dependiente de los algoritmos que cada programa utiliza (Pinzi & Rastelli, 2019). La eficiencia de un acoplamiento depende en gran medida de la especificidad y la afinidad del ligando por la proteína. En la mayoría de los casos, a mayor afinidad, mayores serán las interacciones entre ambas moléculas, proporcionando una mayor estabilidad al complejo proteína-ligando. (Ballón Paucara & Grados Torrez, 2019).

Los algoritmos de acoplamiento deben clasificar los compuestos según su afinidad de unión, que puede o no guardar relación con la actividad biológica. Para clasificarlos, se utilizan algoritmos de búsqueda estocásticos o aleatorios, dependiendo del programa. Estos algoritmos pueden presentar limitaciones en cuanto al tiempo asignado para correr un acoplamiento. A medida que se permite más tiempo para que transcurra el proceso, hay mayores probabilidades de encontrar la estructura más estable, también conocida como la conformación mínima global (Lohning et al., 2017).

El acoplamiento molecular ofrece una poderosa herramienta para determinar cuáles de una lista de ligandos pueden tener la mejor interacción y estabilidad con respecto a una proteína blanco.

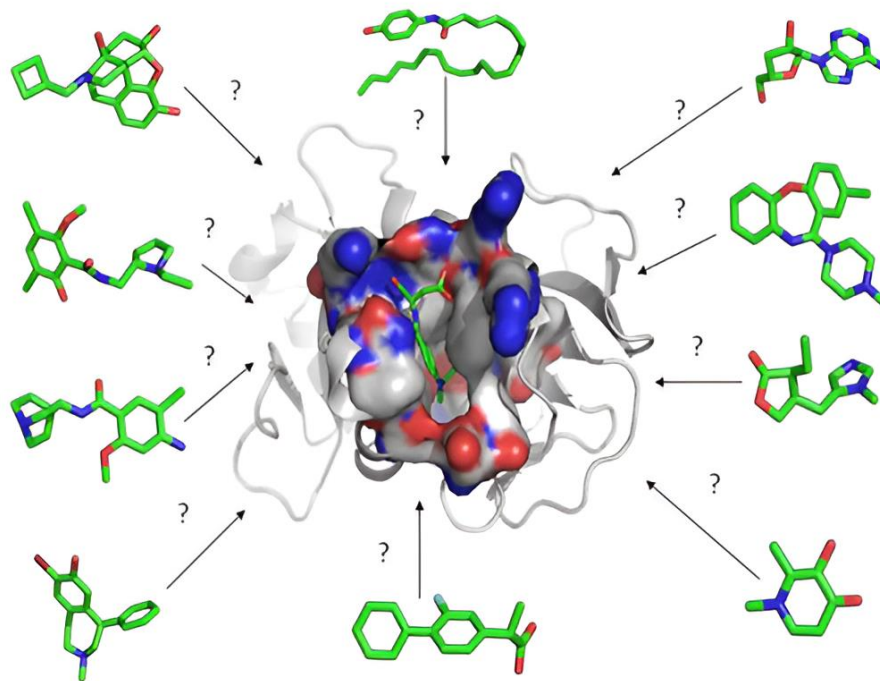


Figura 4. Representación del sitio activo de una proteína, rodeada de ligandos de interés en la cual se practica acoplamiento molecular para obtener la mejor interacción de acuerdo con un sistema de puntuación establecido por el programa de acoplamiento. Tomado de:(Beckam, 2014).

En los últimos años el acoplamiento molecular ha sido una herramienta muy utilizada en distintos tipos de investigación. Esto se debe no solo a su eficiencia, sino también a el hecho de que proporciona resultados precisos de interacciones entre moléculas. Permite descartar aquellas que no presentan estas interacciones, lo que, una vez realizadas de manera *in vitro* se traduce en menos desperdicio de reactivos en las pruebas, y en mejor aprovechamiento de los recursos dentro de un laboratorio.

Recientemente, el acoplamiento molecular fue utilizado en un estudio de SARS-CoV-2 en el cual se seleccionaron 4 proteínas de suma importancia en la virulencia de la enfermedad, nsp4, nsp, NendoU/nsp15 y ACE2. Se llevó a cabo el acoplamiento molecular con compuestos naturales obtenidos de una biblioteca con más de 10,000 compuestos. Los resultados indican que el mejor compuesto obtenido tras el

acoplamiento, que se une eficazmente a NSP4 NSP15, y RdRp es baicalina, un flavonoide unido a un azúcar de forma natural, de origen vegetal tiene la capacidad de inhibir las proteínas diana del SARS-CoV-2 en la conformación de menor energía. (Alazmi & Motwalli, 2021).

Otro estudio reciente se centró en la exploración de compuestos bioactivos que pudieran actuar contra los receptores del factor de crecimiento (GFR). Estos receptores tienen importantes roles en la progresión de células cancerígenas. Se examinaron 50 compuestos bioactivos de diferentes fuentes vegetales como agentes anticancerígenos contra los GFR, utilizando dos fármacos estándares como referencia.

Se realizó el acoplamiento molecular entre los fitoquímicos y los GFR. Los ligandos con un parecido aceptable a los fármacos y una energía de unión comparable se analizaron para determinar sus actividades farmacocinéticas. Este estudio mostró fitoquímicos con una energía de unión comparable a los fármacos estándar (Dovitinib y Gefitinib). La puntuación de bioactividad y el radar de biodisponibilidad proporcionaron más información sobre estos compuestos como potentes agentes anticancerígenos. (Medie & Hemalatha, 2022).

Estos ejemplos de investigaciones pasadas destacan la utilidad del acoplamiento molecular en el descubrimiento de dianas terapéuticas o el desarrollo de nuevos medicamentos.

CAPÍTULO 2.

2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS.

En el Laboratorio de Investigación del Jardín Botánico de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, se sintetizaron 20 heteroesteroides a partir de derivados de sapogeninas como la Diosgenina, Hecogenina y Sarsasapogenina. Se desconocía si estos compuestos podían presentar efectos anabólicos en el músculo esquelético. Se llevó a cabo una investigación de tesis bajo el nombre "Efecto anabólico de análogos de Brasinoesteroides en células de músculo esquelético: una aproximación *in silico* e *in vitro*". A partir de la estructura de estos heteroesteroides, se crearon los códigos SMILES (Simplified Molecular Input Line Entry Specification), que permiten representar una estructura química usando simplemente cadenas de caracteres alfanuméricos (Pérez, 2022).

Una vez obtenidos los códigos SMILES, se utilizaron programas quimio informáticos como Molinspiration, Swiss TargetPrediction y Passonline para predecir la acción de estos heteroesteroides con proteínas blancas a través de la comparación de ligandos con bases de datos previamente creadas. Como control positivo, se utiliza acetato de megestrol y testosterona, y como control negativo el clenbuterol. Los resultados obtenidos se depuraron considerando las vías de señalización a utilizar, PI3K/AKT/mTOR y la vía de atrofia regulada por la miostatina, para obtener los mejores valores de predicción de la actividad de los heteroesteroides (Slovensky, s/f; SwissTargetPrediction, s/f).

De acuerdo con la información obtenida de las plataformas quimioinformáticas y los factores implicados en las vías de señalización de la regulación del músculo esquelético, se seleccionaron seis compuestos que podrían favorecer la hipertrofia muscular. Estos compuestos presentan las estructuras presentadas en la figura 5.

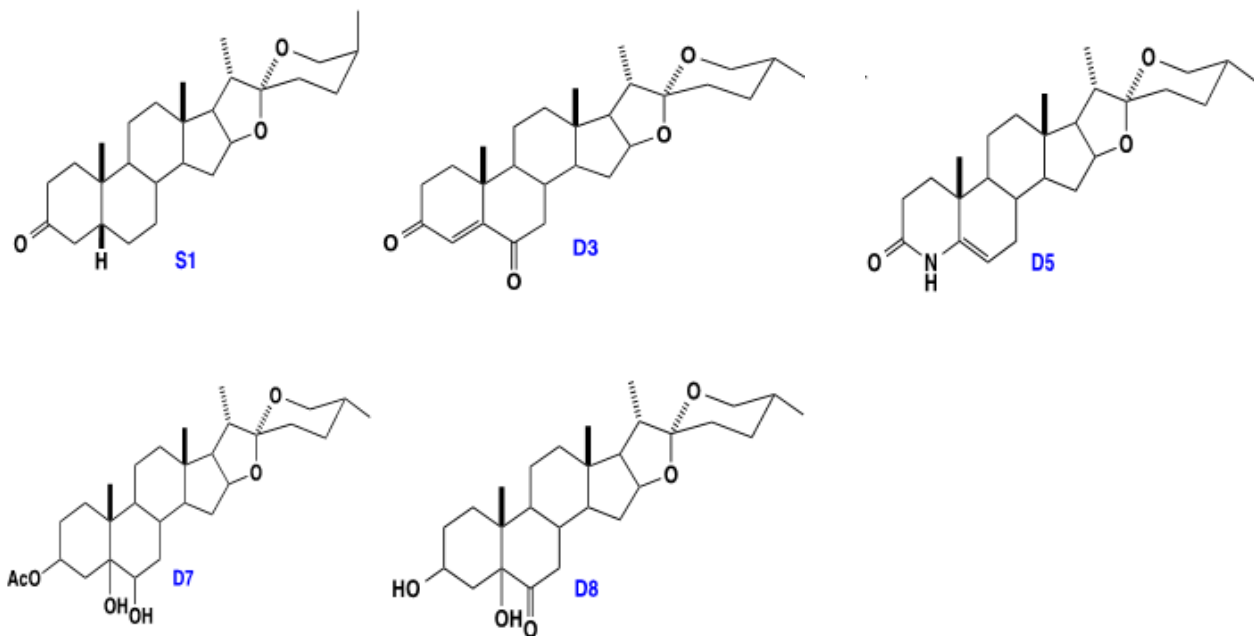


Figura 5. Estructura 2D de los heteroesteroides seleccionados como posibles candidatos para favorecer la hipertrofia muscular.

Con los mejores candidatos seleccionados según sus interacciones con las proteínas de las vías de señalización de interés, se llevó a cabo una experimentación *in vitro* para determinar el efecto de los heteroesteroides sobre el crecimiento de las células del músculo esquelético de la empresa ABM, utilizando diferentes concentraciones propuestas.

Los resultados presentados indican que la testosterona y la epibrasinolida tienen la capacidad de aumentar en más del 100 % el número de células, seguidas por D8, que aumenta en un 63%. Sin embargo, la presencia de un mayor número de células no garantiza que la concentración de proteínas sea igual. En términos de concentración de proteínas, los compuestos D5, D7 y D8 muestran porcentajes de aumento de concentración proteica del 21.6, 13.6 y 9.1%, respectivamente, en comparación con el 1.25 y 6.2% de la testosterona y la epibrasinolida.

Gracias a los resultados *in vivo* y al uso de software bioinformático en esta parte del estudio, se determinaron las posibles mejores interacciones entre la variedad de heteroesteroides y las proteínas diana. A partir de estos resultados, se estableció la siguiente tabla de acoplamientos moleculares para este estudio. Sus interacciones se encuentran detalladas a continuación.

Clave HH	AR	CYP19A1	PI3K	MAP2K1/2	ERK1	GRK2	mTor	PDK1	GSK3B	RPS6K1	IGFR1
S1											
D3											
D5											
D7											
D8											

Tabla 1: Interacciones con mejores resultados en la fase previa del estudio, la tabla presenta la clave de los diferentes heteroesteroides y las abreviaciones de las proteínas de las diferentes líneas de señalización que serán estudiadas por medio de acoplamiento molecular. Véase sección 6.1 para más información.

- El compuesto S1 interactúa con el receptor de IGF, GSK3B, como inhibidor de proteasa, agonista de testosterona, anabólico y estimulante del crecimiento.
- El compuesto D3 tiene interacción con el Receptor Androgénico, actuando como agonista de testosterona y anabólico y estimulante del crecimiento.
- El heteroesteroide D5 interactúa con el receptor de IGF, GSK3B, siendo anabólico y estimulante del crecimiento.
- El compuesto D7 presenta interacción con mTOR, PDK, la proteína ribosomal S6, y actúa como inhibidor de proteasa, agonista de testosterona, anabólico y estimulante de crecimiento.
- El compuesto D8 interactúa con PI3K, MAP ERK, como ligando nuclear, inhibidor de proteasa, agonista de testosterona, anabólico y estimulante del crecimiento.
- D13 tiene interacciones con el receptor IGF, mTOR, GSK3B, siendo utilizado en el tratamiento de la distrofia muscular, agonista de testosterona, como anabólico y estimulante del crecimiento.

3. HIPÓTESIS CIENTÍFICA

Los heteroesteroides presentarán interacciones moleculares con las proteínas blanco seleccionadas y tendrán un efecto de regulación en el músculo esquelético.

4. JUSTIFICACIÓN

En términos generales, las distrofias musculares son un grupo heterogéneo de trastornos definidos por características patológicas distróficas en la biopsia muscular. Clínicamente, se caracterizan por una debilidad muscular progresiva que afecta a los músculos esqueléticos. Sin embargo, existe una importante variabilidad en los aspectos bioquímicos, la distribución de la musculatura afectada, el grado de compromiso respiratorio y cardíaco, así como la afectación de otros órganos como los ojos y el sistema nervioso central. También hay variabilidad, incluso entre pacientes con mutaciones genéticas, en cuanto a la edad de aparición, gravedad, progresión, pronóstico, y, por tanto, en el tratamiento óptimo (Carter et al., 2018)

Dentro de las enfermedades relacionadas con las distrofias musculares más comunes en la actualidad, se encuentra la acromegalia, una enfermedad desfigurante que, de no ser tratada, puede reducir la expectativa de vida en un promedio de 10 años en el individuo que lo padece. El paciente con acromegalia puede presentar hipertrofia ventricular izquierda o derecha, lo que puede desencadenar en una falla diastólica que provoque insuficiencia cardíaca (Perel & Echin, 2011).

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

El objetivo principal es determinar mediante acoplamiento molecular si los heteroesteroides se acoplan de manera efectiva a proteínas de las vías de señalización involucradas en el crecimiento del músculo esquelético, regulando así su desarrollo. Para lograr este objetivo, se seguirá un protocolo de investigación que consta de las siguientes etapas:

1. Realizar una revisión bibliográfica de las proteínas con las cuales los heteroesteroides muestran interacciones.
2. Realizar el modelado en 3D de los heteroesteroides de interés.
3. Utilizar diversas bases de datos de estructuras proteicas 3D como PDB (*Protein Data Bank*), ePDB (*Protein Data Bank in Europe*), UNIPROT (*The Universal Protein Resource*) para obtener los modelos de las proteínas de interés.
4. Realizar acoplamientos moleculares mediante la suite del CCDC (*Cambridge Crystallographic Data Centre*) de las proteínas de interés con los heteroesteroides que muestran interacción.
5. Determinar las interacciones moleculares específicas de cada acoplamiento.
6. Identificar qué heteroesteroides pueden tener el mejor efecto anabólico o inhibir la activación de su respectiva vía de señalización.

CAPÍTULO 3.

6. METODOLOGÍA

6.1. Revisión bibliográfica de las proteínas blanco.

6.1.1. Receptor Androgénico (RA)

El receptor androgénico es un factor de transcripción nuclear dependiente de ligando y miembro de la familia de receptores nucleares de hormonas esteroideas. Su papel principal es regular los andrógenos, hormonas masculinas encargadas del desarrollo del sistema reproductivo masculino y de las características sexuales secundarias (Davey & Grossmann, 2016). Presente en diversos tejidos, el RA desempeña funciones clave en el desarrollo y mantenimiento de sistemas como el reproductivo, musculoesquelético, cardiovascular, inmunitario, neural y hematopoyético (Davey & Grossmann, 2016). Codificado en el brazo largo del cromosoma X (Xq11-12), el gen del RA consta de 8 exones que codifican una proteína de 919 aminoácidos. La estructura general del receptor incluye un dominio de transactivación independiente del ligando (DNT) en el extremo amino terminal, un dominio de unión al ADN (DBD), un dominio de unión al ligando (LBD) en la región carboxi-terminal (COOH) y una región "bisagra" que conecta el LBD con el DBD (figura6) (Levalle OA. & Lalosa S., 2015).

El RA, constituye una proteína de 110 kDa que encuentra codificado en el brazo largo del cromosoma X (Xq11-12). El gen está constituido por 8 exones que codifican una proteína de 919 aminoácidos.

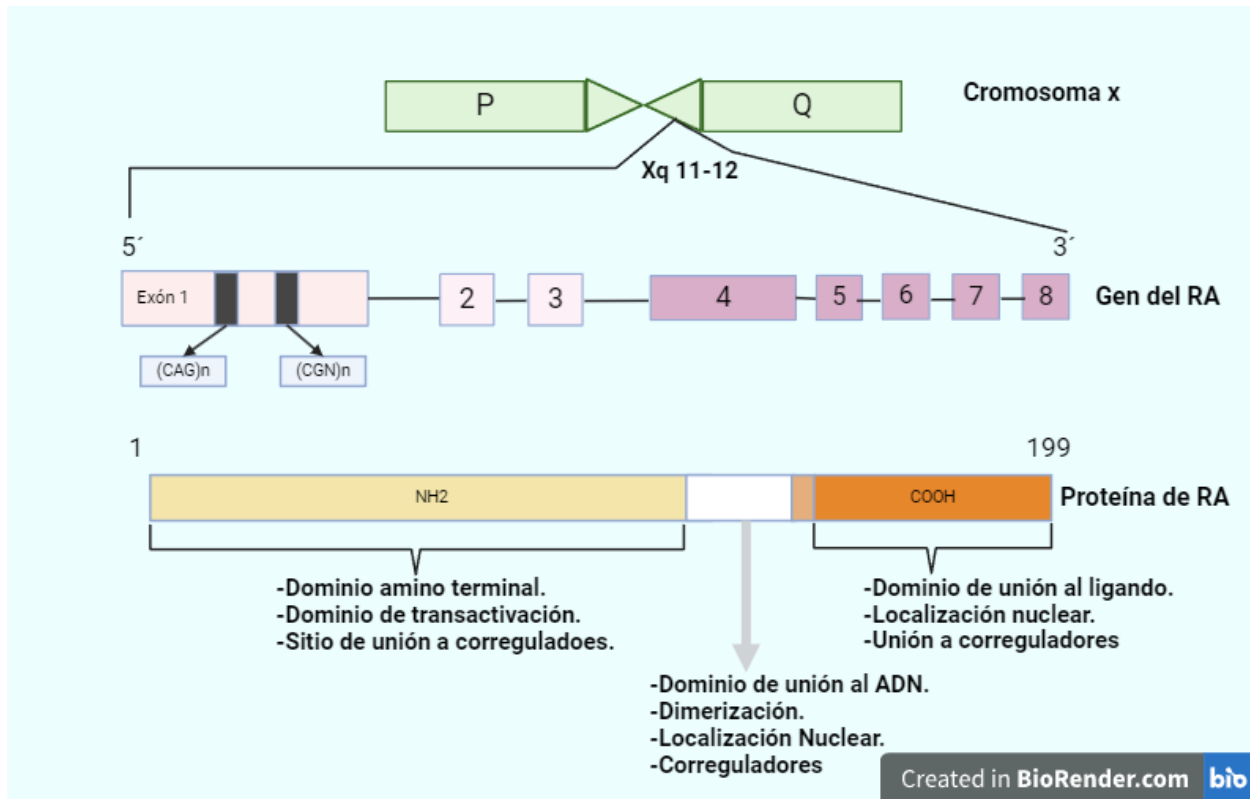


Figura 6: Esquema de la organización cromosómica, genética y proteica del receptor androgénico (RA). Modificada de (Levalle OA. & Lalosa S., 2015). Modificada con BioRender.com

6.1.2. CITOCROMO P450 19A1 (CYP19A1)

Los citocromos P450, en general, catalizan el metabolismo de una amplia variedad de compuestos endógenos y xenobióticos, incluyendo fármacos, con baja especificidad de sustrato (Ghosh et al., 2018). Localizado en el retículo endoplásmico, el P450 19A1 cataliza los últimos pasos de la biosíntesis de estrógenos. Su estructura cristalina revela un sitio activo que se adapta bien para alojar al andrógeno, permitiéndole catalizar las reacciones necesarias para transformarlos en estrógenos en una secuencia de 3 pasos (Sohl & Guengerich, 2010).

La estructura de P450, presenta residuos hidrófobos y polares que complementan el esqueleto del esteroide. Estos residuos se encuentran yuxtapuestos en la región amino terminal hidrofóbica, por lo que, para poder tener acceso al sitio activo, es

necesario que exista anclaje membranal entre la testosterona y el citocromo (Ghosh et al., 2009).

6.1.3. PI3-CINASA P110-SUBUNIDAD ALFA (PI3K)

Las fosfatidilinositol 3-cinasas (PI3Ks) son lípidos heterodiméricos, compuestos por subunidades catalíticas y reguladoras. Son activadas por tirosina quinasas receptoras de factores de crecimiento, y producen fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato (PIP3). La vía PI3K/Akt inicia una amplia gama de eventos de señalización implicando factores como la fosfatasa, y afecta la regulación de la proliferación de mioblastos, la supervivencia y mortalidad celular (C.-H. Huang et al., 2007).

La activación de la vía PI3k/Akt induce la hipertrofia del músculo esquelético mediante la regulación positiva de la síntesis proteica descendente de la señalización TORC1. En experimentos, se ha demostrado que la sobreexpresión de IGF-1 durante 2-3 semanas es suficiente para inducir la duplicación del tamaño del músculo esquelético en ratones transgénicos, evidenciando que la activación de Akt es esencial para la hipertrofia *in vivo* (Coleman et al., 1995; Glass, 2010; Musarò et al., 2001). Por el contrario, en condiciones de atrofia muscular, la inhibición de la PI3Kinasa suprime la señalización de Akt tras la activación del IGF1, bloqueando la hipertrofia controlada por IGF1. Esto demostró que la PI3 quinasa es necesaria para la hipertrofia inducida por IGF1 en el músculo esquelético (Rommel et al., 2001; Sugita et al., 2005).

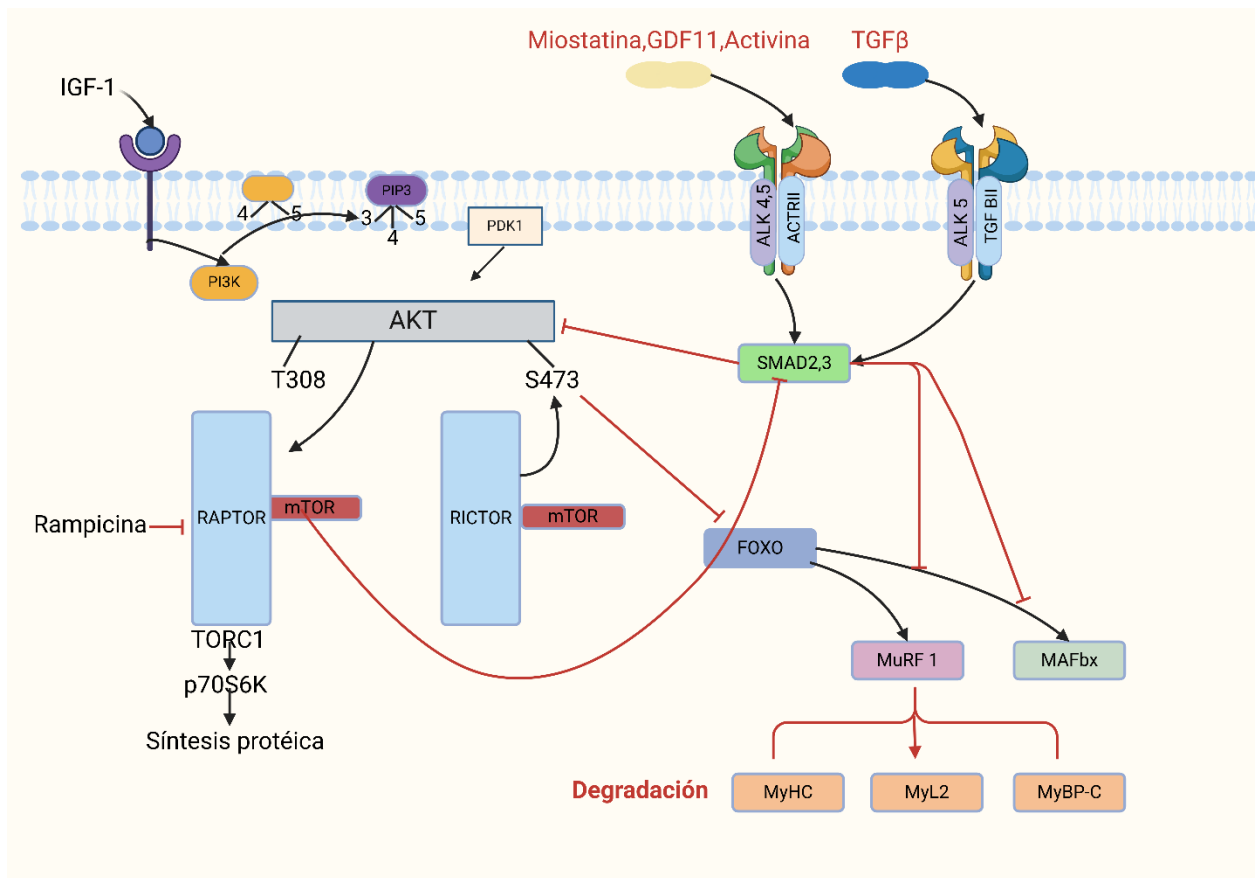


Figura 7: La señalización de la hipertrofia regula de forma dominante la señalización de la atrofia y la miostatina. A la izquierda, se muestra la señalización de hipertrofia PI3k/Akt, a la derecha, la miostatina activa los factores de transcripción Smad2 y Smad3, que bloquean la diferenciación muscular. Imagen modificada de (Glass, 2010). Modificada con BioRender.com.

La activación de la vía PI3k/Akt con IGF-1 induce la hipertrofia del músculo esquelético a través de la vía PI3k/Akt, regulando positivamente la síntesis proteica descendente de la señalización TORC1. La miostatina activa los factores de transcripción Smad2 y Smad3, que bloquean la diferenciación muscular, incluyendo las ligasas E3 MuRF1 y MAFbx, reguladas al alza durante la atrofia muscular. La activación de Smad2 y 3 también inhibe Akt, demostrando los efectos inhibitorios de la miostatina sobre Akt. Los sustratos de MuRF1 incluyen la cadena pesada de miosina (Glass, 2010).

6.1.4. QUINASA ESPECÍFICA DUAL 1 (MAP2K1)

La quinasa específica dual 1 es una proteína de 43 a 46 kDa esencial en la vía de señalización MAPK. En un estudio realizado por Ryder y colaboradores, demostraron mediante el uso de un inhibidor de MAPK, que la contracción muscular activa la vía de señalización MAPK, que a su vez es responsable de la activación de otras proteínas como las quinasas extracelulares ERK, que cuando es activada de manera constante, permite la diferenciación celular (Ryder et al., 2000).

Las proteínas MAPK, se consideran vías de señalización altamente conservadas a lo largo de la evolución, ya que responden a diversos estímulos extracelulares y controlan múltiples procesos fundamentales como el crecimiento, la proliferación, la diferenciación celular, la respuesta al estrés, la supervivencia celular y la apoptosis (Plotnikov et al., 2011a).

Para que exista la activación de la vía de señalización MAPK en la que intervienen los receptores de tirosina cinasa, la unión del ligando al receptor provoca la dimerización de los receptores, y posteriormente su autofosforilación, estos residuos actúan como un sitio de acoplamiento para diversas proteínas de señalización activadas por el mecanismo de fosforilación. (Dhanasekaran & Reddy, 1998).

En cuanto al músculo esquelético, estudios han demostrado que la vía MAPK se activa en respuesta al ejercicio en el músculo esquelético humano (Aronson et al., 1997). En el estudio previo, se destacó como observación importante que, la activación de la vía MAPK está limitada al músculo esquelético. Esto sugiere que la estimulación de la cascada de señalización es una función del mecanismo local específico del músculo, más que una simple respuesta sistemática al ejercicio (Aronson et al., 1997).

6.1.5. CINASA MAP ERK1 (ERK1)

Las MAPK forman parte de una red altamente conservada que transduce señales extracelulares en una respuesta intracelular que implica de 3 a 4 niveles de quinasas, constituyendo cascadas de fosforilación amplificadoras específicas. Estas cascadas culminan en la fosforilación y activación de ERK1 (Plotnikov et al., 2011b).

En el músculo esquelético, existe una correlación entre el ejercicio y la activación de ERK1/2. En un estudio con sujetos humanos, un protocolo de ejercicio con una sola pierna aumentó la activación de ERK1/2 en relación con la pierna contralateral en reposo, mientras que los corredores de maratón mostraron un aumento de la fosforilación de ERK1/2 en sus músculos. Respecto a la manipulación de ERK1/2 *in vivo*, mediante el uso de un plásmido que expresaba la fosfatasa-1 de MAPK en el gastrocnemio de ratones, se observó un aumento de las fibras de tipo I, lo que sugiere que la inhibición de ERK1/2 provoca una conversión de tipo de fibra rápida a lenta, las fibras lentas toleran una contracción moderada por largos periodos de tiempos, mientras que las rápidas tienen la capacidad de realizar contracciones más potentes por un breve periodo de tiempo. (Aronson et al., 1997; Plotnikov et al., 2011a).

En un estudio con ratones activados en la respuesta de ERK1/2, se demostró que, al evaluar la resistencia a la fatiga, los modelos murinos con mayor señalización de ERK1/2 permiten que el músculo sea más resistente a la fatiga en comparación con los modelos en los que ERK1 no era inducido. Los investigadores sugieren que la sobreexpresión de ERK1/2 permite un cambio hacia un fenotipo lento y oxidativo en todos los músculos, lo que los hace más resistentes en comparación con las fibras glucolíticas rápidas musculares (Boyer et al., 2019). En conclusión, los investigadores afirmaron que la actividad sostenida de ERK1/2 en el músculo esquelético produce un cambio de tipo de fibra rápido a lento, lo que protege contra la distrofia muscular, sugiriendo un enfoque terapéutico para mejorar la eficacia metabólica del músculo y proteger contra la enfermedad distrófica (Boyer et al., 2019).

6.1.6. RECEPTOR ADRENÉRGICO BETA-1 CINASA 1 (GRK2)

Las quinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRKs) representan un punto de convergencia de crucial importancia en múltiples rutas de señalización celular. Entre sus múltiples funciones podemos destacar la regulación de los receptores acoplados a proteínas G, una familia de proteínas membranales de gran importancia fisiológica y farmacológica. Además, las quinasas GRKs desempeñan un papel esencial en la propagación de señales intracelulares, actuando como proteínas adaptadoras y contribuyendo al ensamblaje de complejos multimoleculares alrededor del receptor (Mayor, 2009).

La quinasa del receptor adrenérgico beta-1 es una isoforma de esta proteína, es esencial ya que promueve la fosforilación de grupos receptores tirosina-quinasa y de diversos sustratos que no se encuentran acoplados a proteínas G, así como también están implicadas en la regulación, expresión, degradación, localización y actividad de las GRKs. Esto debido a que se ha relacionado el nivel y la funcionalidad de GRK2 con diversas patologías, como fallo cardíaco congestivo, inflamación e incluso tumores (Mayor, 2009).

La estructura del dominio quinasa de GRK2 es similar a la presentada por otras quinasas. Curiosamente, el dominio RH puede interactuar con los dominios quinasa y PH, sugiriendo una función importante en la regulación de la actividad de la quinasa. En el complejo, las características de la interfaz de los dominios RH-PH indican que puede existir una regulación alostérica entre estas dos regiones. Por lo tanto, cambios en la conformación de los dominios RH o PH, provocados por interacciones proteína-proteína o por fosforilación, podrían llevar a cambios en la actividad catalítica a través de su interfaz con el dominio quinasa (Lodowski et al., 2003).

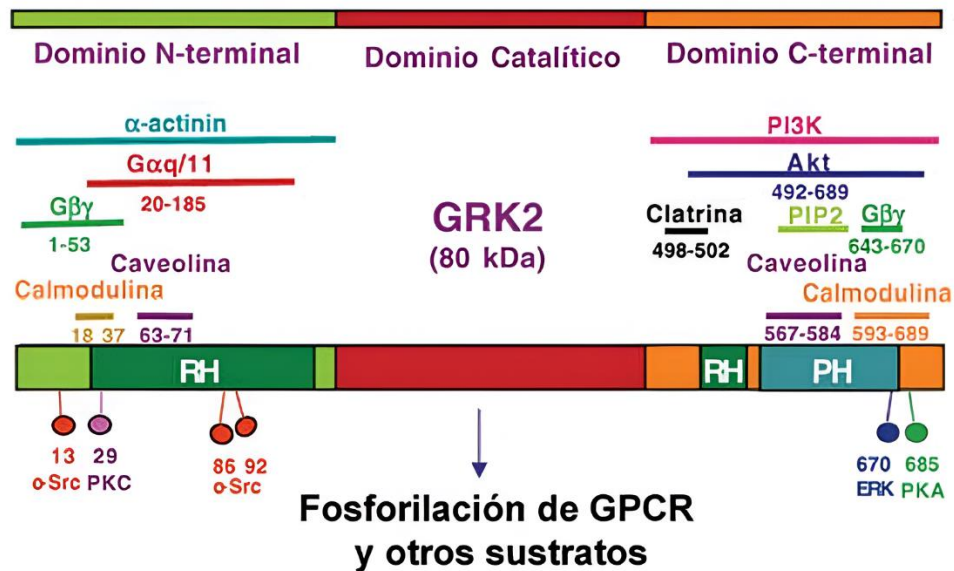


Figura 8: Representación esquemática de los dominios funcionales de GRK2. Se muestran también las regiones implicadas en la interacción con diversas proteínas celulares identificadas hasta el momento, y los residuos fosforilados por distintas proteína-quinzasas. Imagen tomada de (Mayor, 2009).

6.1.7. CINASA SERINA/TREONINA MTOR

mTOR es una proteína cinasa atípica de serina/treonina que pertenece a la familia de las cinasas relacionadas con PI3K, siendo parte crucial de una vía de señalización PI3k/Akt/mTOR, esta tiene un impacto importante en la mayoría de las funciones celulares como el crecimiento, la acumulación de masa y la proliferación (Laplante & Sabatini, 2012).

mTOR está formado por dos complejos diferentes, mTORC1 y mTORC2, que se forman a partir de las diferentes interacciones proteicas y tienen una sensibilidad distinta a la rapamicina, y presentan distintas entradas y salidas río arriba y abajo. mTORC1 es el mejor caracterizado de los dos complejos mTOR y una característica

notable de esta ramificación de la vía de señalización es el número y la diversidad de señales río arriba que percibe.

La vía mTORC1 integra entradas de al menos cinco señales intracelulares y extracelulares principales -factores de crecimiento, estrés, estado energético, oxígeno y aminoácidos- para controlar muchos procesos importantes, como la síntesis de proteínas y lípidos y la autofagia. mTORC1 es a su vez regulada por dos complejos heterodiméricos, hamartina y tuberina, estos complejos son responsables de múltiples señales río arriba que inciden en mTORC1, como los factores de crecimiento a continuación- la insulina, IGF1, ERK1/2 y RPS6K1 (Laplante & Sabatini, 2012).

Como se mencionó anteriormente, los factores de crecimiento están vinculados a mTOR de diversas maneras. IGF1 es el principal regulador de la hipertrofia muscular a través de la vía PI3K/Akt/mTOR. Esta vía se activa mediante la fosforilación sucesiva de PI3K, Akt y mTOR después de la translocación de PI3K al sustrato 1 fosforilado del receptor de insulina. Luego, desempeña funciones vitales en la regulación del desarrollo muscular y la hipertrofia mediante la promoción de la proliferación y la síntesis de proteínas musculares, así como la prevención de la degradación muscular (Yin et al., 2020).

6.1.8. PIRUVATO DESHIDROGENASA CINASA 1 (PDK1)

El complejo mitocondrial piruvato deshidrogenasa (PDC) cataliza la conversión irreversible de piruvato en acetil-CoA junto con la reducción de NAD⁺. En los mamíferos, la regulación tisular específica de la actividad de la PDC es necesaria para el control de la homeostasis de la glucosa. La reacción catalizada por PDC está controlada principalmente por un ciclo de fosforilación y desfosforilación altamente regulado que se lleva a cabo mediante componentes cinasa y fosfatasa específicos (Abbot et al., 2005).

La PDK tiene cuatro isoformas (PDK1-4), que tienen propiedades bioquímicas distintas y patrones de expresión y funciones específicos de cada tejido. La alteración de la función de las PDK, como la inhibición inapropiada de la PDC por las PDK, está asociada a diversas patologías, como el cáncer, la resistencia a la insulina, la diabetes de tipo 2 y la hipertensión arterial pulmonar. Por tanto, la inhibición farmacológica de las PDK se ha convertido en una opción atractiva para el tratamiento de estos trastornos. (Škorja et al., 2021)

6.1.9. GLUCÓGENO SINTASA CINASA-3 BETA (GSK3B)

La glucógeno sintasa cinasa 3 beta, GSK3B, es un sustrato distinto de Akt que puede modular la hipertrofia. La fosforilación por Akt inhibe la actividad de GSK3B. La expresión de una forma inactiva de quinasa dominante-negativa de GSK3B induce una hipertrofia significativa en miotubos, así como bloquea la traducción de proteínas iniciada por la proteína F2B y bloquea la diferenciación inducida por el factor de transcripción NFAT. La inhibición de GSK3B mediada por IGF-1 es un mecanismo distinto para inducir la hipertrofia y promover la proliferación de mioblastos (Hardt & Sadoshima, 2002; Rommel et al., 2001) .

6.1.10. PROTEÍNA RIBOSÓMICA S6 QUINASA 1 (RPS6K1)

La proteína ribosómica S6 quinasa es una proteína quinasa de doble dominio quinasa que interviene en múltiples procesos, como la traducción de proteínas, el crecimiento celular y la migración, esta familia proteica actúa como efectores de la vía de señalización MEK1/2 y ERK1/2 (Chrysostomou et al., 2021). RPS6K1, también conocida como P70S6K fue detectada por primera vez en extractos de células quiescentes 3T3 estimuladas para proliferar con factor de crecimiento epidérmico o suero en el laboratorio de George Thomas en 1987.

La familia de S6K se localiza en el cromosoma 17q23 y existen dos isoformas, p70 y p85, esta última siendo más larga por 23 aminoácidos e incluyendo una secuencia de localización en la región amino terminal; p70 se localiza en el citoplasma y p85 en el núcleo, sin embargo, p70 presenta mucha mayor actividad en la regulación del ciclo celular, es por eso que esta isoforma es la que se estudia en relación con múltiples enfermedades (Bahrami-B et al., 2014).

Según un estudio de Bahrami-B y colaboradores, la expresión y activación de RPS6K1 pueden coordinarse a través de diferentes señales extracelulares, como factores de crecimiento, citocinas, nutrientes y productos oncogénicos de las vías de señalización celular. También se ha demostrado que la vía de señalización PI3K regula positivamente la activación de RPS6K1 mediante las proteínas de acoplamiento sustrato del receptor de insulina (IRS) y Akt. En este proceso, intervienen muchos otros factores como el segundo complejo de la proteína mTOR (mTORC2), finalmente fosforilando la proteína de unión al factor de iniciación eucariota conocido como E4 y activando así RPS6K1. Esto promueve la biogénesis de los ribosomas y la traducción de las proteínas de crecimiento y división celular (Bahrami-B et al., 2014).

Actualmente, se entiende bien, mediante el uso de modelos de ratón, mosca y gusano, que S6K1 es un importante regulador del metabolismo celular y actúa como mediador clave de los bucles de retroalimentación negativa en la red de señalización PI3K. Además, la perturbación de la activación de mTORC1-S6K puede conducir a la activación de la señalización PI3K-Akt (Fenton & Gout, 2011).

6.1.11. RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO SIMILAR A LA INSULINA 1 (IGF1R)

El factor de crecimiento similar a la insulina-1 (IGF-1) pertenece a una pequeña familia de polipéptidos de cadena simple que incluye la proinsulina, la insulina, el IGF-1 y el IGF-2, que muestran una gran homología en la secuencia de aminoácidos y comparten una estructura terciaria similar. El IGF-1 y el IGF-2 derivan de dos genes

distintos y se transcriben prácticamente en todas las células, ya que estos factores desempeñan un papel fundamental en la proliferación, diferenciación y función celular y están estrechamente regulados a nivel transcripcional y postranscripcional (Yakar & Adamo, 2012) .

Los procesos celulares de regeneración e hipertrofia de miofibras son posibles gracias a la activación, proliferación y posterior diferenciación de células satélites. Estos procesos están modulados por la actividad autocrina y paracrina del IGF-1, promoviendo así la hipertrofia muscular (Philippou et al., 2007).

El receptor del IGF-1 (IGF1R) es una tirosina quinasa transmembrana de tipo 2 que normalmente forma un heterotetrámero con dos subunidades alfa y dos subunidades beta. Tras la unión del IGF-1 a su receptor, se activan múltiples vías intracelulares. Para propagar estas señales, el IGF1R activado por ligando se une inicialmente a proteínas adaptadoras intracelulares, principalmente el sustrato 1 del receptor de insulina (IRS1). Otras proteínas como SHC1, GAB y CRK también pueden interactuar con el IGF1R activado. Estas proteínas adaptadoras son esenciales para que el IGF1R transmita señales a través de las vías PI3K-AKT1-mTOR y MAPK, desencadenando así la hipertrofia muscular (Iams & Lovly, 2015).

En un estudio realizado en 2015 por O'Neill y colaboradores, se demostró mediante la creación de ratones *knockout* específicos del IGF1R en el músculo que hubo una disminución de más del 60% en la masa muscular de los ratones. Sin embargo, no se vio afectada la tolerancia a la glucosa en todo el cuerpo de los ratones, lo que sugiere una interconexión entre estas vías y resalta el potencial terapéutico del IGF1R en el tratamiento de diversas enfermedades (O'Neill et al., 2015).

6.2. Modelado 3D de heteroesteroides a partir de códigos SMILES

Para realizar el modelado en 3D de los heteroesteroides a partir de los códigos SMILES, se utilizó el software Avogadro. Este software, diseñado para su uso en química computacional, modelado molecular y bioinformática, ofrece una interfaz amigable y una rápida velocidad de procesamiento. Además, cuenta con algoritmos de minimización estructural de alta calidad, siendo una herramienta valiosa en plataformas gratuitas (Hanwell et al., 2012).

El proceso de modelado comenzó abriendo Avogadro y seleccionando la sección "Build", seguido de "Insert" y luego eligiendo el subapartado "SMILES".

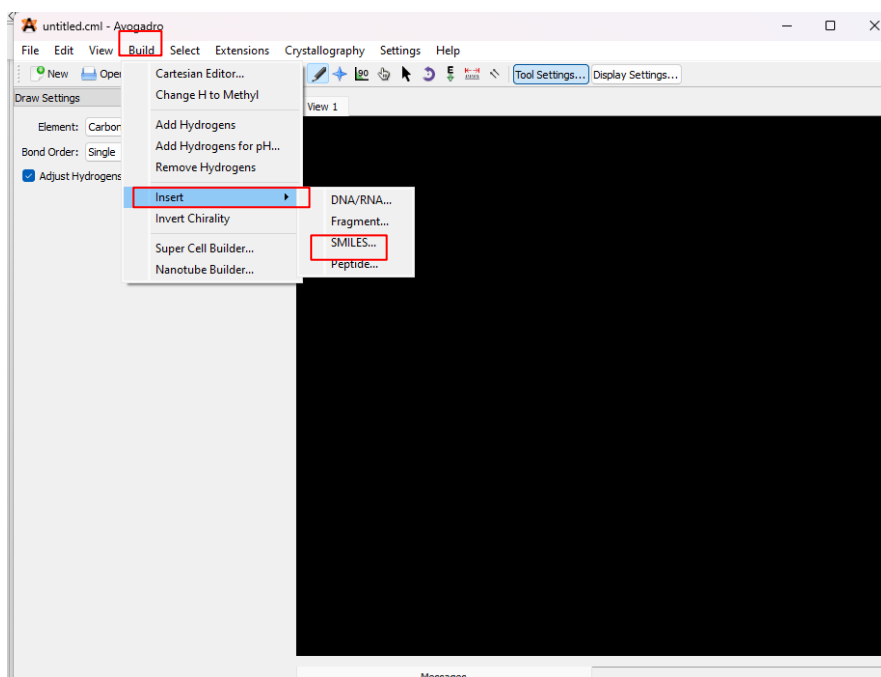


Figura 9. Pantalla de inicio del software Avogadro para construcción y visualización de moléculas.

Una vez ingresado en el apartado "SMILES" se desplegará una nueva ventana en la cual debemos ingresar nuestro código y dar click en "OK".

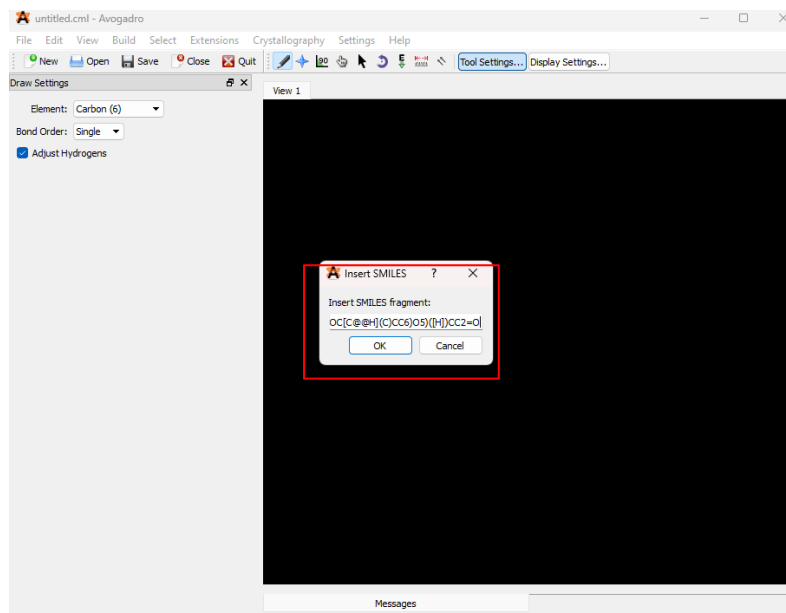


Figura 10. Pantalla “Insert SMILES” para construcción de la molécula 3D.

Posteriormente, el programa nos mostrará una visualización preliminar de la molécula, marcada en azul indicando su manipulación.

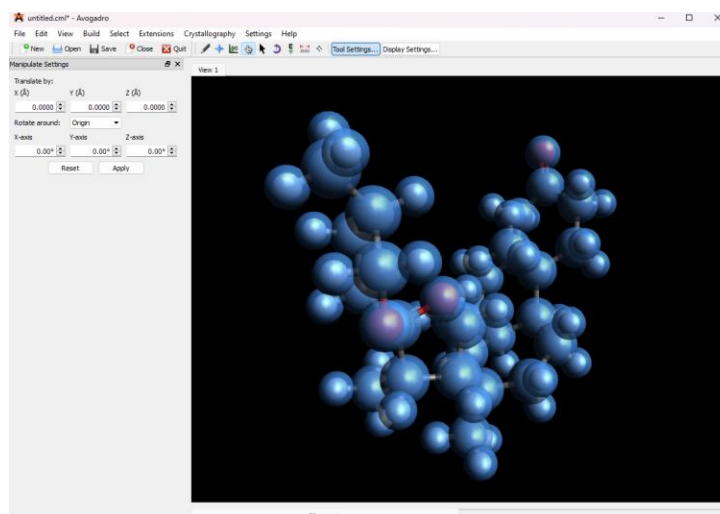


Figura 11. Visualización preliminar de estructura 3D del heteroesteroido con manipulación automática por software.

Ahora, vamos a la pestaña “Edit” y seleccionamos “Undo Manipulate Atoms”, lo cual nos permitirá eliminar el rastro en el programa de la manipulación creada al momento de insertar el código SMILES.

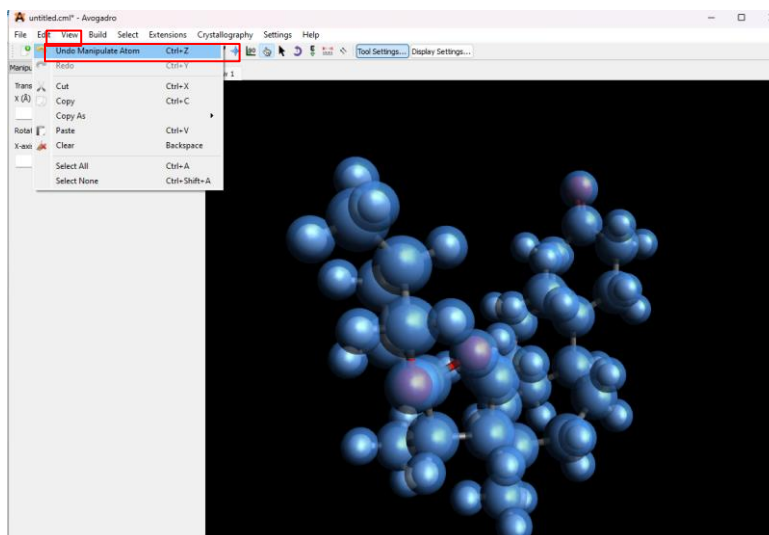


Figura 12. Proceso eliminación de la manipulación molecular.

Después de la manipulación, la visualización muestra colores específicos para cada elemento, como gris para el carbono y rojo para el oxígeno.

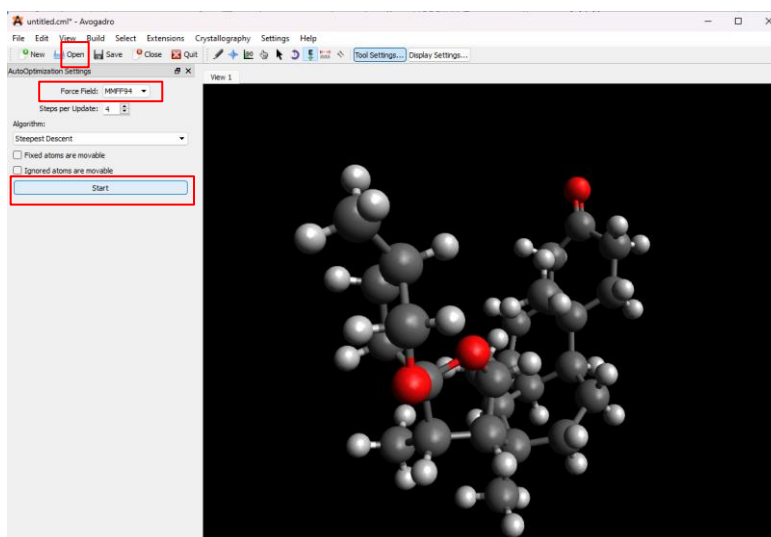


Figura 13. Proceso de selección del algoritmo de minimización energética.

La minimización de la energía de los heteroesteroides se llevó a cabo utilizando la herramienta "Auto Optimization Tool" dentro de Avogadro. Se seleccionó el algoritmo "MMFF94" para moléculas orgánicas y se inició la minimización de la energía molecular. La energía mínima se alcanzó cuando el contador en "dE" llegó a cero, mostrando una energía mínima de -488.376 kJ/mol para el heteroesteroides con la clave S1.

Una vez obtenida la estructura 3D con su energía mínima, se aseguró la estabilidad molecular para condiciones *in vivo*. Este proceso se repitió para todos los compuestos a utilizar.

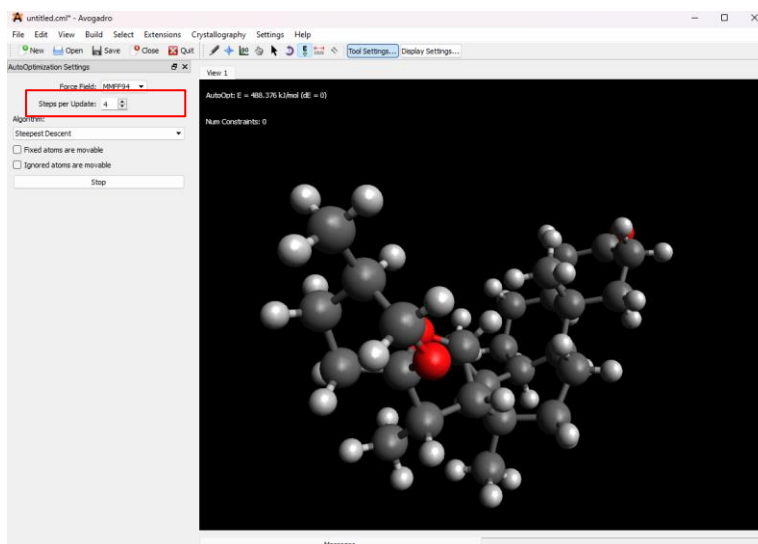


Figura 14. Proceso minimización estructural finalizado con "AutoOpt: dE= 0".

Como último paso para que los modelos tridimensionales estuvieran listos para el acoplamiento molecular, se guardaron en un formato .mol2 para ser compatibles con el software GOLD.

6.3. Identificación de estructuras 3D de proteínas blanco.

Para seleccionar los modelos tridimensionales de cada una de las 11 proteínas blanco-seleccionadas se utilizó la base de datos UNIPROT que permitía filtrar mediante diversos parámetros como especie, tipo de experimento, entre otros. Se selecciona como organismo *Homo sapiens* y se utilizó como criterio principal para la selección que los modelos hayan sido obtenidos a partir de experimentos de difracción de rayos X.

Posteriormente, se seleccionaba el resultado más adecuado dentro de la lista obtenida, y una vez ingresando a ella, se desplegaba toda la información existente de la proteína, desde su función y clasificación hasta todas las estructuras 3D reportadas en diferentes bases de datos como RCSB-PDB, PDBe, PDBj y PDBsum.

Se eligieron estructuras con una resolución entre 1.4 y 3.5 Å priorizando aquellas con una mejor resolución, pero sin perder de vista otros criterios (Figura 15).

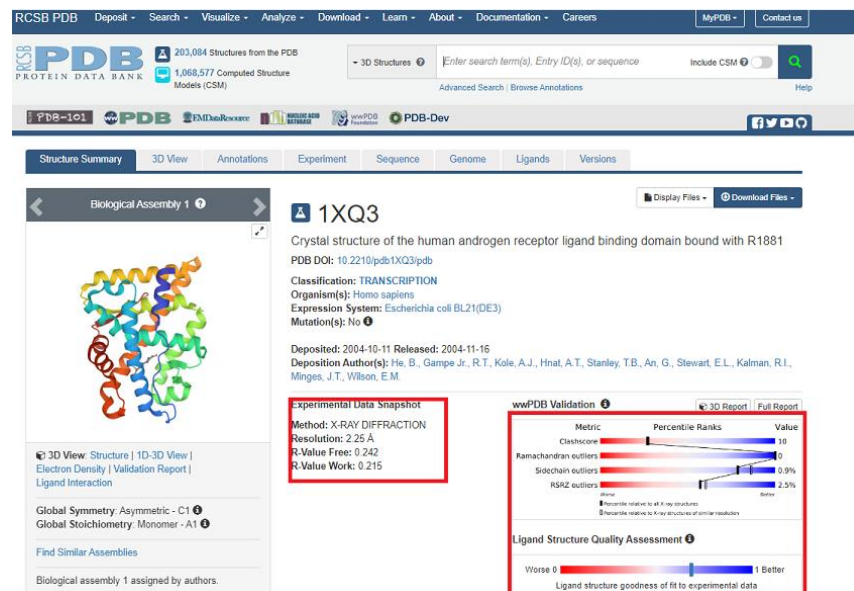


Figura 15: Visualización de las estructura 3D de una proteína en RCSB-PDB con los criterios de selección resaltados en rojo.

La depuración de las estructuras se realizó a través de la comparación de parámetros como resolución, mutaciones en la proteína, RSRZ *outliers* y el gráfico de descripción proteica. Las mejores estructuras de cada una de las 11 proteínas blanco fueron seleccionadas para los acoplamientos primarios.

Modelo 3D	Código PDB	DOI
Receptor Androgénico (AR)	1XQ3	https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.09.036
Citocromo P450 19A1 (CYP19A1)	5JL6	https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2018.02.009
PI3-kinase p110-subunidad alfa (Pi3K)	3ZIM	DOI: 10.1126/science.1150799
Quinasa específica dual 1 (MAP2k1)	3E8N	10.1158/0008-5472.CAN-09-0679
Quinasa MAP ERK1 (ERK1)	4QTB	10.1038/nchembio.1629
Receptor adrenérgico beta-1 quinasa 1 (GRK2)	5UUU	10.1021/acs.jmedchem.7b00443
Quinasa serina/treonina mTor	4JSV	10.1038/nature12122
Piruvato deshidrogenasa quinasa 1 (PDK1)	2Q8F	10.1016/j.str.2007.07.001
Glucógeno sintasa quinasa-3 beta (GSK3B)	3PUP	10.1021/ja1112996
Proteína ribosómica S6 quinasa 1 (RPS6K1)	6G77	10.1126/scitranslmed.aba4627
Receptor del factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF1R)	2ZM3	10.1016/j.bmcl.2008.04.044

Tabla 2: Tabla de estructuras tridimensionales seleccionadas para el acoplamiento molecular. De izquierda a derecha, Modelo 3D proteína, código de identificación PDB y DOI a la publicación reportada en PDB.

6.3.1. Identificación estructuras adicionales para comprobación de acoplamiento.

Para verificar los resultados más prometedores de los acoplamientos moleculares primarios, se seleccionaron estructuras adicionales para cada una de las 4 proteínas presentes en los mejores resultados (1 proteína por cada acoplamiento), estas se seleccionaron siguiendo los mismos criterios utilizados para las estructuras, de manera ideal. Se buscaba encontrar 3 estructuras adicionales por cada proteína, sin embargo, la disponibilidad en las bases de datos de estructuras que cumplieran los requisitos no permitió encontrar todas las estructuras para las 4 proteínas, por lo que para el caso de PI3K y ERK1, solo se utilizaron para la verificación las 2 estructuras

encontradas que cumplían los requisitos, sin embargo, es importante resaltar que su calidad en comparación con las primarias disminuyó.

Las 4 proteínas a las que se les buscaron más estructuras son las presentadas en la siguiente tabla:

Modelo 3D proteína	Código PDB	DOI
PI3-kinase p110-subunidad alfa (PI3K)	4L2Y	https://doi.org/10.2210/pdb4L2Y/pdb
	5SXE	https://doi.org/10.2210/pdb5SXE/pdb
Quinasa específica dual 1 (MAP2K1,2)	3ORN	https://doi.org/10.2210/pdb3ORN/pdb
	3PP1	https://doi.org/10.2210/pdb3PP1/pdb
	3V01	https://doi.org/10.2210/pdb3V01/pdb
Quinasa MAP ERK1 (ERK1)	2ZOQ	https://doi.org/10.2210/pdb2ZOQ/pdb
	6GES	https://doi.org/10.2210/pdb6GES/pdb
Receptor adrenérgico beta-1 quinasa 1 (GRK2)	3V5W	https://doi.org/10.2210/pdb3V5W/pdb
	4MK0	https://doi.org/10.2210/pdb4MK0/pdb
	3CIK	https://doi.org/10.2210/pdb3CIK/pdb

Tabla 3: Tabla de estructuras tridimensionales seleccionadas para los acoplamiento moleculares de verificación. De izquierda a derecha, Modelo 3D proteína, códigos de identificación PDB y DOI a la publicación reportada en PDB.

6.4. Acoplamiento molecular.

La preparación para el acoplamiento molecular incluyó la eliminación de ligandos existentes en las proteínas descargadas de la PDB. Sin embargo, se utilizó la opción de conservar ligandos similares estructuralmente como puntos de referencia para acoplamiento posteriores. La herramienta "Wizard" en la pestaña "GOLD" dentro de Hermes facilitó este proceso.

Una vez eliminados los ligandos adicionales en las estructuras, se comienza el proceso mediante el uso de la herramienta "Wizard" disponible en la pestaña "GOLD" dentro de Hermes que nos permitirá terminar de preparar la proteína para su posterior acoplamiento molecular (Figura 18).

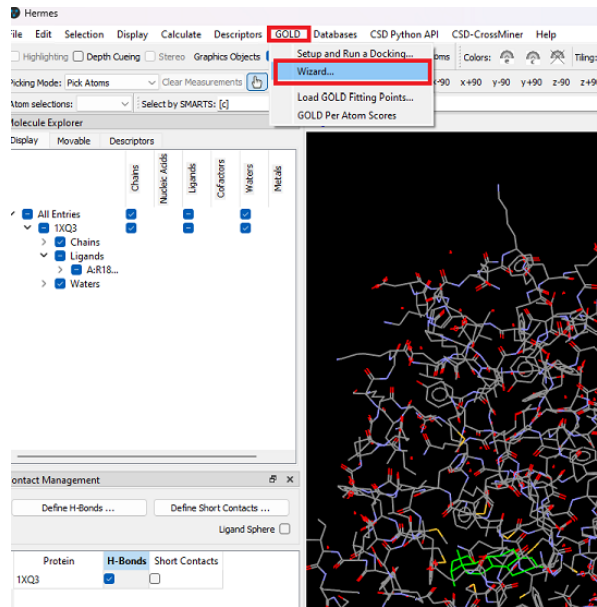


Figura 16: Proceso de apertura de la herramienta “Wizard” de “GOLD” a partir del software “Hermes” para continuar la preparación de la estructura 1XQ3 perteneciente a la proteína Receptor Androgénico.

La herramienta “Wizard” está diseñada para guiar al usuario por todo el proceso necesario para realizar la preparación y el posterior acoplamiento, una vez iniciada, debemos seleccionar la proteína ya abierta para continuar, posteriormente, nos permitirá borrar las moléculas de agua presentes en la proteína cristalizada, esto es de suma importancia ya que la presencia de aguas residuales, afecta las interacciones no covalentes que el ligando puede hacer en presencia de hidrógenos disponibles no correspondientes a la proteína.

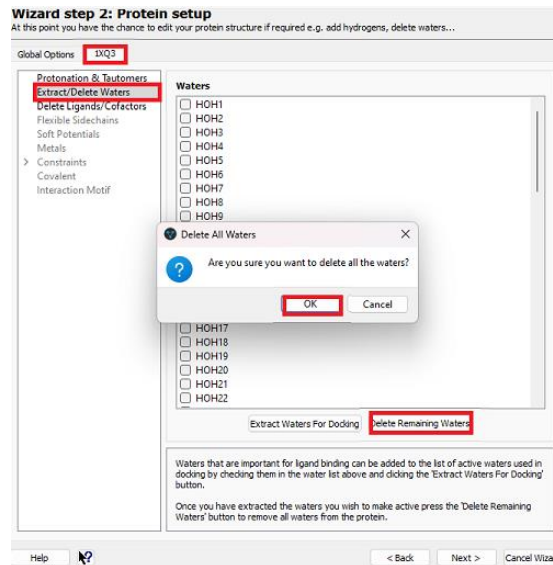


Figura 17: Extracción de aguas residuales de la estructura proteica.

Consecuentemente, debemos extraer el ligando existente, esto guarda el ligando en la misma carpeta en la que se encuentra en heteroesteroide y la proteína y deja las “huellas” del lugar en el que se encontraba anclado este ligando, por lo que, a partir de este punto, este sitio se encuentra libre para interactuar con el ligando.

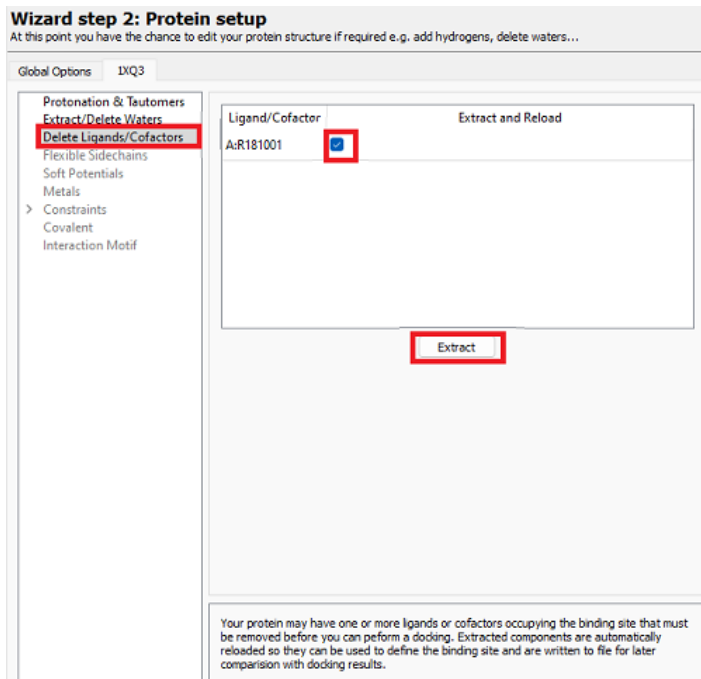


Figura 18: Extracción del ligando existente de la estructura proteica para el uso de sus coordenadas para iniciar el acoplamiento molecular.

Una vez extraído el ligando de la proteína, es necesario seleccionar el sitio del acoplamiento, GOLD permite la selección del sitio mediante 4 formas átomo de la proteína, que permite seleccionar un átomo en la proteína como punto de referencia, a partir de coordenadas XYZ, por medio de un ligando previo existente, o por medio de un átomo o un residuo específico.

En el caso de estos heteroesteroides, se optó por el uso de ligandos previos existentes en las proteínas para comenzar el acoplamiento en esa zona, debido a que el programa nos proporcionaba una mayor y mejor cantidad de resultados a partir de esta comparación. Sin embargo, para asegurar que el acoplamiento no se viera limitado a esta área, es necesario modificar el radio del espacio disponible para acoplar el ligando, en el cual el programa busca hacer el acoplamiento, en este caso en particular 30 Å, permitiendo así la detección de posibles sitios y modos de unión de ligandos peptídicos mediante el escaneo de toda la superficie de las proteínas diana (Hetényi & van der Spoel, 2006) .

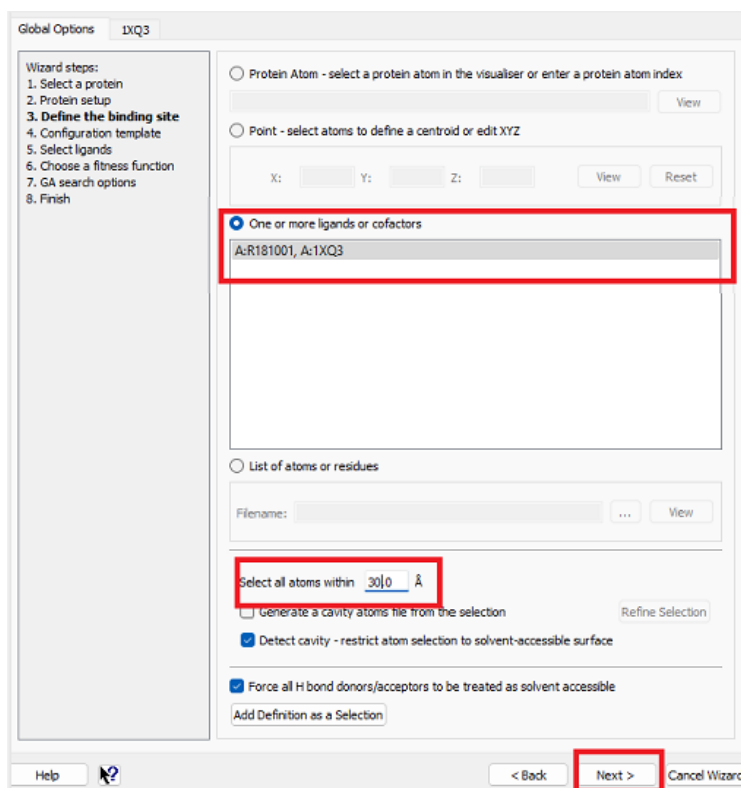


Figura 19: Definición del sitio de acoplamiento ciego a partir de un ligando existente.

Con el sitio de acoplamiento definido, se seleccionó una plantilla prediseñada por GOLD según el tipo de proteína. Por ejemplo, para el receptor androgénico, se eligió una plantilla diseñada para receptores nucleares de hormonas esteroideas.

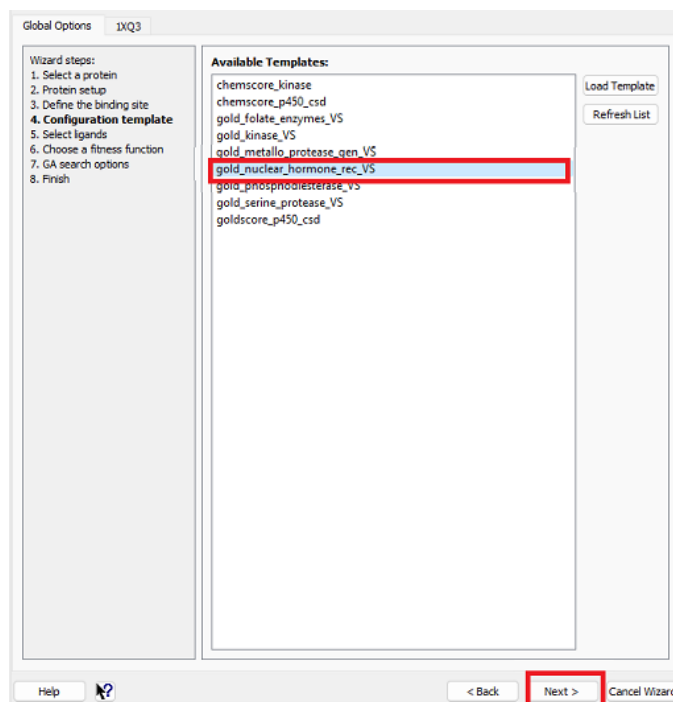


Figura 20: Selección de plantilla predeterminada de GOLD dependiendo el tipo de proteína a acoplar.

El quinto paso en el proceso consiste en finalmente cargar el ligando, en este caso el heteroesteroide, para lo que el programa nos mandará a nuestra carpeta de trabajo, donde previamente ya tenemos guardado el ligando, y lo seleccionamos para agregarlo al *software*.

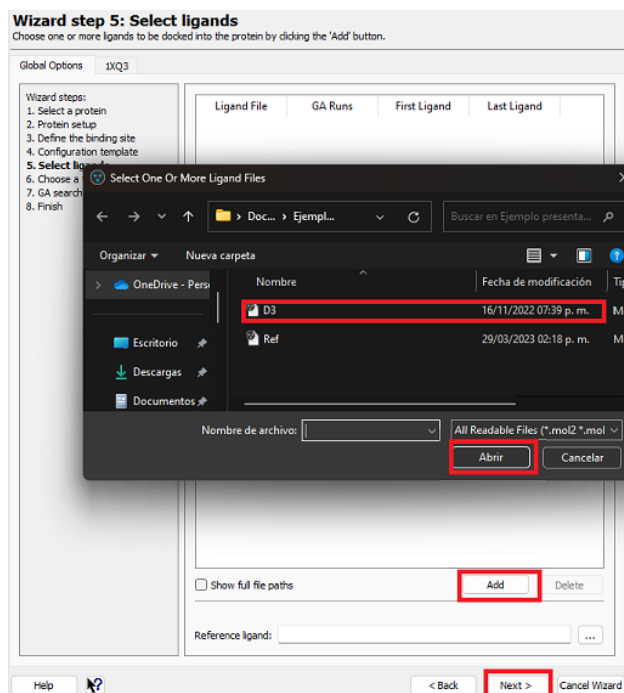


Figura 21: Selección del heteroesteroide como ligando a acoplar.

En resumen, este proceso detallado aseguró una preparación exhaustiva y cuidadosa de las estructuras para el acoplamiento molecular, estableciendo una base sólida para la investigación posterior.

Ahora es necesario seleccionar el algoritmo calificador que el programa utilizará para evaluar los resultados obtenidos. Dentro de esta opción, existen varios algoritmos; sin embargo, el CCDC siempre sugiere el uso de "*PLP Fitness*", definido por ellos mismos como su algoritmo más completo y mejor desarrollado. Por lo tanto, esta misma función calificadora se utilizó para todos los acoplamientos, buscando así uniformidad en los resultados. (Case: What is the difference between the GoldScore, ChemScore, ASP and ChemPLP scoring functions provided with GOLD? - The Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC), s/f).

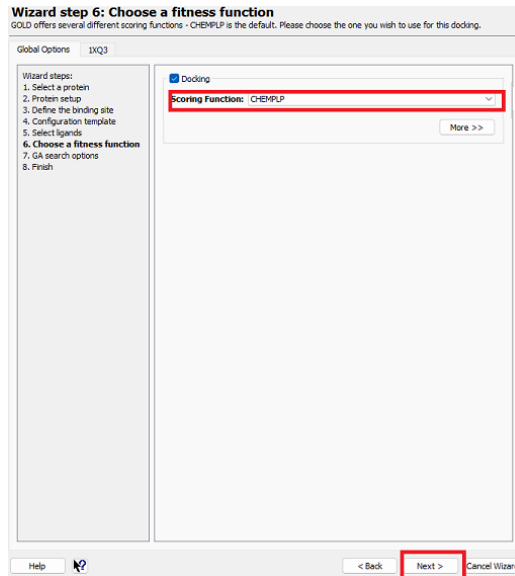


Figura 22: Selección del algoritmo calificador de acuerdo con las recomendaciones del CCDC.

El penúltimo paso para terminar la configuración del acoplamiento molecular es definir el tiempo que tomará el Algoritmo Genético (GA) en realizar todas las posibles operaciones (por ejemplo, cruce, migración, mutación). Este parámetro es clave para determinar la duración de una ejecución GOLD. Mientras mayor sea el tiempo de ejecución del algoritmo, más alta será la probabilidad de obtener mejores resultados. Por lo tanto, para todos los acoplamientos realizados, se seleccionó la opción "*Slow*" para permitir la obtención de resultados óptimos (Jones et al., 1997).

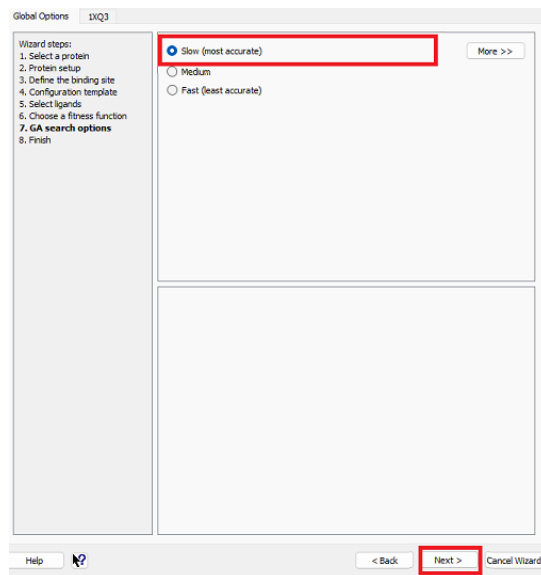


Figura 23: Selección de la opción de búsqueda del algoritmo genético a "Slow" para maximizar la certeza del acoplamiento molecular.

El último paso para comenzar el proceso del acoplamiento molecular es seleccionar la opción "Run GOLD". Finalmente, debemos seleccionar las opciones "GOLD conf file" y "Protein", lo cual nos permitirá guardar el archivo con los resultados del acoplamiento como un archivo independiente en la carpeta seleccionada. Posteriormente, debemos seleccionar "Save" (figura 24), y el programa comenzará a correr el acoplamiento molecular, mostrando el mensaje "Starting GOLD run". Una vez que termine de procesar toda la información, nos mostrará el mensaje "Finished GOLD run" y nos permitirá seleccionar "View Solutions", la opción con la cual el programa nos mostrará los resultados del acoplamiento molecular (figura 25).

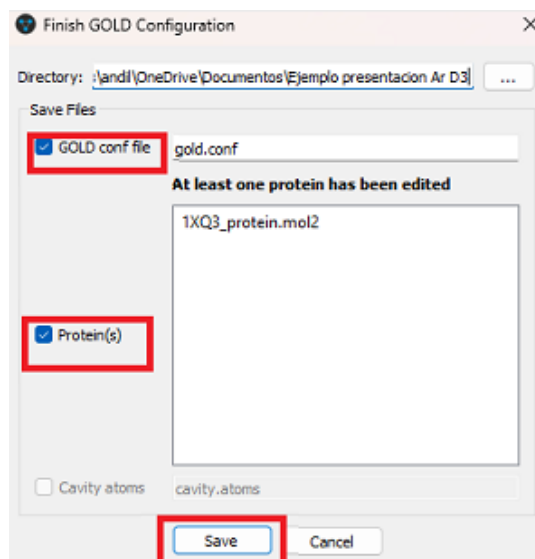


Figura 24: Finalización de la configuración de "Wizard" con las opciones seleccionadas para guardar el archivo con los resultados del acoplamiento molecular.

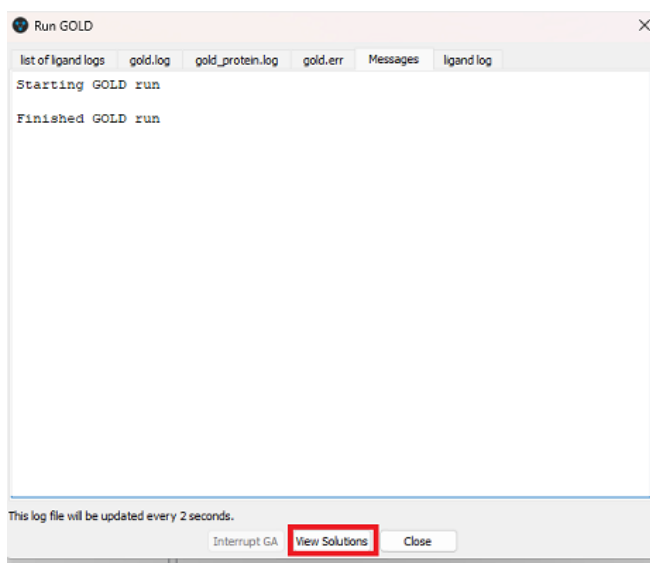


Figura 25: Ventana con mensajes de inicio y fin del proceso de acoplamiento molecular, con la opción "View Solutions" marcada para poder visualizar los resultados del acoplamiento molecular.

Una vez que el programa haya concluido con el acoplamiento, nos mostrará la ventana de "Hermes" cargada con nuestra proteína diana y, cuando existen, los 10 mejores resultados del acoplamiento molecular ordenados de acuerdo con la función

6.4.1. Características de los puentes de hidrógeno.

De acuerdo con el manual de usuario de GOLD, disponible en la página web del CCDC, los parámetros que el programa considera para mostrar los puentes de hidrógeno son los que se muestran en la tabla 3, sin embargo, de acuerdo con (Jeffrey, 1997) las características generales de un puente de hidrógeno varían ligeramente con respecto a lo que GOLD utiliza como parámetros para determinar si muestra o no puentes de hidrógeno (tabla 4), por lo tanto se decidió tomar en cuenta ambos parámetros para seleccionar al mejor acoplamiento de la lista de todos los candidatos, es decir, para su selección final como mejores candidatos se utilizaron 3 filtros principales; PLP Fitness, el número de puentes de hidrógeno y las distancias y ángulos de los puentes existentes en el acoplamiento.

Parámetros Distancia D-H-A GOLD	
Características enlace	Valor Predeterminado (Å)
La distancia ideal hidrógeno-aceptor(H-A).	1.85
Ventana de tolerancia para enlace ideal.	1.60-2.1
Mínima distancia para considerar PH.	1.2
Máxima distancia para considerar PH.	2.5

Tabla 4: Características de los enlaces PH considerados dentro de los parámetros de GOLD. (Jones et al., 1997)

Parámetros PH Según Jeffrey			
Tipo de Interacción D-H-A	Covalente	Mayormente electroestático	Electroestático
Clasificación	Fuertes	Moderados	Débiles
Longitud del enlace (Å) (H-A)	1.2-1.5	1.5-2.2	2.2-3.2
Ángulos (°)	175-180	130-174	90-150
Energía de Enlace (kcal * mol⁻¹)	14-40	04-15	<4
Frecuencia de vibración IR (% de variación relativa)	25%	10-25%	10%

Tabla 5: Parámetros en los PH según Jeffrey. Tabla modificada de (Jeffrey, 1997).

Pese, aunque los parámetros de Jeffrey son hoy en día los más citados y utilizados, un estudio más reciente en el cual se analizaron las preferencias geométricas de 68,726 puentes de hidrógeno pertenecientes a 33,000 estructuras de la Base de Datos estructurales de Cambridge (CSD). Los autores concluyen que, en todos los casos estudiados, un cambio del ángulo D-H/A de 180° a 120° reduce la energía absoluta del enlace de hidrogeno menos de 5 KJmol^{-1} , por lo que no cuenta con la energía suficiente para ser estable. En realidad, los autores sugieren que es más sensato incluir interacciones con distancias más largas, que incluir ángulos inferiores a 120° debido a que la caída de la energía con la distancia es menor que con el ángulo (Wood et al., 2009).

Gracias a todos los estudios y parámetros revisados para este trabajo se tomó la decisión de dar prioridad a ángulos mayormente electroestáticos, con un ángulo entre 130° y 175° y una distancia entre 1.5 y 2.2 Å. Esto sin descartar el resto de las variables, pero dando una mayor importancia al ángulo que a la distancia, ya que en el caso específico de los complejos proteínas-ligando, los enlaces PH de tipo “covalente” generarían en su mayoría un complejo irreversible.

6.5. Análisis de los mejores 11 mejores acoplamientos.

Gracias a GOLD se obtuvieron en promedio 130 acoplamientos diferentes que fueron revisados manualmente dentro del mismo software, todo esto de acuerdo con los parámetros provistos únicamente por el CCDC hasta este punto, esto hasta lograr obtener los mejores 11 resultados, un acoplamiento para cada par proteína-ligando.

Estas 11 estructuras primarias se descargaron de GOLD mediante la opción "Export Complex" (Figura 27) para luego introducirlas en otro software llamado Discovery Studio. Discovery Studio es un visualizador molecular de interacciones proteicas que nos permite identificar puentes de hidrógeno y otras interacciones covalentes que

GOLD no permite visualizar, como PH donde el grupo donador es un C-H, puentes disulfuro, enlaces alquilo o pi-alquilo.

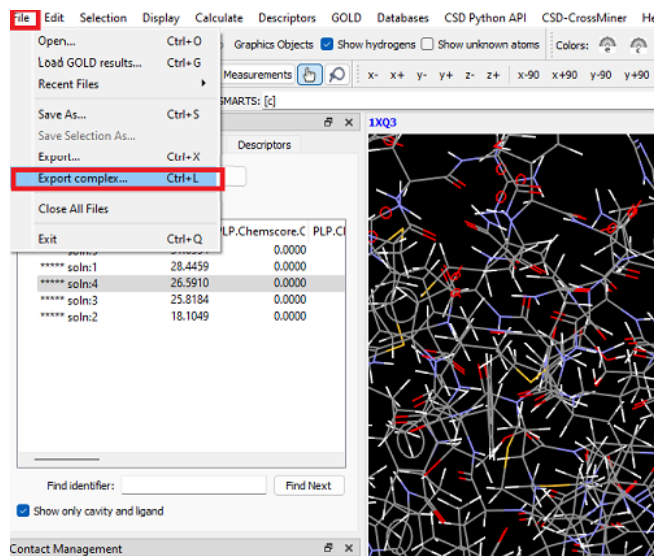


Figura 27: Proceso de exportación del mejor resultado por medio de la opción "Export Complex" en GOLD para su posterior análisis en Discovery Studio.

Una vez que el complejo proteína-ligando se ha descargado y se lleva a Discovery Studio, se abre el programa y, desde la pestaña "file", se selecciona la opción "Open" para abrir el complejo a estudiar. En este caso, se dará seguimiento a la solución 4 de la interacción entre el RA con clave de la PDB 1XQ3 y D3. Esta solución tiene un PLP Fitness de 26.5910 y cuenta con 4 puentes de hidrógeno (Dassault Systèmes, 2020).

La primera pantalla que muestra el software es una representación de cintas de la proteína junto con el ligando, pero no se muestran las interacciones (figura 28). Para visualizar esta información, es necesario seleccionar el ligando en "Ligand Groups", elegir la opción "Define ligand" y luego hacer clic en "Ligand Interactions". Esto nos dará una vista básica del ligando con los contactos existentes entre el complejo (figura 29).



Figura 28: Visualización preliminar del complejo proteína-ligando, con las opciones que se deben seleccionar dentro de la interfaz para poder visualizar las interacciones existentes.

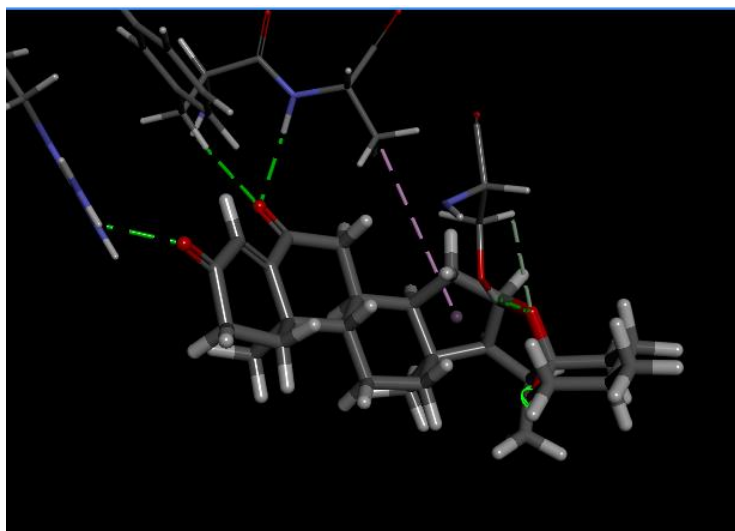


Figura 29: Visualización básica de los contactos existentes entre la proteína diana y el ligando D3, interacciones marcadas con líneas punteadas de diferentes colores, verde para puentes de hidrógeno, rosa para enlaces alquilo o pi-alquilo y verde claro para PH C-H.

Una vez que las interacciones se presentan como líneas punteadas, Discovery Studio permite colocar etiquetas en las interacciones, así como la distancia calculada para cada una. Para esto, hay que seleccionar las opciones "show distances" y "show types" en el menú lateral, lo cual desplegará estos valores para cada enlace presente (figura 30).

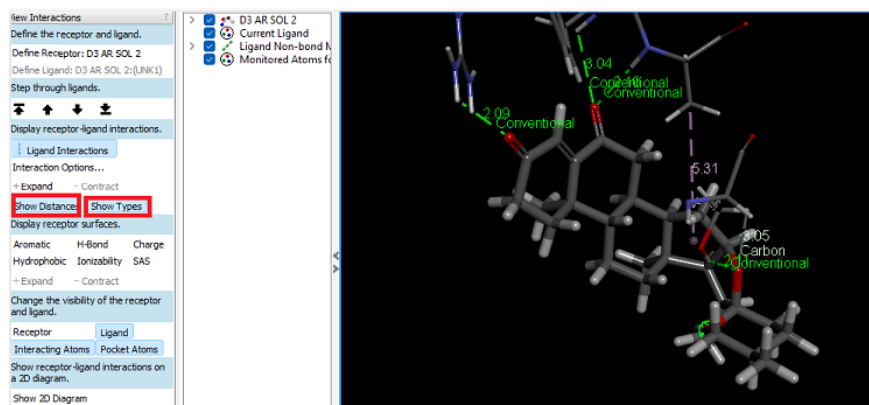


Figura 30: Selección de las opciones "show distances" y "show types" en la barra de herramientas lateral para poder visualizar en el modelo tridimensional el tipo de enlace y la distancia entre ambos.

Finalmente, para analizar los resultados de manera eficiente, la herramienta también permite la creación de una imagen 2D en la que la proteína se muestra simplificada, facilitando su visualización. Esto se logra a través de la creación de una imagen precisa, mostrando el aminoácido exacto en el cual el ligando se acopló a la proteína en cada interacción (figura 31).

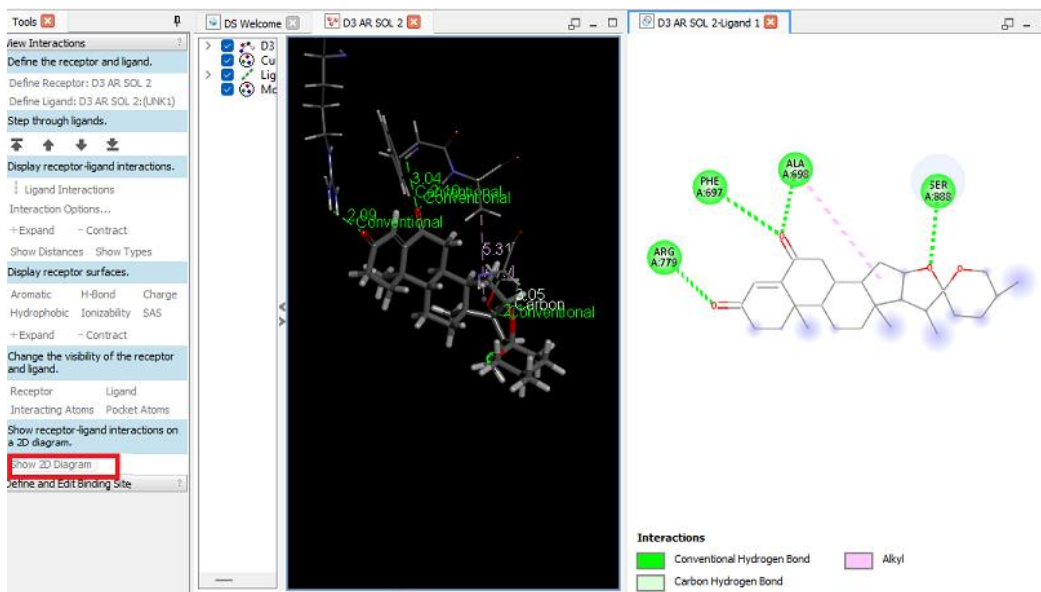


Figura 31: Selección de presentación del diagrama 2D en la barra de herramientas lateral, del lado derecho podemos observar el diagrama presentado con todas las interacciones clasificadas y los aminoácidos presentes en cada interacción.

Esta metodología se repitió para cada heteroesteroide y cada acoplamiento molecular realizado en este estudio, incluidos los acoplamientos realizados como parte de la verificación. Los resultados obtenidos en cada acoplamiento se revisaron manualmente y se seleccionó un resultado por cada acoplamiento para su estudio en Discovery Studio, siguiendo los criterios previamente mencionados. Estos resultados se presentan en la tabla 8, que especifica el PLP fitness, así como todas las interacciones presentes con sus distancias en Ångströms (puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas e interacciones desfavorables).

CAPÍTULO 4.

7. RESULTADOS

7.1. Resultados del estudio previo.

De acuerdo con los resultados obtenidos en una investigación anterior, en la cual se evaluaron los códigos SMILES de los heteroesteroides en programas quimio informáticos y bases de datos existentes para comprobar su posible afinidad con las proteínas blanco, y se realizaron pruebas *in vivo* en cultivos celulares de músculo esquelético humano AMB, lograron obtener las posibles mejores proteínas diana para cada heteroesteroide (tabla 6) y las dosis propuestas para las pruebas *in vivo* (tabla 7)(Pérez, 2022). Gracias a esto finalmente, las interacciones con mejores resultados fueron las que se comprobaron por medio de acoplamiento molecular (tabla 1).

Compuestos	Interacción
S1	Receptor de IGF, GSK3B, inhibidor de la proteasa, agonista de testosterona, anabólico y estimulante de crecimiento.
D3	Receptor androgénico, agonista de testosterona, anabólico y estimulante del crecimiento.
D5	Receptor de IGF, GRK 3B, anabólico y estimulante del crecimiento
D7	mTOR, PDK, proteína ribosomal S6, ligando del receptor nuclear, inhibidor de la proteasa, anabólico y estimulante de crecimiento.
D8	PI3K, MAPK ERK, ligando de receptor nuclear, inhibido de la proteasa, agonista de testosterona, anabólico y estimulante del crecimiento
D13	Receptor de IGF, mTOR, GSK3B, tratamiento distrofia muscular, agonista de testosterona, anabólico y estimulante de crecimiento.

Tabla 6: Resultados de la comparación quimioinformáticas de los heteroesteroides para definir las posibles proteínas diana de acuerdo con las interacciones presentadas. Modificada de (Pérez, 2022).

Hipótesis	Dosis simulada con efecto deseado (μM)	Dosis propuesta a usar en experimentación <i>in vitro</i> (μM)	Compuesto a usar
1	0.1,1,10	0.1-1	D13,D3
2	Ninguno	Eliminar	D8
3	Se iguala con 10	1 a 10	D7, D13
4	0.1,1,10	1.1-1	S1,D5,D13
5	10	1 a 10	S1, D3,D5
6	10	1 a 10	D7, D13
7	1,10	1 a 10	D8

Tabla 7: Tabla final de dosis propuestas para la experimentación *in vitro* con los resultados de la simulación de las dosis, y el compuesto a utilizar. Tomada de (Pérez, 2022).

7.2. Resultados de acoplamiento de las 16 interacciones propuestas.

Fue a partir de los datos experimentales mencionados en la sección anterior que se realizaron los 16 acoplamientos mostrados en la tabla 1, cada acoplamiento nos dio en promedio 8 resultados de los cuales se seleccionó, mediante los criterios previamente mencionados, 1 resultado de cada acoplamiento para su estudio en Discovery Studio, estos son los acoplamientos que se muestran en la tabla a continuación (tabla 8), en ella se especifica el PLP fitness, así como todas las interacciones presentes con sus distancias en Ångströms (puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas e interacciones desfavorables).

Heteroesteeroide	Proteína	PLP Fitness	Puentes de Hidrógeno (Distancia Å)	Hidrofóbica (distancia Å)	Desfavorable (Distancia Å)
S1	Citocromo P450 19A1 (CYP19A1)	48.1559	Met 374 (2.97), Cys 437 (2.38), Ala 438 (2.83).	Alquilo Ala 306 (4.17), alquilo Ala 306 (4.27), alquilo Ala 306 (2.77), alquilo Leu 152 (5.41), alquilo Met 303 (3.93), pi alquilo Phe 148 (3.97), alquilo Val 370 (4.55), alquilo Val 370 (5.41).	NA
S1	Glucógeno sintasa quinasa-3 beta (GSK3B)	39.9895	Ser 147 (2.60), Tyr 221 (2.10), PH C-H ASP 260 (1.67).	Alquilo Arg 220 (3.76), alquilo Arg 220 (4.33), alquilo Arg B 220 (3.27), alquilo Arg A 220 (3.73), alquilo ArgA 220 (4.45), pi alquilo Tyr 221 (3.65), pi alquilo Tyr 221 (4.99), pi Alquilo Tyr 221 (5.18), pi alquilo Tyr 221 (5.18), alquilo Tyr 140 (5.27), alquilo Pro 255 (5.20).	NA
S1	Receptor del factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF1R)	43.7988	0	Alquilo Ala 1105 (3.79), alquilo Ala (3.91), pi alquilo Phe 1147 (4.42).	NA
S1	Receptor adrenérgico beta-1 (GRK2)	34.4009	His 185 (2.04), Hist 185 (1.83).	Alquilo Pro 510 (4.67).	NA
D3	Receptor Androgénico (AR)	29.968	Ser 888 (2.11), Ala 698 (2.10), Phe 697 (3.04), Arg 779 (2.09), PH C-H Ser 888 (3.05).	Alquilo Ala 698 (5.31).	NA
D3	Citocromo P450 19A1 (CYP19A1)	44.7867	Gly 439 (2.11), enlace CH Gly 439 (2.57), PH C-H Met 308 (2.58).	Pi Alquilo TRP 224 (3.54), pi alquilo TRP 224 (4.15), alquilo Val 370 (5.40), alquilo Val 370 (5.04), alquilo Cys437 (4.53), alquilo Cys 437 (4.75), alquilo Cys437 (5.07), alquilo Ile 132 (4.97), alquilo Ala 438 (3.57), alquilo Val 373 (4.02), pi alquilo Phe 134 (5.34).	Leu 477 (0.82), Ile 133 (1.72), Ile 133 (4.47), Ile 133 (1.47)
D3	Receptor del factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF1R)	45.6485	Tyr 1280 (1.89), Lys 1267 (2.20), PH C-H Ser 1282 (2.60).	Pi alquilo Tyr 1281 (5.15), pi Alquilo Tyr 1281 (4.22), alquilo Lys 1019 (4.13), alquilo Pro 1026 (4.81), alquilo Pro 1026 (4.72).	NA
D5	Glucógeno sintasa quinasa-3 beta (GSK3B)	30.1902	Tyr 140 (1.87), Arg 144 (1.99), Arg 144 PH C-H (2.88).	Pi alquilo Tyr 140 (5.29), pi alquilo Tyr 221 (5.29), alquilo Pro 184 (4.59), ai alquilo Tyr 222 (4.65), alquilo Lys 183 (3.90).	NA
D5	Receptor del factor de crecimiento similar a la	42.4944	Lys 1111 (2.05), enlace C-H Lys 1111 (2.21), PH C-H Tyr 1090 (2.45).	alquilo Lys 1111 (4.04), alquilo Lys 1111 (4.04), alquilo Met 1115 (3.53), alquilo Pro 1107 (3.78), alquilo Pro 1107 (4.80), alquilo Leu 109 (5.34), pi alquilo Phe 1147 (5.29), pi alquilo Phe 1147 (4.64), alquilo Leu 1104 (4.89), alquilo Ala 1105 (3.19), alquilo Ala 1105 (4.19).	NA

	insulina 1 (IGF1R)				
D7	Quinasa serina/treonina Mtor (mTor)	24.9488	Lys 1788 (1.72), Glu 2408 (2.06).	Pi alquilo Trp 1786 (4.58), alquilo Arg 1749 (5.48), alquilo Arg 1749 (3.80).	NA
D7	Piruvato deshidrogenasa quinasa 1 (PDK1)	42.3023	Gly 356 (2.10) Tyr 365 (2.11), PH C-H (2.91).	Alquilo Pro-154 (4.25), alquilo Pro 154 (5.16), alquilo Ile 153 (4.16), alquilo 153 (4.12), pi alquilo Phe 278 (4.12), pi alquilo Phe (4.98).	NA
D7	Proteína ribosómica S6 quinasa 1 (RPS6K1)	40.3685	Glu A:63 (2.40), Lys A:137(2.97), Lys A:137 (2.10), PH C-H Glu 63 (2.37).	Pi alquilo His 211 (5.29), alquilo Lys A:137 (4.82), alquilo Lys A:137 (4.83), alquilo Ile B:209 (3.66), alquilo Ile B:209 (4.10).	NA
D8	PI3K alfa	40.5228	Asp 933 (2.09), Lys118.01 (2.23), Ser 774 (1.85).	Alquilo Met 772 (4.45), alquilo Met 772 (5.03), alquilo Ile 932 (5.31), alquilo ILE 932 (5.26), alquilo Ile 848 (4.92).	NA
D8	Quinasa específica dual 1 (MAP2K1,2)	31.9361	Glu 225 (2.13), Lys 156 (1.80) Arg 227 (1.75).	Alquilo Arg 260 (4.50), alquilo Leu 155 (4.73), Pro 307 (4.17), alquilo Lys156 (4.63).	NA
D8	Quinasa MAP ERK1 (ERK1)	41.567	Arg 94 (1.83) His 167 (1.61), Glu 343 (143.17), Arg 96 (2.46).	Alquilo Pro 340 (4.14), alquilo Pro 340 (5.15), alquilo Pro 340 (3.23), pi alquilo His 97(4.29), alquilo Arg 96 (5.49).	NA
D8	Receptor adrenérgico beta-1 quinasa 1 (GRK2)	32.801	Arg 516 (1.97), Arg 516 (2.92), Lys 215 (2.68).	alquilo Pro 252 (5.28).	NA

Tabla 8: Resultado de los 16 mejores acoplamientos con PLP fitness, e interacciones presentes con distancia en Å.

A continuación, se presentan los diagramas 2D obtenidos a partir de Discovery Studio de los 16 mejores candidatos de las interacciones presentes (figuras 32 a 48).

7.2.1. S1- Citocromo P450 19A1 (CYP19A1)

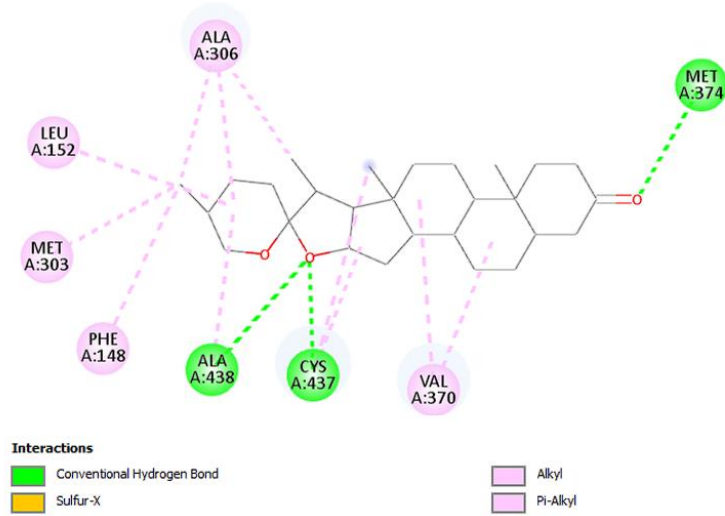


Figura 32: Diagrama 2D interacción

7.2.2. S1- Glucógeno sintasa Cinasa-3 beta (GSK3B).

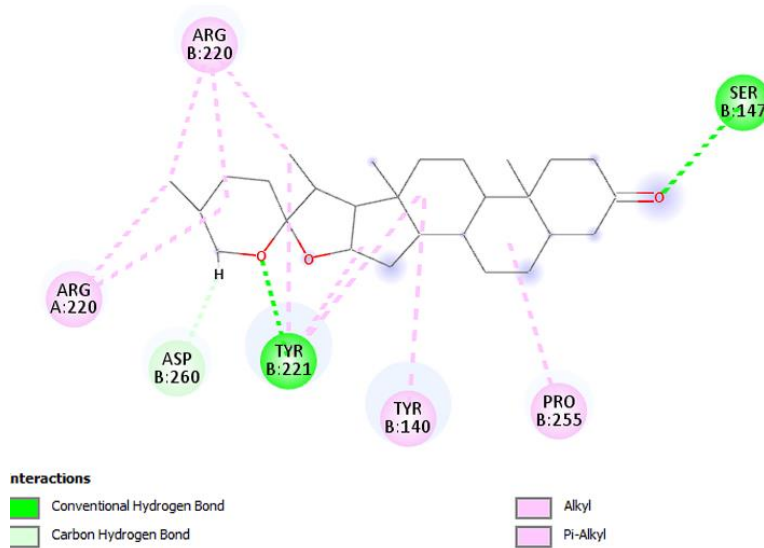


Figura 33: Diagrama 2D interacción S1- GSK3B.

7.2.3. S1- Receptor del factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF1R).

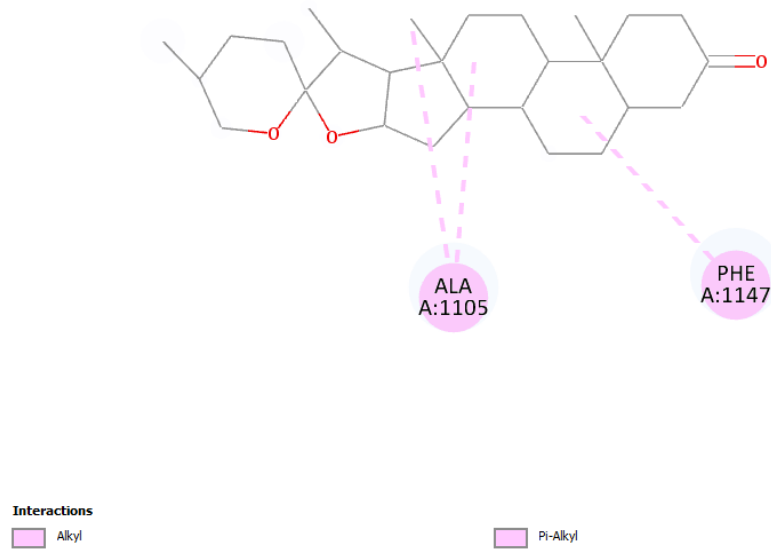


Figura 34: Diagrama 2D interacción S1-IGF1R.

7.2.4. S1- Receptor adrenérgico beta-1 (GRK2).

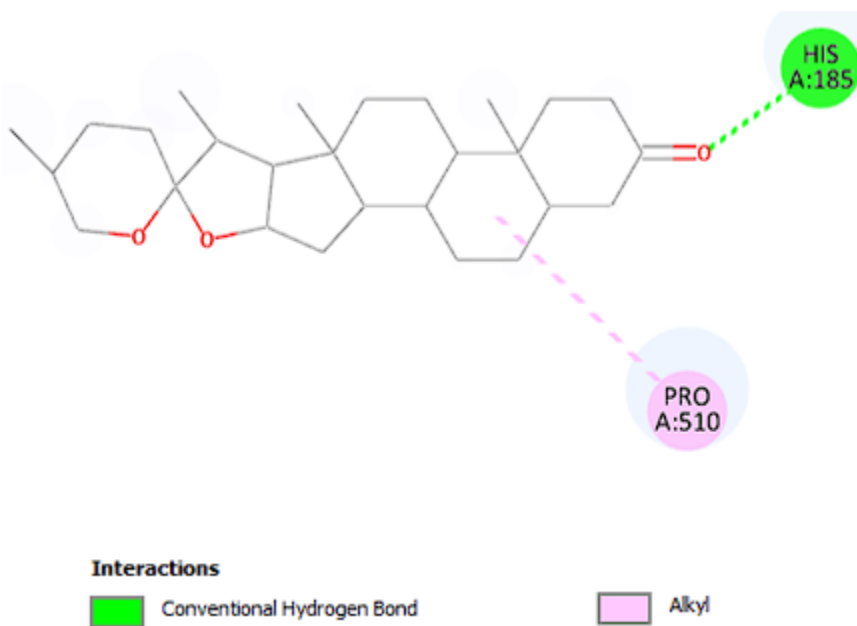


Figura 35: Diagrama 2D interacción S1- GRK2

En esta figura en particular, el Diagrama 2D solo nos permite visualizar un puente de hidrógeno, pero en realidad hay 2 anclados a la misma Histidina A:185, por lo cual, se adjunta la imagen tridimensional a continuación para su mejor visualización.

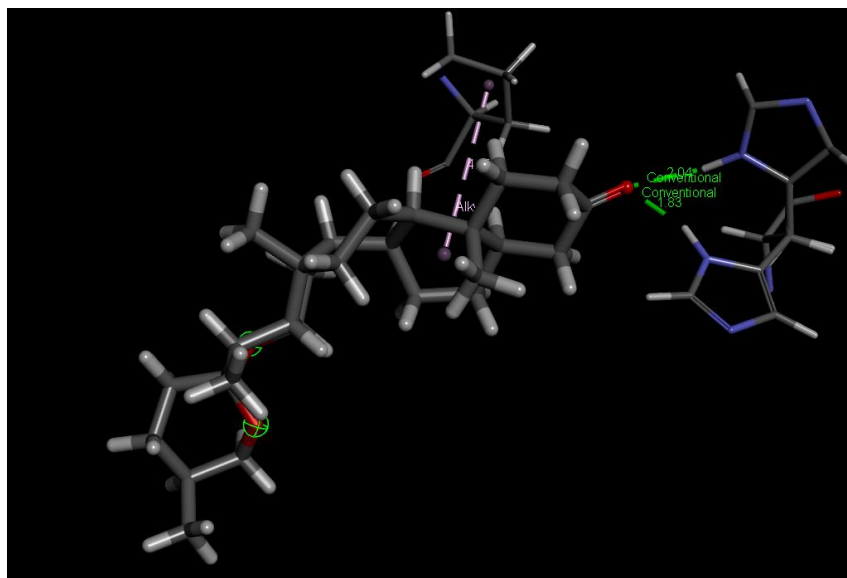


Figura 36: Imagen 2D interacción S1-GRK2, en el que se observan ambos puentes de hidrógeno unidos a la Histidina 185 de la cadena A de la proteína, el enlace superior tiene una distancia de 2.04 Å, y el inferior 1.83 Å.

7.2.5. D3 - Receptor Androgénico (AR)

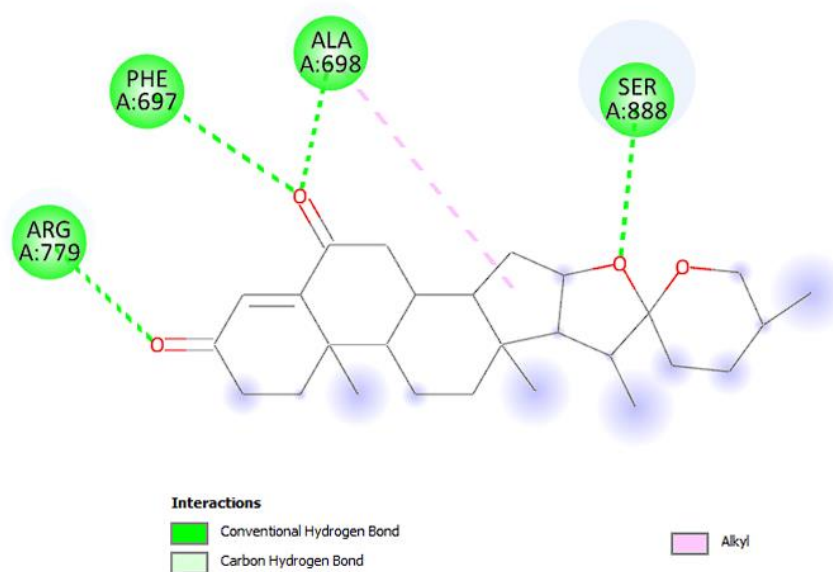


Figura 37: Diagrama 2D interacción D3- AR.

7.2.6. D3 - Citocromo P450 19A1 (CYP19A1).

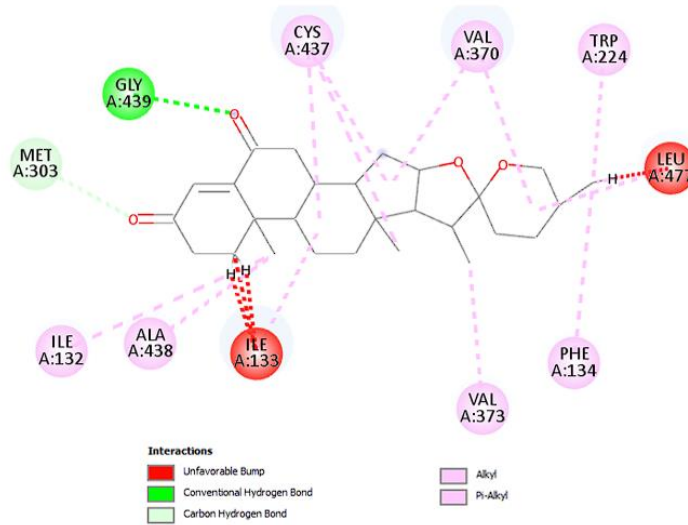


Figura 38: Diagrama 2D interacción D3- CYP19A1 con interacciones negativas en Leu A:477 y Ile A:133.

7.2.7. D3 - Receptor del factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF1R)

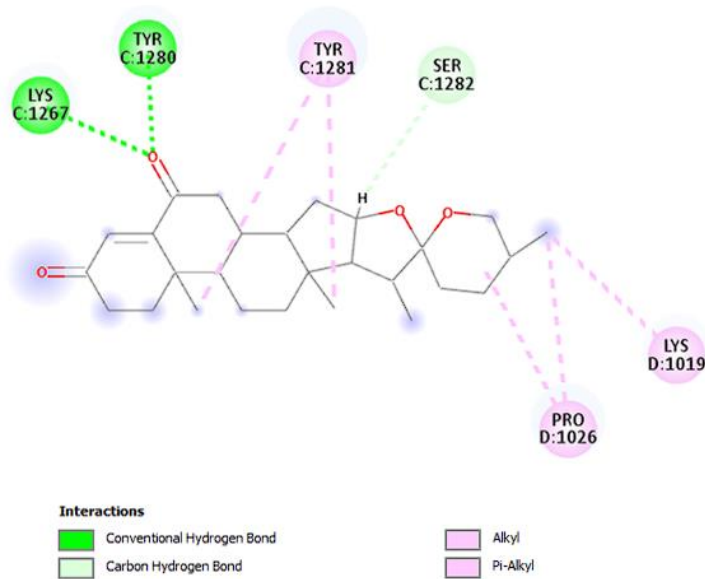


Figura 39: Diagrama 2D interacción D3- IGF1R.

7.2.8. D5 - Glucógeno sintasa quinasa-3 beta (GSK3B).

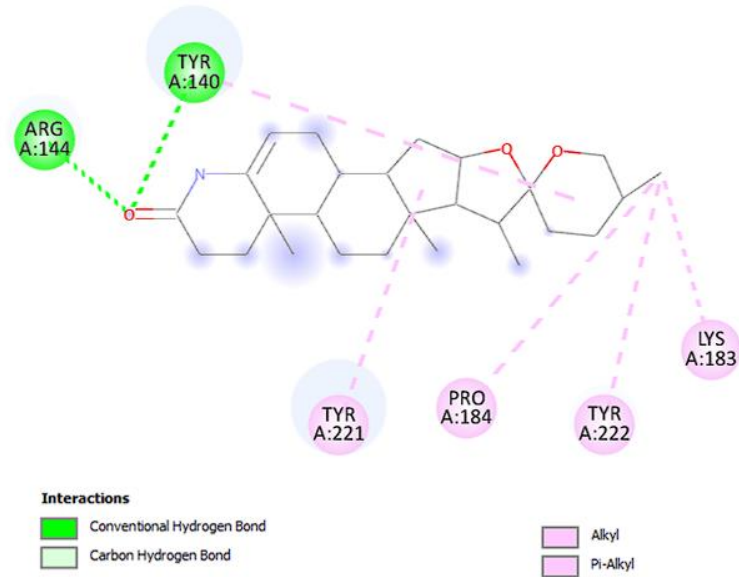


Figura 40: Diagrama 2D interacción D5- GSK3B.

7.2.9. D5 - Receptor del factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF1R).

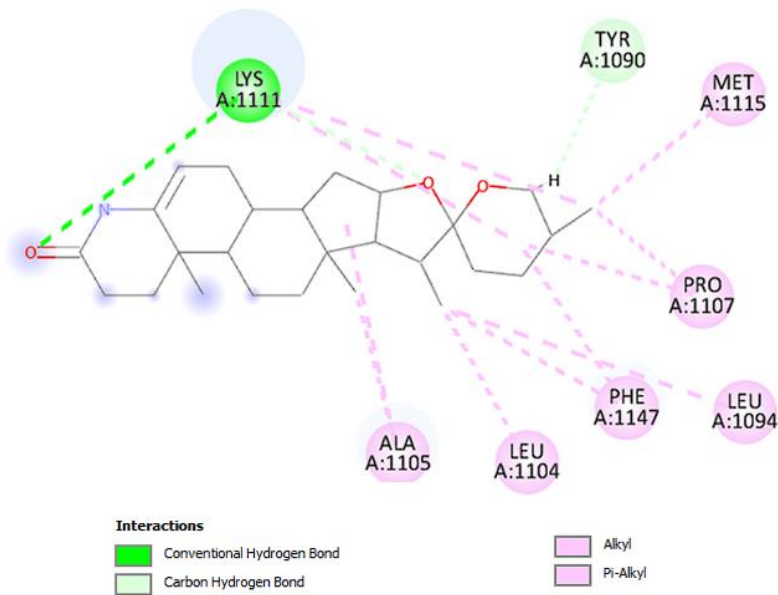


Figura 41: Diagrama 2D interacción D5- IGF1R.

7.2.10. D7 - Quinasa serina/treonina mTor (mTor)

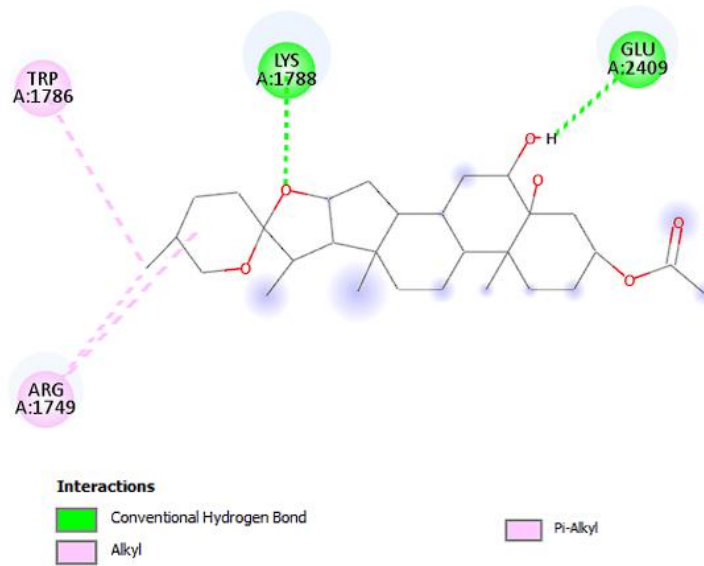


Figura 42: Diagrama 2D interacción D7-mTOR.

7.2.11. D7 - Piruvato deshidrogenasa quinasa 1 (PDK1).

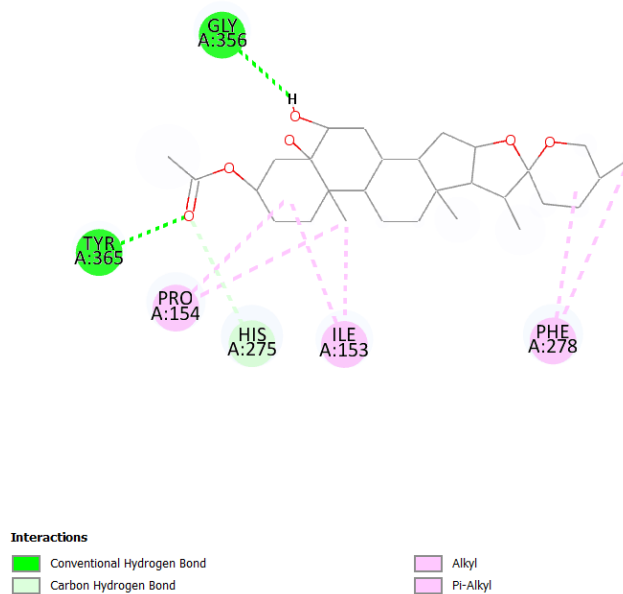


Figura 43: Diagrama 2D interacción D7-PDK1.

7.2.12. D7 - Proteína ribosómica S6 quinasa 1 (RPS6K1).

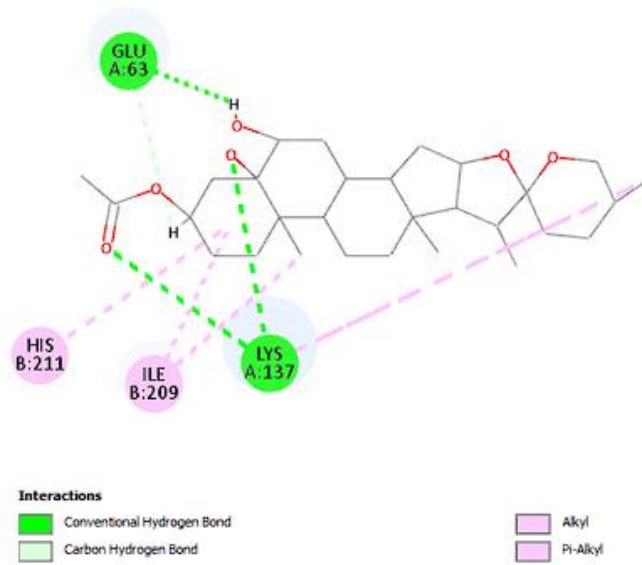


Figura 44: Diagrama 2D interacción D7- RPS6K1, 1 enlace, de la Lys A:137 y el enlace Glu A:63 tienen ángulos de 100.9° y 109.21° por lo tanto son despreciables.

7.2.13. D8 - PI3K alfa.

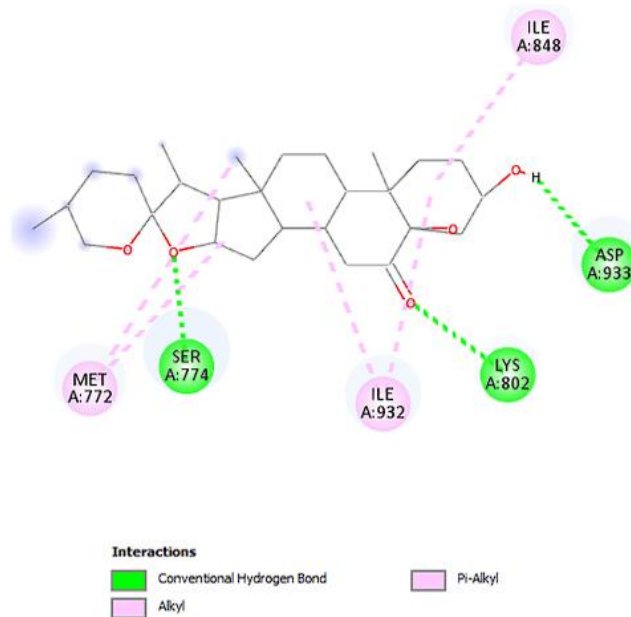


Figura 45: Diagrama 2D interacción D8-PI3K.

7.2.14 D8 – Quinasa específica dual 1 (MAP2K1,2)

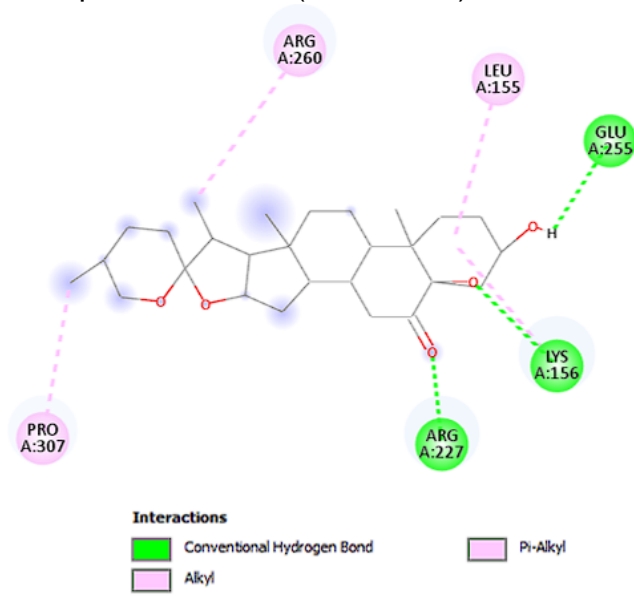


Figura 46: Diagrama 2D interacción D8- MAP2K1,2.

7.2.15. D8 – Quinasa MAP ERK1 (ERK1)

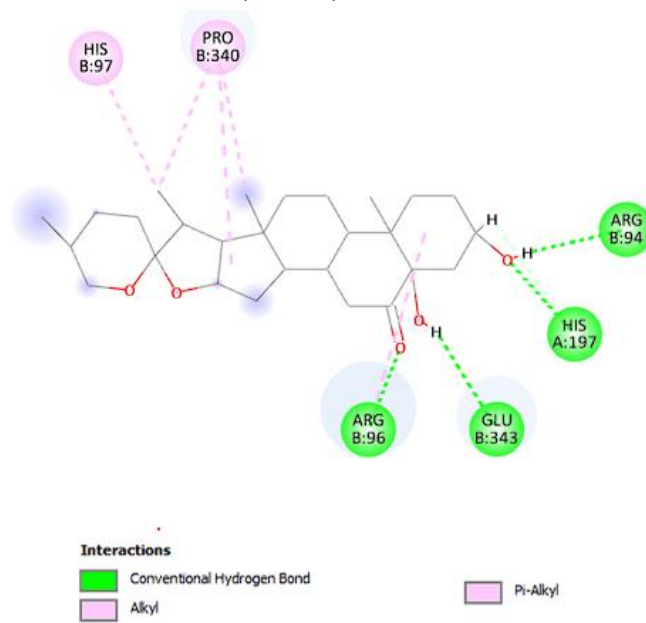


Figura 47: Diagrama 2D interacción D8-ERK1

7.2.16. D8 - Receptor adrenérgico beta-1 quinasa 1 (GRK2).

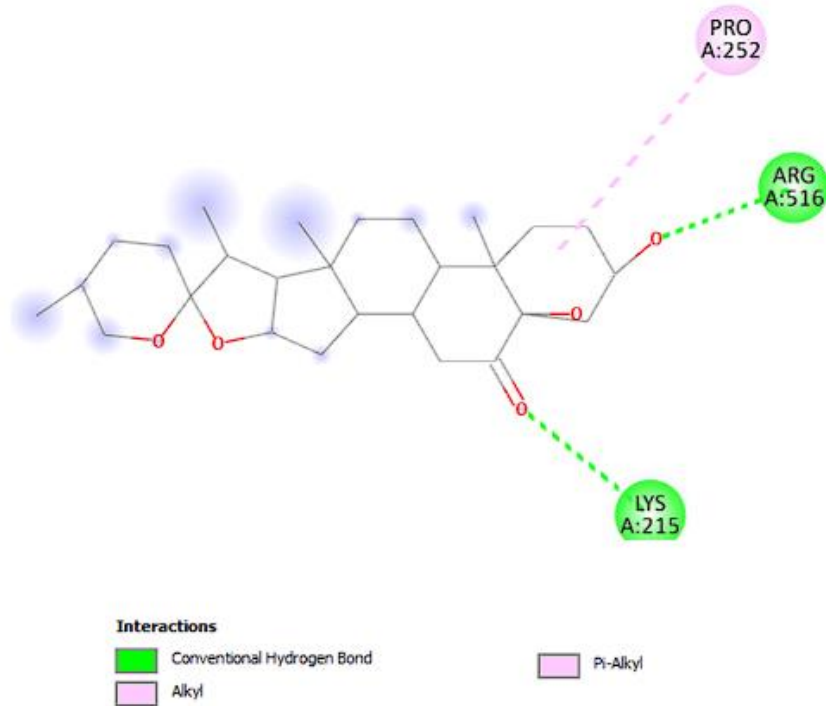


Figura 48: Diagrama 2D interacción D8-GRK2.

Todos los resultados previos fueron analizados previamente en GOLD para verificar los ángulos de los puentes de hidrógeno, ya que se tomó como criterio que los ángulos deben tener entre 90° y 180° para considerarse viables, siendo de $90-120^\circ$ muy débiles, entre 121° y 149° puentes buenos, y entre 150° y 180° ideales (Baker & Hubbard, 1984), por lo tanto los mejores resultados seleccionados fueron ultimadamente solo por los criterios en los puentes de hidrógeno, buscando que al menos existan 2 puentes de hidrógeno viables, reforzados con interacciones hidrofóbicas, las tablas con los 3 mejores resultados se muestran a continuación.

7.3. Resultados más prometedores.

7.3.1 D8-ERK1.

Puente de Hidrógeno	Ángulo	Distancia (Å)
ARG B:94	163.7°	1.83
HIS A:167	136.1°	1.61
GLU B: 343	143.1°	2.14
ARG B:96	143.5°	2.46

Tabla 9: Análisis de puentes de hidrógeno del complejo D8-ERK1. En orden descendente, el primer puente es ideal, el segundo, tercero y cuarto son buenos, esto reforzado por 5 interacciones hidrofóbicas (Figura 47).

7.3.2. D8-PI3K.

Puente de Hidrógeno	Ángulo	Distancia (Å)
ASP A:933	171.5°	2.09
LYS A:802	118°	2.32
SER A: 774	137.4°	1.85

Tabla 10: Análisis de puentes de hidrógeno del complejo D8-PI3K. En orden descendente el primer enlace es ideal, el segundo es viable y el tercero es considerado bueno, esto reforzado por 5 interacciones hidrofóbicas, (Figura 45).

7.3.3. D8-MAP2K1.

Puente de Hidrógeno	Ángulo	Distancia (A)
GLU A:225	154.5°	2.13
LYS A:156	140.2°	1.80
ARG A:227	122.7°	1.75

Tabla 11: Análisis de puentes de hidrógeno del complejo D8-MAP2K1. En orden descendente el primer enlace es ideal, el segundo y el tercero son buenos viables, eso reforzado por 4 interacciones hidrofóbicas (Figura 46).

A partir de estos resultados, como se comentó anteriormente, se realizaron acoplamientos con distintas claves de la PDB de las mismas proteínas (tabla 3), los resultados de estos acoplamientos se revisaron con los mismos criterios que en los acoplamientos principales y a continuación se presentan las tablas para comparar sus puentes de hidrógeno con los aminoácidos consistentes marcados en rojo.

7.3.4. D8 -ERK1 COMPARACIÓN

DOCKING PRINCIPAL (4QTB)			SEGUNDO DOCKING (2ZOQ)			TERCER DOCKING (6GES)		
Puente de Hidrogeno	Angulo	Distancia (A)	Puente de Hidrogeno	Angulo	Distancia (A)	Puente de Hidrogeno	Angulo	Distancia (A)
ARG B:94	163.7°	1.83	TYR A:156	128.3°	1.78	ARG B:94	164.7°	1.60
HIS A:167	136.1°	1.61	GLU A:343	108.2°	2.10	GLU B: 343	134.8°	2.37
GLU B: 343	143.1°	2.14	HIS B: 197	113.14°	2.68	TYR B: 156	172.8°	1.71
ARG B:96	143.5°	2.46					100.9°	2.13
						C-H ALA B: 342	78.1°	2.68

Tabla 12: Comparación acoplamientos D8-ERK1. De izquierda a derecha, acoplamiento principal (4QTB), segundo acoplamiento (2ZOQ) y tercer acoplamiento (6GES). Existen similitudes entre el primer y tercer acoplamiento, en la Arg B:94 y Glu B:343.

7.3.5. D8-PI3K COMPARACIÓN.

DOCKING PRINCIPAL (3ZIM)

Puente de Hidrogeno	Angulo	Distancia (A)
ASP A:933	171.5°	2.09
LYS A:802	118°	2.32
SER A: 774	137.4°	1.85

SEGUNDO DOCKING (4L2Y)

Puente de Hidrogeno	Angulo	Distancia (A)
LEU A:755	151.2°	2.06

TERCER DOCKING (5SXE)

Puente de Hidrogeno	Angulo	Distancia (A)
GLU A:542	133.6°	2.19
ASN A:605	176.9°	1.71
LYS B:379	115.1°	2.18

Tabla 13: Comparación acoplamiento D8-PI3K. De izquierda a derecha, acoplamiento principal (3ZIM), segundo acoplamiento (4L2Y) y tercer acoplamiento (5SXE). En este acoplamiento no existen similitudes entre los acoplamientos respecto a los aminoácidos presentes, por lo que podemos descartar este acoplamiento.

7.3.6. D8 – MAP2K1 COMPARACIÓN.

DOCKING PRINCIPAL (3E8N)

Puente de Hidrogeno	Angulo	Distancia (A)
GLU A:225	154.5°	2.13
LYS A:156	140.2°	1.80
ARG A:227	122.7°	1.75

SEGUNDO DOCKING (3PP1)

Puente de Hidrogeno	Angulo	Distancia (A)
ASN A:78	94.1°	2.31
SER A: 194	141.4°	2.35
LYS A: 156	145.5°	2.43
	105 °	2.35

TERCER DOCKING (3V01)

Puente de Hidrogeno	Angulo	Distancia (A)
GLU A:144	145.2°	1.80

CUARTO DOCKING (3ORN)

Puente de Hidrogeno	Angulo	Distancia (A)
ARG A:227	150.2°	2.26
ASN A:78	105.4°	2.09
	113.44°	2.44
THR A:226	98.5°	2.43
	139.6°	1.55

Tabla 14: Comparación acoplamiento D8-MAP2K1. De izquierda a derecha, acoplamiento principal (3E8N), segundo acoplamiento (3PP1), tercer acoplamiento (3V01) y cuarto acoplamiento (3ORN). En este acoplamiento podemos ver que existen similitudes entre el primero, segundo y cuarto acoplamiento, entre el primero y el segundo tenemos la presencia de la Lys A:156, entre el primero y el cuarto tenemos la Arg A:227. En el segundo acoplamiento encontramos similitudes con el cuarto acoplamiento en la Asn A:78, por lo que podemos despreciar el tercer acoplamiento, sin embargo, existen múltiples conexiones entre estas interacciones por lo cual podemos validar este acoplamiento.

8. DISCUSIÓN.

El acoplamiento molecular permitió visualizar, a raíz de resultados previos obtenidos mediante plataformas bioinformáticas y experimentación *in vitro*, que las interacciones entre proteínas dianas y ligandos, en la mayoría de los casos, no presentan características ideales para su acción *in vivo*. Sin embargo, los resultados obtenidos indican que el mejor candidato para su posterior estudio es el heteroesteroide con la clave D8.

En este estudio, D8 mostró interacciones consistentes con ERK1, con al menos 3 puentes de hidrógeno viables en los tres acoplamientos existentes. Esto indica que el papel de D8 podría generar la activación de ERK1, estimulando la división celular y generando una cadena de señalización en la que Akt actúa a través de mTor, lo que representa un estímulo en la principal vía de señalización para la hipertrofia PI3K/Akt/mTor.

En cuanto a D8 con MAP2K1, existe una consistencia en 3 de los 4 acoplamientos con al menos 3 puentes de hidrógeno viables en los tres acoplamientos con similitudes. De acuerdo con las características de MAP2K1, su posición en la vía de señalización MAPK y su interconexión con la vía PI3K, parece muy posible que la estimulación de la proteína mediante D8 genere una cascada aguas abajo que permita evitar la atrofia muscular en células musculoesqueléticas humanas.

En ambos casos mencionados anteriormente, además de las buenas conexiones mediante los puentes de hidrógeno, hay presencia de interacciones hidrofóbicas, lo que garantiza en mayor medida un acoplamiento estable.

9. CONCLUSIÓN.

El presente estudio nos ha permitido realizar una revisión bibliográfica de las proteínas diana, identificando las mejores estructuras tridimensionales de cada una de ellas. Se utilizaron criterios específicos de las estructuras cristalinas, como la resolución, la falta de mutaciones y los parámetros denominados “Z-liners” para determinar la calidad de la cristalización y su exactitud en contraposición a las proteínas *in vivo*.

También se obtuvieron las estructuras 3D de los heteroesteroides a partir de los códigos SMILES obtenidos en el estudio previo, permitiendo su preparación para un acoplamiento molecular preciso y con resultados efectivos.

Gracias a la suite de programas bioinformáticos del CCDC, se logró el acoplamiento de las 16 interacciones presentadas entre 11 proteínas y 5 heteroesteroides (S1, D3, D5, D7 y D8) en distintas combinaciones resultantes de la fase previa del estudio.

Todos los resultados obtenidos a raíz del acoplamiento fueron revisados mediante el programa Discovery Studio. Después de revisar todas las interacciones intermoleculares presentes, se determinó que el heteroesteroide D8 es el mejor candidato para mediar ambas vías de señalización debido a los sitios de unión de dicho heteroesteroide con ambas proteínas.

En el caso de ERK1, el estudio para el cual se creó esta estructura reporta que su inhibidor se unió cerca del sitio activo conservado cerca de la Lys 114, y nuestro heteroesteroide se unió en la zona cercana, entre la Arg 9 y la His 167, presentando un total de diez interacciones viables para mantener la estabilidad molecular, potencialmente promoviendo así la hipertrofia muscular.

Para MAP2K1, el sitio de unión activo se encuentra cerca de la Leu 155, y el heteroesteroide presenta interacciones en la zona cercana con Lys 156, con un total

de siete interacciones. Por lo tanto, por la posición de esta proteína en la cadena de señalización, podríamos mediar la atrofia muscular.

Este estudio ha demostrado que los objetivos se cumplieron y se logró determinar que el heteroesteroide D8 tiene una mayor posibilidad de regular ambas vías de señalización. Sin embargo, es necesaria su posterior evaluación *in vitro* e *in vivo* para verificar su viabilidad en la posible creación de una droga diseñada para el tratamiento de la atrofia muscular. Por lo tanto, se sugiere el uso de otras técnicas, como microarreglos o *Western Blot*, para minimizar los sesgos del presente estudio y continuar con la investigación.

10. LIMITANTES.

A pesar de los beneficios que el acoplamiento molecular proporciona, es importante mencionar que este no es un sustituto para pruebas *in vitro* e *in vivo*, ya que los algoritmos utilizados por los diferentes software pueden provocar múltiples diferencias en cómo se procesan y se muestran los acoplamientos moleculares, modificando así las interacciones existentes. Por lo tanto, todo lo presentado en este trabajo se realizó en el mismo software con el mismo procedimiento para limitar al máximo las variaciones propias del acoplamiento molecular.

11. BIBLIOGRAFÍA.

- Abbot, E. L., McCormack, J. G., Reynet, C., Hassall, D. G., Buchan, K. W., Yeaman, S. J., & Yeaman, S. J. (2005). Diverging regulation of pyruvate dehydrogenase kinase isoform gene expression in cultured human muscle cells. *The FEBS Journal*, *272*, 3004–3014. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04713.x>
- Alazmi, M., & Motwalli, O. (2021). In silico virtual screening, characterization, docking and molecular dynamics studies of crucial SARS-CoV-2 proteins. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, *39*(17), 6761–6771. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1803965>
- Aronson, D., Violan, M. A., Dufresne, S. D., Zangen, D., Fielding, R. A., & Goodyear, L. J. (1997). Exercise stimulates the mitogen-activated protein kinase pathway in human skeletal muscle. *Journal of Clinical Investigation*, *99*(6), 1251. <https://doi.org/10.1172/JCI119282>
- Bahrami-B, F., Ataie-Kachoie, P., Pourgholami, M. H., & Morris, D. L. (2014). P70 Ribosomal protein S6 kinase (Rps6kb1): An update. *Journal of Clinical Pathology*, *67*(12), 1019–1025. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2014-202560>
- Baker, E. N., & Hubbard, R. E. (1984). Hydrogen bonding in globular proteins. *Progress in biophysics and molecular biology*, *44*(2), 97–179. [https://doi.org/10.1016/0079-6107\(84\)90007-5](https://doi.org/10.1016/0079-6107(84)90007-5)
- Ballón Paucara, W. G., & Grados Torrez, R. E. (2019). Acomplamiento molecular: criterios prácticos para la selección de ligandos biológicamente activos e identificación de nuevos blancos terapéuticos. *Revista CON-CIENCIA*, *7*(2), 55–72. http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2310-02652019000200006&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Beckam, J. (2014). *The Virtual Drug Screening Stream: research and discovery as undergraduates*. Education Corner Newsletter 61. https://cdn.rcsb.org/rcsb-pdb/general_information/news_publications/newsletters/2014q2/corner.html
- Boyer, J. G., Prasad, V., Song, T., Lee, D., Fu, X., Grimes, K. M., Sargent, M. A., Sadayappan, S., & Molkentin, J. D. (2019). ERK1/2 signaling induces skeletal muscle slow fiber-type switching and reduces muscular dystrophy disease severity. *JCI Insight*, *4*(10). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.127356>
- Carnac, G., Vernus, B., & Bonniieu, A. (2007). Myostatin in the Pathophysiology of Skeletal Muscle. *Current Genomics*, *8*(7), 415. <https://doi.org/10.2174/138920207783591672>
- Carter, J. C., Sheehan, D. W., Prochoroff, A., & Birnkrant, D. J. (2018). Muscular Dystrophies. *Clinics in chest medicine*, *39*(2), 377–389. <https://doi.org/10.1016/J.CCM.2018.01.004>
- Case: *What is the difference between the GoldScore, ChemScore, ASP and ChemPLP scoring functions provided with GOLD?* - *The Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC)*. (s/f). <https://www.ccdc.cam.ac.uk/support-and-resources/support/case/?caseid=5d1a2fc0-c93a-49c3-a8e2-f95c472dcff0>

- Chen, M. M., Zhao, Y. P., Zhao, Y., Deng, S. L., & Yu, K. (2021). Regulation of Myostatin on the Growth and Development of Skeletal Muscle. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 3709. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2021.785712/BIBTEX>
- Chrysostomou, S., Roy, R., Prischi, F., Thamlikitkul, L., Chapman, K. L., Mufti, U., Peach, R., Ding, L., Hancock, D., Moore, C., Molina-Arcas, M., Mauri, F., Pinato, D. J., Abrahams, J. M., Ottaviani, S., Castellano, L., Giamas, G., Pascoe, J., Moonamale, D., ... Pardo, O. E. (2021). Repurposed floxacins targeting RSK4 prevent chemoresistance and metastasis in lung and bladder cancer. *Science Translational Medicine*, 13(602), 4627. https://doi.org/10.1126/SCITRANSLMED.ABA4627/SUPPL_FILE/SCITRANSLMED.ABA4627_SM.PDF
- Cohen, S., Nathan, J. A., & Goldberg, A. L. (2015). Muscle wasting in disease: molecular mechanisms and promising therapies. *Nature reviews. Drug discovery*, 14(1), 58–74. <https://doi.org/10.1038/NRD4467>
- Coleman, M. E., Demayo, F., Kuo Chang Yin, Heung Man Lee, Geske, R., Montgomery, C., & Schwartz, R. J. (1995). Myogenic vector expression of insulin-like growth factor I stimulates muscle cell differentiation and myofiber hypertrophy in transgenic mice. *Journal of Biological Chemistry*, 270(20), 12109–12116. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.20.12109>
- Cotton, T. R., Fischer, G., Wang, X., McCoy, J. C., Czepnik, M., Thompson, T. B., & Hyvönen, M. (2018). Structure of the human myostatin precursor and determinants of growth factor latency. *The EMBO Journal*, 37(3), 367. <https://doi.org/10.15252/EMBJ.201797883>
- da Hora Borges, M. A., Santos Passos, F. R., Jullyana De Souza, S. Q., & Azeredo, F. J. (2023). *Hecogenin and its derivatives: A pharmacology review*. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114251>
- Dassault Systèmes. (2020). *BIOVIA Discovery Studio* (21.1.0.20298). Dassault Systèmes.
- Davey, R. A., & Grossmann, M. (2016). Androgen Receptor Structure, Function and Biology: From Bench to Bedside. *The Clinical Biochemist Reviews*, 37(1), 3. [/pmc/articles/PMC4810760/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/314810760/)
- Dhanasekaran, N., & Reddy, E. P. (1998, octubre). Signaling by dual specificity kinases. *Oncogene*, 1447–1455. <https://doi.org/doi:10.1038/sj.onc.1202251>
- Dumont, N. A., Bentzinger, C. F., Sincennes, M. C., & Rudnicki, M. A. (2015). Satellite Cells and Skeletal Muscle Regeneration. *Comprehensive Physiology*, 5(3), 1027–1059. <https://doi.org/10.1002/CPHY.C140068>
- Egerman, M. A., & Glass, D. J. (2014). Signaling pathways controlling skeletal muscle mass. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 49(1), 59. <https://doi.org/10.3109/10409238.2013.857291>
- Elkina, Y., von Haehling, S., Anker, S. D., & Springer, J. (2011). The role of myostatin in muscle wasting: An overview. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, 2(3), 143–151. <https://doi.org/10.1007/S13539-011-0035-5/FIGURES/2>
- Exeter, D., & Connell, D. A. (2010). Skeletal muscle: Functional anatomy and pathophysiology. *Seminars in Musculoskeletal Radiology*, 14(2), 97–105. <https://doi.org/10.1055/S-0030-1253154/ID/27>

- Fenton, T. R., & Gout, I. T. (2011). Functions and regulation of the 70 kDa ribosomal S6 kinases. En *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* (Vol. 43, Número 1, pp. 47–59).
<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2010.09.018>
- Frontera, W. R., & Ochala, J. (2015). Skeletal muscle: a brief review of structure and function. *Calcified tissue international*, 96(3), 183–195. <https://doi.org/10.1007/S00223-014-9915-Y>
- Ghosh, D., Egbuta, C., & Lo, J. (2018). Testosterone Complex and Non-Steroidal Ligands of Human Aromatase. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 181, 11.
<https://doi.org/10.1016/J.JSBMB.2018.02.009>
- Ghosh, D., Griswold, J., Erman, M., & Pangborn, W. (2009). Structural basis for androgen specificity and oestrogen synthesis in human aromatase. *Nature*, 457(7226), 219–223.
<https://doi.org/10.1038/nature07614>
- Glass, D. J. (2010). PI3 Kinase Regulation of Skeletal Muscle Hypertrophy and Atrophy. En *Phosphoinositide 3-kinase in Health and Disease* (pp. 267–278).
https://doi.org/10.1007/82_2010_78
- Guclu-Ustundag, Ö., & Mazza, G. (2007). Saponins: Properties, applications and processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47(3), 231–258.
<https://doi.org/10.1080/10408390600698197>
- Hanwell, M. D., Curtis, D. E., Lonie, D. C., Vandermeersch, T., Zurek, E., & Hutchison, G. R. (2012). Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *Journal of Cheminformatics*, 4(8), 1–17. <https://doi.org/10.1186/1758-2946-4-17/FIGURES/14>
- Hardt, S. E., & Sadoshima, J. (2002). Glycogen Synthase Kinase-3 β . *Circulation Research*, 90(10), 1055–1063. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000018952.70505.F1>
- Hetényi, C., & van der Spoel, D. (2006). Blind docking of drug-sized compounds to proteins with up to a thousand residues. *FEBS Letters*, 580(5), 1447–1450.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.01.074>
- Huang, C.-H., Mandelker, D., Schmidt-Kittler, O., Samuels, Y., Velculescu, V. E., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., Gabelli, S. B., & Amzel, † L Mario. (2007). The Structure of a Human p110a/p85a Complex Elucidates the Effects of Oncogenic PI3Ka Mutations. *Science*, 318(5857), 1744–1748.
<https://doi.org/10.1126/science.1150799>
- Huang, Z., Chen, D., Zhang, K., Yu, B., Chen, X., & Meng, J. (2007). Regulation of myostatin signaling by c-Jun N-terminal kinase in C2C12 cells. *Cellular Signalling*, 19(11), 2286–2295.
<https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2007.07.002>
- Iams, W. T., & Lovly, C. M. (2015). Molecular pathways: Clinical applications and future direction of insulin-like growth factor-1 receptor pathway blockade. *Clinical Cancer Research*, 21(19), 4270–4277. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-2518>

- Jackman, R. W., & Kandarian, S. C. (2004). The molecular basis of skeletal muscle atrophy. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 287(4 56-4).
<https://doi.org/10.1152/AJPCELL.00579.2003/ASSET/IMAGES/LARGE/ZH00100421221003.JPEG>
- Jeffrey, G. A. (1997). *An introduction to hydrogen bonding* (1a ed.). Oxford University Press, Inc.
- Jones, G., Willett, P., Glen, R. C., Leach, A. R., & Taylor, R. (1997). Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *Journal of Molecular Biology*, 267(3), 727–748.
<https://doi.org/10.1006/JMBI.1996.0897>
- Laplante, M., & Sabatini, D. M. (2012). mTOR Signaling in Growth Control and Disease. *CELL*, 149, 274–293. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.017>
- Levalle OA., & Lalosa S. (2015, noviembre 18). Implicancias fisiopatológicas del receptor androgénico. Mutaciones, polimorfismos y patologías asociadas. *Revista Argentina de Endocrinología y Metabolismo Vol 52 N2*.
- Lodowski, D. T., Pitcher, J. A., Capel, W. D., Lefkowitz, R. J., & Tesmer, J. J. G. (2003). Keeping G proteins at bay: A complex between G protein-coupled receptor kinase 2 and Gβγ. *Science*, 300(5623), 1256–1262. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1082348/SUPPL_FILE/LODOWSKI.SOM.PDF
- Lohning, A. E., Levonis, S. M., Williams-Noonan, B., & Schweiker, S. S. (2017). A Practical Guide to Molecular Docking and Homology Modelling for Medicinal Chemists. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 17(18). <https://doi.org/10.2174/1568026617666170130110827>
- Marker, R., Wagner, R. B., Ulshafer, P. R., Wittbecker, E. L., J Goldsmith, D. P., & Ruof, C. H. (1947). *Steroidal Sapogenins* (Vol. 66, Número 2). Goldsmith and Roof.
<https://doi.org/10.1021/ja01201a032>
- Mayor, F. (2009). El interactoma de la quinasa GRK2 y sus implicaciones fisiopatológicas. *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia*, 47–67.
- Mendie, L. E., & Hemalatha, S. (2022). Molecular Docking of Phytochemicals Targeting GFRs as Therapeutic Sites for Cancer: an In Silico Study. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 194(1), 215–231. <https://doi.org/10.1007/s12010-021-03791-7>
- Morgan, J. E., & Partridge, T. A. (2003). Muscle satellite cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 35(8), 1151–1156. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(03\)00042-6](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(03)00042-6)
- Musarò, A., McCullagh, K., Paul, A., Houghton, L., Dobrowolny, G., Molinaro, M., Barton, E. R., L Sweeney, H., & Rosenthal, N. (2001). Localized Igf-1 transgene expression sustains hypertrophy and regeneration in senescent skeletal muscle. *Nature Genetics* 2001 27:2, 27(2), 195–200.
<https://doi.org/10.1038/84839>
- O'Neill, B. T., Lauritzen, H. P. M. M., Hirshman, M. F., Smyth, G., Goodyear, L. J., & Kahn, C. R. (2015). Differential Role of Insulin/IGF-1 Receptor Signaling in Muscle Growth and Glucose Homeostasis. *Cell Reports*, 11(8), 1220–1235. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.04.037>

- Perel, C., & Echin, M. (2011). *Acromegalia y enfermedad cardiovascular*. <http://www.insuficienciacardiaca.org>
- Pérez, L. (2022). *Efecto anabólico de análogos de brasinoesteroides en células de músculo esquelético: una aproximación in silico e in vitro*. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla .
- Philippou, A., MARIDAKI, M., HALAPAS, A., & KOUTSILIERIS, M. (2007). The Role of the Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-1) in Skeletal Muscle Physiology. *In Vivo*, 21(1), 45. <http://iv.iijournals.org/content/21/1/45.abstract>
- Pinzi, L., & Rastelli, G. (2019). Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18). <https://doi.org/10.3390/IJMS20184331>
- Plotnikov, A., Zehorai, E., Procaccia, S., & Seger, R. (2011a). The MAPK cascades: Signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1813(9), 1619–1633. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2010.12.012>
- Plotnikov, A., Zehorai, E., Procaccia, S., & Seger, R. (2011b). The MAPK cascades: signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. *Biochimica et biophysica acta*, 1813(9), 1619–1633. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2010.12.012>
- Rommel, C., Bodine, S. C., Clarke, B. A., Rossman, R., Nunez, L., Stitt, T. N., Yancopoulos, G. D., & Glass, D. J. (2001). Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. *Nature Cell Biology*, 3(11), 1009–1013. <https://doi.org/10.1038/ncb1101-1009>
- Ryder, J. W., Fahlman, R., Wallberg-Henriksson, H., Alessi, D. R., Krook, A., & Zierath, J. R. (2000). Effect of contraction on mitogen-activated protein kinase signal transduction in skeletal muscle. Involvement of the mitogen- and stress- activated protein kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 275(2), 1457–1462. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.2.1457>
- Sandri, M. (2008). Signaling in muscle atrophy and hypertrophy. *Physiology*, 23(3), 160–170. <https://doi.org/10.1152/PHYSIOL.00041.2007/ASSET/IMAGES/LARGE/Y0041-7-04.JPEG>
- Sartori, R., Romanello, V., & Sandri, M. (2021). Mechanisms of muscle atrophy and hypertrophy: implications in health and disease. *Nature Communications*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/S41467-020-20123-1>
- Schiaffino, S., Dyar, K. A., Ciciliot, S., Blaauw, B., & Sandri, M. (2013). Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. *The FEBS Journal*, 280(17), 4294–4314. <https://doi.org/10.1111/FEBS.12253>
- Škorja, N., Milić, M., Dolinar, K., Miš, K., Matkovič, U., Bizjak, M., Pavlin, M., Podbregar, M., & Pirkmajer, S. (2021). Suppression of Pyruvate Dehydrogenase Kinase by Dichloroacetate in Cancer and Skeletal Muscle Cells Is Isoform Specific and Partially Independent of HIF-1 α . *International Journal of Molecular Sciences Article*. <https://doi.org/10.3390/ijms>
- Slovensky, G. (s/f). *Molinspiration Cheminformatics free web services*. <https://www.molinspiration.com>.

- Sohl, C. D., & Guengerich, F. P. (2010). Kinetic Analysis of the Three-step Steroid Aromatase Reaction of Human Cytochrome P450 19A1 * □ S. *Journal of Biological Chemistry*, 285(23), 17734–17743. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.123711>
- Sugita, H., Kaneki, M., Sugita, M., Yasukawa, T., Yasuhara, S., & Martyn, J. A. J. (2005). Burn injury impairs insulin-stimulated Akt/PKB activation in skeletal muscle. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 288(3 51-3). <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00321.2004>
- SwissTargetPrediction. (s/f). Recuperado el 17 de abril de 2024, de <http://www.swisstargetprediction.ch/>
- Wood, P. A., Allen, F. H., & Pidcock, E. (2009). Hydrogen-bond directionality at the donor H atom—analysis of interaction energies and database statistics. *CrystEngComm*, 11(8), 1563–1571. <https://doi.org/10.1039/B902330E>
- Yakar, S., & Adamo, M. L. (2012). Insulin-Like Growth Factor 1 Physiology. Lessons from Mouse Models. En *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* (Vol. 41, Número 2, pp. 231–247). <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2012.04.008>
- Yin, L., Lu, L., Lin, X., & Wang, X. (2020). Crucial role of androgen receptor in resistance and endurance trainings-induced muscle hypertrophy through IGF-1/IGF-1R-PI3K/Akt-mTOR pathway. *Nutrition and Metabolism*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12986-020-00446-y>
- Zhang, H., Xu, J., Wang, M., Xia, X., Dai, R., & Zhao, Y. (2020). Steroidal saponins and sapogenins from fenugreek and their inhibitory activity against α -glucosidase. *Steroids*, 161. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2020.108690>