



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Predicción computacional de la estructura terciaria de la enzima 5 α -reductasa tipo II humana y estudio de su acoplamiento molecular.

Norman David Camacho Casas

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia
Bogotá, Colombia
2015

Predicción computacional de la estructura terciaria de la enzima 5 α -reductasa tipo II humana y estudio de su acoplamiento molecular.

Norman David Camacho Casas

Tesis o trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:

Magister Ciencias Farmacéuticas

Directora:

Dra. Norma Angélica Valencia Islas

Profesora Asociada D.E. Departamento de Farmacia. Facultad de Ciencias.

Universidad Nacional de Colombia

Codirector:

Dr. Fabián López Vallejo

Profesor Asistente D.E. Departamento de Química. Facultad de Ciencias. Universidad

Nacional de Colombia

Línea de Investigación:

Diseño de Fármacos Asistido por Computadores

Grupo de Investigación en Química Medicinal

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia.

Bogotá, Colombia

2015

Tu trabajo va a llenar gran parte de tu vida, y la única forma de estar realmente satisfecho con él es hacer lo que creas que es un gran trabajo. Y la única manera de hacer un trabajo genial es amar lo que haces. Si no lo has encontrado, sigue buscando. No te detengas. Al igual que con todos los asuntos del corazón, lo sabrás cuando lo encuentres. Y, como cualquier gran relación, sólo se pondrá mejor y mejor, conforme los años pasen. Así que sigue buscando hasta que lo encuentres. No te detengas.

Steve Jobs.

Agradecimientos

Quiero expresar mi sincero agradecimiento a todas las personas que de un modo u otro colaboraron durante el desarrollo de este trabajo de investigación.

A la profesora Norma Angélica Valencia Islas, directora de este proyecto, por su guía, y seguimiento durante el desarrollo de todo este trabajo.

También quiero agradecer a Fabián López por los aportes y la continua orientación que hizo a este proyecto.

A Diego Rodríguez quien siempre me ha acompañado y ha estado pendiente a lo largo de este camino que ambos hemos recorrido con mucho esfuerzo, siempre ha estado dispuesto a brindarme su ayuda y apoyo en todo momento.

Especialmente a mi familia. A padres, y hermanos quienes nunca han dejado de apoyar mis proyectos y me han animado en los momentos difíciles para continuar en mi crecimiento profesional, además que siempre me han colaborado cuando lo he necesitado.

Muchas gracias.

Resumen

El cáncer de próstata (CP) y la hiperplasia prostática benigna (HPB) son las principales patologías que afectan a la próstata cuya ocurrencia en la población masculina mayor de 45 años ha aumentado en la última década. Al ser enfermedades de una alta incidencia y mortalidad, cada día se destinan más esfuerzos para estudiar sus tratamientos, con el fin de mejorar la calidad de vida de los afectados.

La HPB es la más común entre las dos enfermedades. En la actualidad su tratamiento se lleva a cabo teniendo en cuenta las guías de la Asociación Americana de Urología, por medio de su algoritmo que clasifica a la enfermedad y ayuda a la elección de su tratamiento ya sea farmacológico o quirúrgico.

Los principales andrógenos endógenos son la testosterona (T) y la 5 α -dihidrotestosterona (DHT) que tienen actividades sexuales y anabólicas, además de controlar el desarrollo y mantenimiento de órganos como las vesículas seminales, el pene y la próstata, entre otros. En la próstata, la T es reducida enzimáticamente a DHT por la 5 α -reductasa tipo II (5 α R-II), siendo este metabolito el responsable de su agrandamiento. Por esta razón, la inhibición de la 5 α R-II constituye un blanco de acción clave para el tratamiento de la HPB.

Dentro de los fármacos para tratar a la HPB se encuentran los inhibidores de la 5 α R como la finasterida y la dutasterida, que aunque son muy efectivos se les ha asociado una serie de eventos adversos relacionados con la función sexual masculina. Por lo tanto, la búsqueda y diseño de inhibidores de 5 α R-II novedosos potencialmente con menores efectos adversos se encuentra justificada.

En este sentido, el diseño de fármacos asistido por computadores o *in silico* constituye una herramienta valiosa para encontrar compuestos potencialmente bioactivos. A través de la estrategia de *docking* o acoplamiento molecular se pueden encontrar compuestos que se adapten tanto geométrica como químicamente a una determinada cavidad (sitio activo) de una diana biológica siendo esto representativo de su potencial actividad por la misma. Sin embargo, para llevar a cabo esta estrategia, es necesario conocer la estructura tridimensional (3D) de la diana de interés. Cabe mencionar que a la fecha, no se conoce la estructura 3D de la 5 α R-II humana, por lo tanto, el presente trabajo tuvo como objetivo su modelado *in silico* partiendo de su secuencia de aminoácidos conocida, empleando técnicas de modelado por homología y por plegamiento (*threading*). A partir del alineamiento de la secuencia de aminoácidos conocida de la 5 α R con las proteínas de la

base de datos del Protein Data Bank (PDB) en el programa BLAST, se determinaron las plantillas proteicas (1MG7, 1J0A, 1UTH, 3BUR, 3BUV, 4QUV) para el modelado, mismo que se llevó a cabo en el programa computacional MODELLER y las plataformas informáticas I-TASSER y PHYRE2.

Se construyeron un total de doce modelos que fueron validados mediante las plataformas QMEAN, ProQ y el gráfico de Ramachandran. A estos modelos se les determinó el sitio catalítico, representativo de las regiones de mayor accesibilidad y probabilidad de unión a la T, mediante una estrategia de acoplamiento molecular amplio (*blind docking*) con AutoDock 4.6 y una estrategia de acoplamiento molecular fino (en el programa SiteMap) entre la T o los inhibidores y los doce modelos 3D construidos. Se determinó que el sitio catalítico se encuentra en la región comprendida entre los aminoácidos histidina 230 a 232 de la estructura proteica concordando con el sitio catalítico previamente establecido por mutagénesis experimental.

El modelo ITA3BUR, construido por la estrategia de plegamiento (*threading*) en el programa I-TASSER, empleando como plantilla proteica a la enzima 5 β -reductasa (3BUR) de origen humano resultó un modelo válido de la estructura 3D de la 5 α R. Adicionalmente, se determinó que el modelo ITA3BUR se une de una manera energéticamente más favorable tanto al sustrato endógeno como a los inhibidores adicionando elementos para considerarlo en una aproximación teórica válida a la estructura tridimensional de la 5 α R-II humana.

Palabras clave: 5 α -reductasa (5 α R), acoplamiento molecular, antiandrógenos, hiperplasia prostática benigna (HPB), modelado molecular, homología, plegamiento.

Abstract

Prostate cancer (PC) and benign prostatic hyperplasia (BPH) are the main diseases that affect the prostate, whose occurrence on male population over 45 years has increased in the last decade. Since they are diseases with a high incidence, every day many efforts are oriented to study their treatments, in order to improve the quality of life of those affected.

BPH is the most common of the two diseases. Nowadays, its treatment is performed according to the American Urological Association guidelines using its algorithm that classifies the disease and helps to choice of drug therapy or surgery.

The main endogenous androgens are testosterone (T) and 5 α -dihydrotestosterone (DHT) both have sexual and anabolic activities as well as control the development and maintenance of organs such as seminal vesicles, penis and prostate. In the prostate, T is reduced to 5 α -dihydrotestosterone (DHT), catalyzed by type II 5 α -reductase (5 α R-II) which in turn is the responsible of its enlargement. For this reason, the inhibition of 5 α R-II is a key target for the treatment of BPH.

Dutasteride and finasteride are 5 α R inhibitors, which are the choice drugs for BPH treatment. Although they are effective, a series of side effects related to male sexual function have been attributed to them. Therefore, the discovery and design of novel 5 α R-II inhibitors with potentially less side effects is justified.

In this sense, the *in silico* or computer assisted drug design is a valuable tool for finding potentially bioactive compounds. By molecular docking can be found compounds that geometrically or chemically suit to a biological target, which in turn represents its activity on it. However, in order to do this, it is necessary to know the three dimensions (3D) structure of the biological target. Due to nowadays the 3D structure for human 5 α R-II it is not known the objective of this study was to model it *in silico* starting from its known amino acid sequence using homology and *threading* modeling techniques. For this purpose, different protein templates (1MG7, 1J0A, 1UTH, 3BUR, 3BUV, 4QUV) and software (MODELLER, I-TASSER y PHYRE2) were used.

A total of twelve models were constructed, which were validated by QMEAN, ProQ and Ramachandran plot. Their catalytic site, representing the more accessible and binding probability to T regions were established by blind docking by AutoDock 4.6 and SiteMap software. The catalytic site was determined in the region between amino acids 230 to 232, which was also found by mutagenesis in previous studies.

ITA3BUR model constructed by threading with the software I-TASSER using human 5 β -reductase (3BUR) as protein template was a valid model. By molecular docking between each model and the endogenous substrate T or its inhibitors dutasteride and finasteride, In addition, it was determined that ITA3BUR model binds in a way energetically more propitious to these molecules, which helped to consider ITA3BUR model as a valid theoretical approach to 3D structure of human 5 α R-II.

Keywords: 5 α reductase (5 α R), molecular docking, antiandrogens, benign prostatic hyperplasia (BPH), molecular modeling, homology, *threading*.

Tabla de contenido

1. Marco Teórico	26
1.1 Hiperplasia Prostática Benigna (HPB)	26
1.1.1 Anatomía.....	26
1.1.2 Fisiopatología.....	27
1.1.3 Incidencia	29
1.1.4 Tratamiento	29
1.1.4.1 Tratamiento Quirúrgico	30
1.1.4.2 Tratamientos mínimamente invasivos	32
1.1.4.3 Tratamiento Farmacológico	33
1.2 La enzima 5 α -reductasa (5 α R) y su papel biológico en el organismo	35
1.2.1 Isoformas de la enzima 5 α -reductasa	38
1.2.2 Inhibidores de la enzima 5 α -reductasa	41
1.3 Diseño de fármacos asistido por computador.....	45
1.3.1 Diseño de fármacos basado en la estructura del ligando	47
1.3.2 Diseño de fármacos basado en la estructura de la diana	51
1.3.2.1 Acoplamiento molecular o docking.....	52
1.3.3 Modelado molecular de proteínas	55
1.3.3.1. Modelado de proteínas por homología	57
1.3.3.2. Modelado de proteínas por <i>threading</i> o plegamiento.....	59
1.3.3.3. Modelado de proteínas por el método <i>de novo</i>	61
2. Materiales y Métodos	63
2.1 Equipos.....	63
2.1.1 Programas computacionales.....	63
2.2 Métodos	68
2.2.1 Procedimientos generales	68

2.2.2	Archivos y entradas utilizados	69
2.2.3	Selección de la secuencia de aminoácidos de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana para la construcción del modelo tridimensional	70
2.2.4	Determinación de la estructura secundaria a la secuencia de aminoácidos seleccionada de la 5 α -reductasa tipo 2 humana para la construcción del modelo	70
2.2.5	Alineamiento de la secuencia proteica seleccionada de la 5 α -reductasa tipo 2 humana para la construcción del modelo tridimensional	70
2.2.6	Construcción del modelo tridimensional de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana.....	71
2.2.7	Optimización del modelo tridimensional de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana.....	72
2.2.8	Validación de los modelos tridimensionales de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana.....	73
2.2.9	Estudio de acoplamiento molecular (Docking) entre el modelo tridimensional determinado y su sustrato endógeno e inhibidores	75
2.2.10	Adecuación de sustratos e inhibidores para el acoplamiento molecular	77
2.2.11	Adecuación del modelo tridimensional de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana para el estudio de acoplamiento molecular con su sustrato e inhibidores	78
3.	Análisis y Discusión de Resultados	79
3.1	Selección de la secuencia de aminoácidos de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 para la construcción del modelo	79
3.2	Análisis de la estructura primaria de la secuencia de aminoácidos seleccionada para la construcción del modelo	79
3.3	Determinación de la estructura secundaria a la secuencia de aminoácidos seleccionada de la 5 α -reductasa tipo 2 humana para la construcción del modelo ..	81

3.3 Alineamiento de la secuencia proteica seleccionada de la 5α-reductasa tipo 2 humana para la construcción del modelo tridimensional	85
3.4 Construcción de los modelos tridimensionales de la enzima 5α-reductasa tipo 2 humana	89
3.4.1 Modelos tridimensionales de la enzima 5α-reductasa tipo 2 humana construidos con el programa MODELLER	90
3.4.2 Modelos tridimensionales de la enzima 5α-reductasa tipo 2 humana construidos en la plataforma I-TASSER	95
3.4.3 Modelos tridimensionales de la enzima 5α-reductasa tipo 2 humana construidos en la plataforma PHYRE2	99
3.5 Validación de los modelos tridimensionales de la enzima 5α-reductasa tipo 2 humana construidos	100
3.6 Acoplamiento molecular (<i>docking</i>) entre los modelos tridimensionales de la enzima 5α-reductasa tipo 2 humana construidos y sustrato e inhibidores.....	107
3.6.1 Determinación del sitio catalítico en el modelo tridimensional de la enzima 5α-reductasa tipo 2 humana	107
3.7 Acoplamiento molecular de los modelos tridimensionales de la enzima 5α-reductasa tipo 2 humana con la testosterona, finasterida y dutasterida.....	112
3.7.1 Determinación de las interacciones moleculares entre el sitio catalítico del modelo tridimensional de la enzima 5α-reductasa tipo 2 humana y su sustrato endógeno e inhibidores	115
4. Conclusiones	123
5. Perspectivas.....	124
6. Producción científica	125
7. Referencias bibliográficas	126
8. Anexos.....	135
Anexo A. Programas computacionales para acoplamiento molecular (<i>docking</i>) de pequeñas moléculas o fragmentos	135
Anexo B. Resultados primarios de los modelos construidos con MODELLER y validación propia del programa.	137

Anexo C. Resultados primarios de los modelos construidos con I-TASSER y validación propia de la plataforma.	139
Anexo D. Resultados primarios estructura secundaria del modelo de la 5αR-II construido con PHYRE2	141
Anexo E: Gráfico de Ramachandran para el modelo ITA3BUR.....	142
Anexo F: Resultados de acoplamiento molecular para los modelos construidos con la plataforma I-TASSER y las plantillas 1J0A, 1MG7, 1UTH con testosterona finasterida y dutasterida	143
Anexo G: Resultados de acoplamiento molecular para los modelos construidos con MODELLER y las plantillas 1J0A, 1MG7, 1UTH con Testosterona y Dutasterida	146
Anexo H: Resultados de acoplamiento molecular para el modelo MOD4QUV con Dutasterida.....	148
Anexo I: Resultados de acoplamiento molecular para el modelo ITA3BUR con Testosterona, Finasterida y Dutasterida	149

Lista de Figuras

Figura 1-1. Ubicación anatómica de la próstata. _____	27
Figura 1-2. Resectoscopio: instrumento para la resección trans-uretral de la próstata. _____	31
Figura 1-3. Procedimiento de resección trans-uretral de la próstata. _____	32
Figura 1-4. Mecanismo molecular de activación del receptor de andrógenos. _____	36
Figura 1-5. Conversión de testosterona a dihidrotestosterona por medio de la 5 α R. _____	37
Figura 1-6. Mecanismo propuesto para la reacción catalizada por la 5 α R. _____	38
Figura 1-7. Distribución de las isoformas de la enzima 5 α -reductasa en el hombre. _____	39
Figura 1-8. Relaciones estructura actividad de los 4-azaesteroides. _____	42
Figura 1-9. Mecanismo de inhibición de la finasterida sobre la 5 α R. _____	43
Figura 1-10. Inhibidores de la 5 α -reductasa. A y B: Compuestos de naturaleza esteroidal; C y D: Compuestos de naturaleza no esteroidal. _____	44
Figura 1-11. Esquema general para el desarrollo de modelos QSAR y aplicación del cribado virtual. _____	48
Figura 1-12. Metodologías empleadas para el modelado de proteínas. _____	57
Figura 1-13. Modelado de proteínas por el método de homología. _____	59
Figura 1-14. Representación esquemática de un procedimiento de threading. _____	61
Figura 2-1. Proceso metodológico llevado a cabo en el presente estudio. _____	68
Figura 2-2. Gráfico de Ramachandran mostrando sus cuadrantes. _____	75
Figura 2-3. Diagrama del proceso de optimización energética de la geometría molecular para la testosterona. _____	78
Figura 3-1. Identificación de dominios conservados en la secuencia de aminoácidos seleccionada para la 3-oxo-5-alpha-steroid 4-dehydrogenase 2 (código NCBI: NP_000339.2 d). _____	80
Figura 3-2. Confirmación de los dominios conservados en la secuencia de aminoácidos seleccionada para la 3-oxo-5-alpha-steroid 4-dehydrogenase 2 (código NCBI: NP_000339.2 d). _____	81
Figura 3-3. Predicción de la estructura secundaria de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana. _____	83
Figura 3-4. Predicción de la estructura secundaria de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana. _____	84
Figura 3-5. Modelo trans-membranal de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana. _____	85

- Figura 3-6.** Modelos 3D de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana construidos a través del programa MODELLER empleando como plantillas las proteínas encontradas por alineamiento con la plataforma BLAST. _____ 92
- Figura 3-7.** Modelos 3D de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana construidos a través del programa MODELLER empleando como plantillas las proteínas reductasas. __ 94
- Figura 3-8.** Modelos 3D de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana construidos a través de la plataforma I-TASSER empleando como plantillas las proteínas encontradas por alineamiento con BLAST. _____ 96
- Figura 3-9.** Modelos 3D de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana construidos a través de la plataforma I-Tasser empleando como plantillas las proteínas reductasas. ___ 98
- Figura 3-10.** Modelo 3D de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana construido a través de la plataforma PHYRE2 empleando como plantilla la proteína reductasa 4QUV:B. 100
- Figura 3-11.** Nivel de confianza para el modelado de la enzima 5 α R-II utilizando el servidor PHYRE2. _____ 100
- Figura 3-12.** Puntajes globales para el modelo tridimensional de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana ITA3BUR, construido en la plataforma I-TASSER empleando como plantilla la proteína con actividad reductasa 3BUR. _____ 105
- Figura 3-13.** Modelo tridimensional ITA3BUR para la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana, construido en la plataforma I-TASSER empleando como plantilla la proteína con actividad reductasa 3BUR. _____ 106
- Figura 3-14.** Determinación del sitio catalítico en el modelo tridimensional ITA3BUR para la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana. Sitio determinado por medio del programa SiteMap. _____ 109
- Figura 3-15.** Sobre-posición de los complejos del modelo ITA3BUR de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana. _____ 110
- Figura 3-16.** Determinación de las interacciones moleculares entre testosterona y aminoácidos del sitio catalítico del modelo tridimensional ITA3BUR de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana. _____ 118
- Figura 3-17.** Representación en el modelo ITA3BUR de las regiones que según los estudios de mutagénesis son importantes para la unión de los sustratos a la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana. _____ 119
- Figura 3-18.** Determinación de las interacciones moleculares entre finasterida y aminoácidos del sitio catalítico del modelo tridimensional ITA3BUR de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana. _____ 120

Figura 3-19. Determinación de las interacciones moleculares entre dutasterida y aminoácidos del sitio catalítico del modelo tridimensional ITA3BUR de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana. _____ 121

Lista de Tablas

Tabla 1-1. Puntaje internacional de síntomas prostáticos (IPSS).	30
Tabla 1-2. Propiedades de las principales isoformas de la enzima 5 α -reductasa (5 α R)...	40
Tabla1-3. Bases de datos relevantes para el descubrimiento in silico de fármacos.	50
Tabla 2-1. Características de los equipos utilizados.	63
Tabla 2-2. Características de los programas computacionales y servidores empleados.	63
Tabla 2-3. Parámetros del programa ProQ para la evaluación de la calidad de modelos obtenidos in silico.....	74
Tabla 3-1. Secuencia de aminoácidos de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana (3-oxo-5-alpha-steroid 4-dehydrogenase 2) seleccionada para el estudio.....	79
Tabla 3-2. Estructuras proteicas más similares a la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana encontradas por alineamiento en la plataforma BLAST.....	86
Tabla3-3. Matriz de identidad entre las secuencias alineadas durante la construcción del modelo tridimensional de la 5 α R-II.....	87
Tabla 3-4. Secuencias proteicas con actividad reductasa que fueron alineadas con la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana.....	88
Tabla 3-5. Matriz de identidad entre secuencias de enzimas reductasas alineadas durante la construcción del modelo tridimensional de la 5 α R-II.....	89
Tabla 3-6. Programas, plataformas web y plantillas utilizadas en la construcción de modelos tridimensionales de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana.	90
Tabla 3-7. Comparación de las distancias RMS entre los modelos 3D de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana construidos a través del programa MODELLER empleando como plantillas las proteínas encontradas por alineamiento con la plataforma BLAST.	93
Tabla 3-8. Comparación de las distancias RMS entre los modelos 3D de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana construidos a través del programa MODELLER empleando como plantillas las proteínas con actividad reductasa.....	95
Tabla 3-9. Comparación de las distancias RMS entre los modelos 3D de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana construidos a través de la plataforma I-TASSER empleando como plantillas las proteínas encontradas por alineamiento con la plataforma BLAST.	97
Tabla 3-10. Comparación de las distancias RMS entre los modelos 3D de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana construidos a través de la plataforma I-TASSER empleando como plantillas las proteínas con actividad reductasa.....	99

Tabla 3-11. Parámetros de validación para los modelos tridimensionales de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana construidos en las distintas plataformas informáticas.	103
Tabla 3-12. Energía libre de unión ($\Delta G_{\text{unión}}$) calculada durante el acoplamiento molecular amplio (blind docking) y fino entre el modelo tridimensional de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana.	111
Tabla 3-13. Centro de coordenadas para estudio de acoplamiento molecular determinadas por el programa SiteMap para los modelos construidos de la enzima 5- α -reductasa tipo 2 humana.	111
Tabla 3-14: Energía libre de unión ($\Delta G_{\text{unión}}$) calculada para el acoplamiento molecular entre los diferentes modelos tridimensionales construidos de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana y su sustrato endógeno testosterona e inhibidores finasterida y dutasterida. ..	113

Lista Abreviaturas

Abreviatura	Significado
5 α R	Enzima 5 α -reductasa
5 α R-I	Isoenzima 5 α -reductasa tipo 1
5 α R-II	Isoenzima 5 α -reductasa tipo 2
5 α R-III	Isoenzima 5 α -reductasa tipo 3
5 β R	Enzima 5- β -Reductasa
ADT	AutoDockTools
APS	Antígeno Prostático Específico
AUA	Asociación Americana de Urología
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BOO	Obstrucción de la salida vesical
CoMFA	Comparative Molecular Field Analysis
CP	Cáncer de próstata
CRPC	Cáncer de próstata resistente a la castración
DHT	5 α -dihidrotestosterona
ERA	Elementos de respuesta a andrógenos
FDA	Food and Drug Administration = Agencia de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos de América
HPB	Hiperplasia Prostática Benigna
ICL	Infiltrado inflamatorio celular mononuclear
IPSS	Puntaje internacional de síntomas prostáticos
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PDB	Protein Data Bank
QSAR	Relación cuantitativa entre la estructura química y la actividad biológica
RA	Receptor de andrógenos
RTUP	Resección trans-uretral de la próstata
SCOP	Clasificación estructural de proteínas
SRD5A2	Steroid-5-alpha-reductase, alpha polypeptide 2 (3-oxo-5 alpha-steroid delta 4-dehydrogenase alpha 2)
STUI	Síntomas del tracto urinario inferior
T	Testosterona
TUMT	Terapia trans-uretral con microondas

Tabla de aminoácidos

Código (1 letra)	Código (3 letras)	Aminoácido
A	Ala	Alanina
R	Arg	Arginina
N	Asn	Asparagina
D	Asp	Aspartato
C	Cys	Cisteína
Q	Gln	Glutamina
E	Glu	Ácido glutámico
G	Gly	Glicina
H	His	Histidina
I	Ile	Isoleucina
L	Leu	Leucina
K	Lys	Lisina
M	Met	Metionina
F	Phe	Fenilalanina
P	Pro	Prolina
S	Ser	Serina
T	Thr	Treonina
W	Trp	Triptófano
Y	Tyr	Tirosina
V	Val	Valina

Planteamiento del problema y justificación

En la actualidad la hiperplasia prostática benigna (HPB), una patología dependiente de andrógenos, es de gran preocupación en el entorno nacional y mundial, dada su alta incidencia y morbi-mortalidad en los hombres maduros (Salvador, Pinto, & Silvestre, 2013). La HPB afecta alrededor del 50 por ciento de los hombres entre las edades de 51 a 60 y hasta 90 por ciento de los hombres mayores de 80 años (The Boston Group, 2015). En Colombia, para el año 2005, la prevalencia se estimaba en 260 casos por cada 1000 hombres (González, Rozo, Castro, & Reyes, 2007) convirtiéndola en una de las causas más comunes de cirugías masculinas en los hombres maduros. Para el año 2007 se diagnosticaron alrededor de 2 millones de casos de HPB que condujeron a 120.000 prostatectomías en los Estados Unidos (Sarma & Wei, 2012). Sin embargo, a la fecha, no se conoce de su incidencia en Colombia a pesar de que la HPB sintomática puede ser diagnosticada por los síntomas del tracto urinario inferior (STUI) con los cuales son identificadas también otras enfermedades como las de la vejiga (Arlandis, García, González, & Rebollo, 2009).

En la HPB se produce un crecimiento no canceroso de la próstata a causa de una proliferación excesiva de elementos glandulares y epiteliales del tejido prostático provocando la obstrucción de la uretra y la pérdida gradual de la función de la vejiga (Salvador, et al., 2013) que generan síntomas asociados con un flujo pobre de orina, entre otros.

El andrógeno testosterona (T) y su metabolito reducido dihidrotestosterona (DHT) están íntimamente implicados en el desarrollo de esta enfermedad. Sin embargo, dichas sustancias también son esenciales para la diferenciación sexual y el mantenimiento de los órganos sexuales masculinos, entre ellos la próstata misma, el epidídimo y los testículos. También son los encargados del desarrollo de las características sexuales secundarias masculinas como el aumento en la masa muscular, el crecimiento del vello facial y corporal y el desarrollo de la laringe (Haendler & Cleve, 2012).

La DHT producida a partir de la reducción de la T por la enzima 5- Δ^4 -cetoesteroide α -reductasa (SRD5A2) o 5 α -reductasa (5 α R) con EC: 1.3.1.22, constituye el andrógeno natural que se une más efectivamente a su diana biológica, el receptor de andrógenos (RA). Una vez unida a éste, se produce la homodimerización del receptor resultando en un cambio conformacional que le permite translocarse al núcleo de la célula blanco, donde a

su vez, se une a secuencias específicas de reconocimiento del ADN, llamadas Elementos de Respuesta a Andrógenos (ERA), que dirigen la transcripción de genes necesarios para el crecimiento y el mantenimiento de las funciones prostáticas (Haendler & Cleve, 2012).

Una de las opciones terapéuticas más utilizadas en la actualidad para el tratamiento de la HPB sintomática es la cirugía, que al ser una terapia invasiva, afecta la calidad de vida del paciente debido a los problemas post-operatorios que se pueden presentar, entre ellos disfunción eréctil, limitación de la actividad física intensa e incontinencia urinaria (Cataño & Morales, 2009); es por esta razón que el tratamiento farmacológico ha adquirido mayor importancia porque podría ayudar a disminuir la necesidad de la cirugía (Fitzpatrick & Artibani, 2006). Debido que la HPB es una patología dependiente de andrógenos, en especial de DHT, las estrategias farmacológicas para su tratamiento se enfocan en la búsqueda de sustancias que disminuyan su biosíntesis (Bratoeff, Flores, Ramirez, & Valencia, 1997), siendo la inhibición de la enzima 5 α R, que lleva a cabo la reducción de la T a DHT uno de los blancos estratégicos para conseguirlo (Salvador, et al., 2013; Sarma & Wei, 2012; Uemura et al., 2007).

Existen diferentes isoformas de la 5 α R, encontrándose tanto en tejido normal como hiperplásico y canceroso. Las isoenzimas 5 α -reductasa tipo 1 (5 α R-I), 5 α -reductasa tipo 2 (5 α R-II) y la más recientemente identificada, la 5 α -reductasa tipo 3 (5 α R-III), tienen patrones de distribución específicos para diferentes tejidos y poseen propiedades fisicoquímicas y biológicas diferentes entre sí. La 5 α R-I se encuentra principalmente en tejido no genital, cuero cabelludo, glándulas sebáceas, hígado y cerebro; la 5 α R-II se expresa principalmente en la próstata, piel genital y vesículas seminales, y la 5 α R-III, se ha identificado en cáncer de próstata hormono-refractario (Uemura, et al., 2007). Dado que la 5 α R-II se encuentra distribuida principalmente en tejido prostático y se expresa en gran medida en próstata normal e hiperplásica, su inhibición constituye un blanco terapéutico adecuado para el tratamiento de la HPB sintomática (Uemura, et al., 2007).

En particular, las sustancias de naturaleza esteroidal al ser homólogas de las hormonas sexuales endógenas han servido como punto de partida para el diseño de inhibidores de la 5 α R (Poirier, 2008). A la fecha se conocen más de 23 grupos químicos de inhibidores (Aggarwal, Thareja, Bhardwaj, & Kumar, 2010a), siendo los de mayor eficacia clínica los 4-azaesteroides a los que pertenecen la finasterida y la dutasterida (Kurup, Garg, & Hansch, 2000; Nickel, 2004). La primera, inhibidor de la isoforma 2 y la segunda, inhibidor dual de las isoformas 1 y 2.

A pesar de su importancia clínica en el tratamiento de la HPB, estos dos inhibidores han mostrado efectos adversos de tipo hormonal como impotencia sexual, ginecomastia y disfunción eréctil (Pérez, Molina, Oyarzábal, & Mas-Ferreiro, 2011). Adicionalmente, en el año 2011, la Agencia de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos de América (FDA por sus siglas en inglés: *Food and Drug Administration*) notificó una alerta en la cual se hace mención a que el uso continuo de estos inhibidores puede incrementar el riesgo de desarrollar cáncer de próstata de alto grado Gleason, es decir agresivo (Thompson et al., 2003) y también de incrementar el riesgo potencial de cáncer de mama masculino (Shenoy & Prabhakar, 2010). Considerando las razones expuestas y que el tratamiento de la HPB con estos inhibidores es prolongado, profundizar en el conocimiento de la enzima 5 α R a fin de diseñar inhibidores novedosos con un mejor perfil de actividad y seguridad resulta una necesidad inminente (Pérez, et al., 2011; Schmidt & Tindall, 2011).

Diversos grupos de investigación (Aggarwal, Thareja, et al., 2010a; Aggarwal, Thareja, Bhardwaj, & Kumar, 2010b; Aggarwal, Thareja, Verma, Bhardwaj, & Kumar, 2010; Bratoeff, Cabeza, Pérez-Ornelas, Recillas, & Heuze, 2008; Pérez-Ornelas et al., 2005) incluyendo el Grupo de Investigación en Química Medicinal en donde se encuentra enmarcado el presente trabajo, se han dado a la tarea de diseñar, sintetizar y evaluar experimentalmente moléculas de naturaleza esteroidal con poder inhibitor de la 5 α R permitiendo establecer algunos requisitos estructurales para el diseño de sus inhibidores, entre los que se destacan:

- a) La entidad 5-en o 4-en-3-ona o 4,6-dien-3-ona como grupo farmacóforo deducidos a partir del mecanismo enzimático de la reducción de la T (Pérez-Ornelas, et al., 2005). La introducción de un átomo de halógeno sobre la posición 4 o 6 en estas entidades, aumenta la electrofilia de los dobles enlaces favoreciendo su reducción y por ende, se mejora la actividad (Aggarwal, Thareja, Verma, et al., 2010).
- b) Una amida lipofílica en el C17 tipo aril, ter-butil, ciclohexil o adamantil posiblemente actúan como auxóforo (Kurup et al., 2000) permitiendo establecer interacciones con un bolsillo hidrofóbico del sitio catalítico de la enzima, además de brindar estabilidad metabólica al inhibidor.

A pesar de que se han logrado avances importantes en el diseño de inhibidores por esta aproximación metodológica, a la fecha no se cuenta con inhibidores terapéuticamente

útiles, adicionales a la finasterida y dutasterida, en parte, porque el descubrimiento y desarrollo de nuevas moléculas de manera experimental constituye un proceso arduo que consume mucho tiempo y dinero (Escalona, Carrasco, & Padrón, 2005). Sin embargo, en la actualidad, el empleo de herramientas *in silico* para llevar a cabo el diseño de fármacos constituye una aproximación metodológica válida que se encuentra en auge por ser más económica y corta en tiempo que los procedimientos experimentales (Escalona, 2005) la cual ha permitido la obtención de entidades químicas activas novedosas como principios activos de medicamentos mejorados (Medina, López, & Castillo, 2006; Medina-Franco, Fernández-de Gortari, & Naveja, 2015). Las herramientas *in silico* se valen del uso de computadores para buscar, diseñar, optimizar y proponer moléculas nuevas con potencial terapéutico, permitiendo elegir las moléculas con mejor perfil terapéutico y de seguridad para continuar con los ensayos *in vitro* e *in vivo*. Una de sus estrategias de búsqueda es a través del acoplamiento molecular o *docking* mediante la cual se lleva a cabo el tamizaje (*screening*) de compuestos capaces de adaptarse tanto geométrica como químicamente a una determinada cavidad o sitio activo de una diana biológica midiendo su afinidad de unión hacia este sitio, teniendo como requisito indispensable el conocimiento tanto de la estructura tridimensional (3D) de la diana como la del compuesto a acoplarse (Medina, et al., 2006).

La determinación de la estructura 3D de una diana biológica de naturaleza proteica como la 5 α R-II, puede realizarse de manera experimental por Resonancia Magnética Nuclear o difracción de rayos X, o se puede predecir *in silico* (Chung & Subbiah, 1996). En este sentido, aunque se ha identificado de manera experimental la secuencia de aminoácidos de esta enzima, a la fecha no se ha determinado su estructura 3D experimental por tratarse de una proteína de membrana que no ha sido posible cristalizar para someterse a difracción de rayos X. Tampoco se ha podido acondicionar correctamente en solución o en estado sólido sin que se desnaturalice o sin que los lípidos de la membrana interfieran para su análisis por RMN (Marassi & Opella, 1998), por lo tanto, su predicción podría realizarse *in silico*. En este sentido, a la fecha no hay ningún estudio reportado orientado al establecimiento de su estructura 3D *in silico*. Por lo tanto, el presente estudio resulta original y contribuirá al estado del arte de este tema.

Las primeras aproximaciones que se han realizado para investigar cómo interactúa la 5 α R-II con sus inhibidores han tomado como base la estructura cristalina de la enzima 5 β -reductasa (5 β R) (Faragalla, Bremner, Brown, Griffith, & Heaton, 2003). También se han

realizado estudios de dinámica molecular para evaluar la estabilidad de la unión de algunos inhibidores tanto esteroidales como no esteroidales sobre el sitio activo de dicha enzima modelo (Wang, Liu, Zhou, Chen, & Ho, 2014). De manera adicional, se han hecho estudios que correlacionan la actividad inhibitoria de la 5 α R-II humana de una serie de inhibidores sintéticos con su estructura química por medio de un modelo basado en el ligando permitiendo generar un modelo de farmacóforo para esta enzima (Wang, et al., 2014). A pesar de todas estas aproximaciones, resulta indispensable contar con un modelo proteico 3D válido de la 5 α R-II humana para el diseño de sus inhibidores, por lo tanto, en el presente trabajo se recurrió al empleo de herramientas *in silico* para su predicción e validación inicial. Esto nos ayudará a entender cómo se lleva a cabo la interacción entre esta proteína y sus inhibidores, permitiéndonos complementar las investigaciones experimentales que hemos llevado a cabo en estos años y a la vez, contribuiremos con una diana farmacológica en 3D para realizar diseño *in silico* de inhibidores que constituyan alternativas novedosas de principios activos de medicamentos potencialmente mejorados para el tratamiento de la HPB, que como se mencionó, constituye un problema de salud pública en el entorno nacional y mundial (Kang, Imperato-McGinley, Zhu, & Rosenwaks, 2013).

Una vez predicho en este estudio el modelo 3D de la 5 α R-II humana, a futuro se llevará a cabo el *screening* virtual y la dinámica molecular de moléculas experimentales con actividad inhibitoria comprobada así como estudios de acoplamiento molecular que involucren al modelo, al cofactor NADPH y a la testosterona a fin de aportar más elementos para su validación y para entender mejor ya sea los diferentes tipos de interacciones dentro del sitio catalítico y la importancia de este cofactor durante el proceso enzimático.

Objetivos

Objetivo General

Predecir por modelado molecular la estructura terciaria de la enzima 5 α -Reductasa tipo II humana y realizar estudios de acoplamiento molecular sobre ésta con el fin de aportar un blanco de acción que sirva de base para el diseño *in silico* de fármacos.

Objetivos específicos

- Seleccionar el modelo de estructura primaria que servirá como base para la predicción de la enzima 5 α R-II humana.
- Obtener un modelo tridimensional de la enzima 5 α -reductasa tipo II humana que sea confiable para evaluar inhibidores con reconocida actividad experimental de la misma.
- Proponer un modelo de interacción entre la 5 α R-II y varios inhibidores que expliquen la actividad biológica de la enzima.

1. Marco Teórico

1.1 Hiperplasia Prostática Benigna (HPB)

La hiperplasia prostática benigna (HPB) es un diagnóstico histológico que se refiere a la proliferación de músculo liso y células epiteliales de la próstata. La etiología exacta es desconocida, sin embargo, la similitud entre la HPB y la morfogénesis embrionaria de la próstata ha llevado a la hipótesis de que la HPB puede ser el resultado de un "despertar" en la edad adulta de los procesos de inducción embrionarios (McVary & Roehrborn, 2010).

La HPB se considera una parte normal del proceso de envejecimiento en los hombres y depende hormonalmente de la testosterona (T) y de su reducción a dihidrotestosterona (DHT) (Deters & Raymond, 2014). La disfunción en la micción y la consecuente obstrucción de la salida vesical (BOO) resulta del agrandamiento de la próstata constituyéndose en uno de los síntomas del tracto urinario inferior (STUI), referido comúnmente como prostatismo, aunque este término ha disminuido en popularidad. No todos los hombres con HPB sufren de STUI y viceversa. Sin embargo, aproximadamente la mitad de los hombres diagnosticados con BPH histopatológico mostraron STUI de moderados a graves (Deters & Raymond, 2014).

1.1.1 Anatomía

La próstata es una glándula del sistema reproductivo masculino del tamaño de una nuez, produce el líquido alcalino que transporta los espermatozoides durante la eyaculación. Comprende aproximadamente el 70% del volumen seminal. Las secreciones producen la lubricación y la nutrición de los espermatozoides (McVary & Roehrborn, 2010).

La próstata se encuentra por delante del recto y justo distal a la vejiga urinaria conectándose directamente con la uretra del pene (Deters & Raymond, 2014). Dicha glándula, rodea la uretra que es el tubo a través del cual la orina sale del cuerpo (Miller, 2014). La HPB se origina en la zona de transición, que rodea la uretra (**Figura 1-1**).

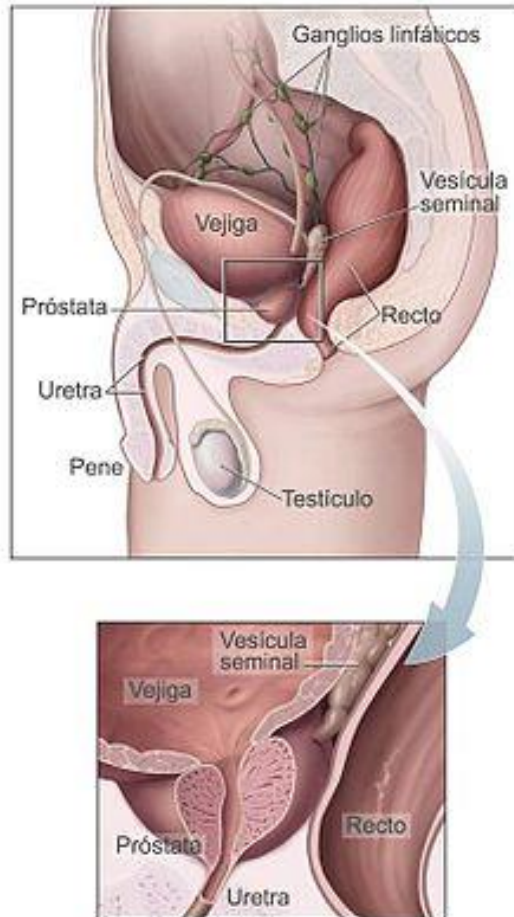


Figura 1-1. Ubicación anatómica de la próstata (Haafring, 2015).

1.1.2 Fisiopatología

Como se ha indicado, el agrandamiento prostático depende del andrógeno DHT. La enzima $5\alpha R-II$ reduce la T circulante en DHT, la cual funciona a nivel local y no sistémico (Deters & Raymond, 2014). A su vez, la DHT se une al receptor de andrógenos (RA) en el núcleo celular produciendo el crecimiento celular que conlleva a la HPB.

Estudios *in vitro* han demostrado que un gran número de receptores alfa-1-adrenérgicos se encuentran también en el músculo liso del estroma y de la cápsula de la próstata, así como en el cuello de la vejiga. La estimulación de estos receptores provoca un aumento en el tono del músculo liso y vasoconstricción del mismo, por esta razón el bloqueo de estos receptores de forma reversible relaja estos músculos y alivia de manera paliativa los STUI (Fine & Ginsberg, 2008; Gonzáles, et al., 2007).

Microscópicamente, la HBP se caracteriza como un proceso hiperplásico donde se observa la presencia de infiltrado inflamatorio celular mononuclear (ICL) en forma constante en el adenoma prostático. Por un lado, se estimulan los factores de crecimiento al producirse linfocinas y por otro se activa la cadena del ácido araquidónico (Vela-Navarrete et al., 2002). Se ha evidenciado que la lesión inicial es el nódulo mixoide¹ con una matriz celular abundante, rica en mucopolisacáridos, y con una densidad celular escasa, correspondiente a elementos fibroblásticos que no se encuentran modificados desde el punto de vista funcional ni fenotípico, seguido de un aumento de la vascularización capilar y la maduración morfológica y funcional de los fibroblastos (Manzarbeitia, Vela-Navarrete, & Fernández-Aceñero, 2010)

El agrandamiento de la próstata puede restringir el flujo de orina desde la vejiga, dando como resultado las manifestaciones clínicas de la HPB. La próstata se agranda con la edad de forma hormonalmente dependiente. Se ha podido observar que los machos sometidos a castración no desarrollan HPB, además en estudios realizados por Imperato-McGinley (2002) se encontró que los individuos con mutación en la isoenzima 5 α R-II presentan pseudohermafroditismo² con niveles normales de T y niveles disminuidos de DHT y que además tampoco desarrollan HPB a lo largo de su vida, lo que confirma que el andrógeno endógeno que juega el papel principal para el desarrollo de la HPB es la DHT (Imperato-McGinley & Zhu, 2002; Zhu & Imperato-McGinley, 2009). La teoría tradicional detrás de la HBP es que, como la próstata se agranda por efecto de la DHT, la cápsula que la rodea evita que se expanda radialmente, resultando potencialmente en la compresión de la uretra (Seftel, Rosen, Rosenberg, & Sadovsky, 2008).

El factor de riesgo más importante para el desarrollo de la HPB es la edad en todos los grupos étnicos afectando a hombres mayores de 45 años. Además de la edad, la obesidad abdominal aumenta en un 10% el riesgo de sufrirla al igual que la elevada ingesta de grasas y proteínas de origen animal se ha asociado a un aumento de su progresión (Consejo de Salubridad General, 2009).

¹ Mixoma: Es una neoplasia benigna derivada de tejido conjuntivo consistente principalmente en células poliédricas y estrelladas enclavadas en forma poco compacta en una matriz blanda mucoidal por lo que parece tejido mesenquimático primitivo.

² Pseudohermafroditismo consiste en padecer la anomalía física o trastorno de la diferenciación sexual de tener la constitución genética de un sexo y los órganos genitales de otro.

1.1.3 Incidencia

La HPB es un problema de salud pública que afecta aproximadamente a un tercio de los hombres mayores de 50 años. A nivel mundial, aproximadamente 30 millones de hombres tienen síntomas relacionados con la HPB (Deters & Raymond, 2014). Los estudios epidemiológicos indican que con el paso de los años se aumenta la prevalencia de esta enfermedad, observándose en un 50% de los hombres a los 60 años de edad y en un 90% a los 85 años. En Colombia, para el 2005 la prevalencia de HPB se estimaba en 260 por cada 1000 hombres (González, et al., 2007).

1.1.4 Tratamiento

Las terapias para el tratamiento de la HPB van desde la observación médica para pacientes asintomáticos hasta la intervención quirúrgica (resección trans-uretral de la próstata o adenomectomía abierta según el caso), pasando por intervenciones mínimamente invasivas como los tratamientos con microondas hasta opciones farmacológicas como son los bloqueadores alfa 1 adrenérgicos y los inhibidores de 5 α R cuyas características y aplicabilidad se mencionarán más adelante.

La correcta elección del tratamiento debe realizarse objetivamente evaluando los síntomas, teniendo en cuenta las guías de manejo de la HPB de la Asociación Americana de Urología (AAU), las cuales se basan en el Puntaje Internacional de Síntomas Prostáticos (IPSS) (**Tabla 1-1**) que se aplica a pacientes con sospecha de HPB en conjunto con los resultados del examen físico y el valor del antígeno prostático específico (APS) (González, et al., 2007; Gómez, Valero, Guzmán, & Cagua, 2000).

Tabla 1-1. Puntaje internacional de síntomas prostáticos (IPSS) (Consejo de Salubridad General, 2009).

Ocurrencia		Nunca	Menos de 1 de cada 5 veces	Menos de la mitad de las veces	Alrededor de la mitad de las veces	Más de la mitad de las veces	Casi siempre	PUNTAJE
No.	Síntoma							
1	Durante el último mes, ¿Cuántas veces ha tenido la sensación de no vaciar completamente la vejiga después de orinar?	0	1	2	3	4	5	
2	Durante el último mes, ¿Cuántas veces ha tenido que volver a orinar en menos de dos horas después de la última vez que orinó?	0	1	2	3	4	5	
3	Durante el último mes, ¿Cuántas veces ha notado que empezando a orinar el chorro se detiene y vuelve a empezar?	0	1	2	3	4	5	
4	Durante el último mes, ¿Cuántas veces ha tenido dificultad para aguantarse las ganas de orinar?	0	1	2	3	4	5	
5	Durante el último mes, ¿Cuántas veces ha notado que orina sin fuerza?	0	1	2	3	4	5	
6	Durante el último mes, ¿Cuántas veces ha tenido que esforzarse para comenzar a orinar?	0	1	2	3	4	5	
7	Durante el último mes, ¿Cuántas veces ha tenido que levantarse a orinar entre la hora de acostarse y la hora de levantarse?	0	1	2	3	4	5	

Puntuación: < 8 puntos = Leve. 8 a 9 puntos = Moderada. > 20 puntos = Severa.

1.1.4.1 Tratamiento Quirúrgico

- **Resección trans-uretral de la próstata RTUP**

A partir del año 1909 y hasta finales de 1990, el tratamiento de primera elección para los síntomas de HPB era la resección trans-uretral de la próstata RTUP que fue la primera intervención quirúrgica exitosa mínimamente invasiva de la era moderna. Al día de hoy,

sigue siendo la terapia estándar de oro para la HPB siendo a la vez el tratamiento quirúrgico de elección cuando otros métodos como los farmacológicos fallan (McConnell, Barry, & Bruskewitz, 1994; Panel, 1994).

Los criterios para la realización de la RTUP ahora son más estrictos pues en general, se reserva para pacientes con HBP sintomática que presenten retención urinaria crónica, y que el tratamiento farmacológico y otros procedimientos quirúrgicos prostáticos menos invasivos como la terapia trans-uretral con microondas (TUMT) o la vigilancia hayan fracasado. Adicionalmente, estos pacientes padecen de azotemia o insuficiencia renal debido a la obstrucción prostática o poseen los síntomas más severos de prostatismo.

La cirugía en términos generales consiste en introducir un instrumento llamado resectoscopio (**Figura 1-2**) dentro del canal de la uretra, el cual cuenta con luz y permite irrigar la zona mientras se realiza el procedimiento (**Figura 1-3**). 1. El instrumento tiene un asa eléctrica, que permite cortar la próstata en láminas pequeñas y cauterizar los vasos sanguíneos prostáticos (**Figura 1-3 A**). La laminillas se retiran de la vejiga y se envían a laboratorio para su análisis y se inserta un catéter mientras la zona se recupera (**Figura 1-3 B**). Después, la orina puede fluir por la zona (**Figura 1-3 C**). Al final de la intervención se coloca usualmente una sonda para lavado continuo, dentro de la vejiga (Bella, 2002).

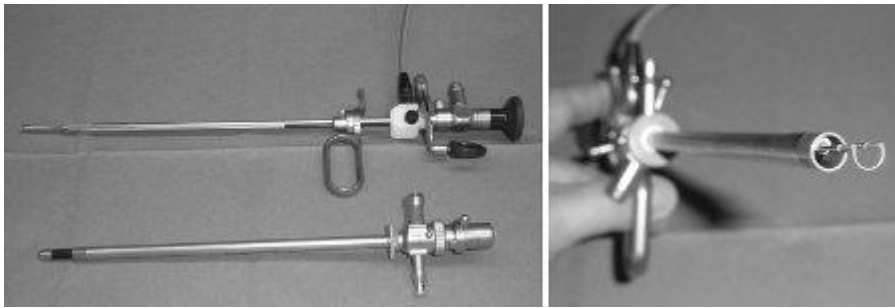


Figura 1-2. Resectoscopio: instrumento para la resección trans-uretral de la próstata (Alschibaja, May, Treiber, Paul, & Hartung, 2005).

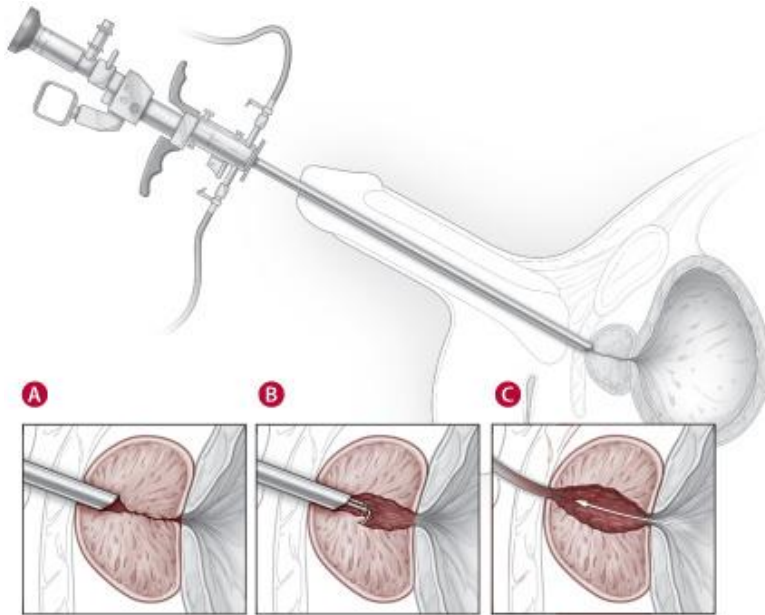


Figura 1-3. Procedimiento de resección trans-uretral de la próstata ("Harvard experts discuss surgical options for benign prostatic hyperplasia - Harvard Prostate Knowledge," 2007).

La edad media de los pacientes actualmente en fase de RTU es aproximadamente 69 años, y el promedio de tejido prostático resecado es de 22 g. Los factores de riesgo asociados con una mayor morbilidad incluyen próstatas mayores de 45 g y el tiempo operatorio de más de 90 minutos. La tasa de riesgo a 5 años para una re-intervención tras RTU es de aproximadamente 5%. Las tasas de mortalidad global después de la RTUP por un cirujano experto son prácticamente nulas (Kang et al., 2004).

1.1.4.2 Tratamientos mínimamente invasivos

- ***Tratamiento con microondas***

El objetivo es aplicar calor a la próstata mediante microondas. Una pequeña antena de microondas en el extremo de un catéter flexible se introduce a la próstata logrando las temperaturas deseadas ("Urología Multidisciplinaria: Hiperplasia prostática benigna," 2015).

- ***Ablación Trans-uretral por Aguja (Transurethral Needle Ablation TUNA)***

Igual que el método anterior, tiene como objetivo elevar la temperatura dentro de la próstata. Una aguja delgada es introducida a la próstata con la ayuda de visión directa

mediante un cistoscopio. La temperatura deseada se alcanza mediante radiofrecuencia que calientan el extremo de la aguja ("Urología Multidisciplinaria: Hiperplasia prostática benigna," 2015).

Los tratamientos mínimamente invasivos tienen la ventaja con respecto a la cirugía que es bajo el riesgo de complicaciones serias después del procedimiento, pero tienen la desventaja de requerir una sonda en la vejiga por varios días y los síntomas no mejoran inmediatamente, además que del 10 al 20% de los pacientes a los 2 o 3 años pueden requerir terapia adicional. Adicionalmente, la mayoría de los pacientes podrán tener urgencia o frecuencia para orinar por algún tiempo ("Urología Multidisciplinaria: Hiperplasia prostática benigna," 2015).

1.1.4.3 Tratamiento Farmacológico

Hay 2 tipos principales de tratamientos farmacológicos que pueden mejorar los síntomas de la HPB. En algunos casos, pueden darse ambos medicamentos (terapia combinada), que será explicada a continuación.

- ***Medicamentos que relajan la musculatura de la próstata***

Estos medicamentos son los bloqueadores alfa adrenérgicos, se cree que un componente significativo de los STUI secundarios a HBP, están relacionados con la presión que ejerce el agrandamiento de la próstata sobre el músculo liso en el estroma de la próstata, la uretra y el cuello de la vejiga. La vasopresión del músculo liso está mediada por los receptores alfa-1-adrenérgicos (α_1). Por lo tanto, los agentes que bloqueen este receptor deberían disminuir la resistencia a lo largo del cuello de la vejiga, de la próstata y de la uretra al relajar el músculo liso permitiendo el paso de la orina (Deters & Raymond, 2014).

Los 3 subtipos del receptor alfa-1 incluyen 1a, 1b, y 1c. De éstos, el receptor alfa-1a es el que se encuentra específicamente en el cuello de la vejiga y de la próstata. Algunos ejemplos de fármacos bloqueadores alfa-1-adrenérgicos son la alfuzocina, doxazosina, tamsulosina y terazosina (Deters & Raymond, 2014). Aunque éstos cuatro medicamentos son igual de efectivos, hay ligera diferencia en cuanto a los efectos secundarios y las indicaciones. Las ventajas que presentan están relacionadas con una mejoría moderada de los síntomas de la HPB. Sin embargo, no atacan como tal la causa de la HPB

consistente en el agrandamiento de la próstata, además presentan la desventaja de tener efectos secundarios que podrán ser diferentes dependientes del medicamento utilizado. Efectos secundarios comunes son: problemas estomacales o intestinales, congestión nasal, dolor de cabeza, mareo, cansancio (Deters & Raymond, 2014). Un porcentaje menor de pacientes puede llegar a tener disminución en la presión arterial y trastornos de la eyaculación dado su efecto alfa-1a periférico. Adicionalmente, se ha reportado que la administración aguda de tamsulosina afecta los volúmenes de la eyaculación causando una reducción en el volumen de eyaculación hasta una eyaculación nula (Hellstrom & Sikka, 2006). Las directrices AUA (2010) afirman que los bloqueadores alfa-1a adrenérgicos siguen siendo opciones razonables para los pacientes con STUI moderados a severos ocasionados por HBP (McVary et al., 2011).

▪ ***Medicamentos que disminuyen el tamaño prostático***

Estos son los inhibidores de la enzima 5- α -reductasa que se recomiendan cuando la próstata está aumentada de tamaño. Adicionalmente, reducen a la mitad el valor del APS. La ventaja principal de estos inhibidores es que disminuyen el riesgo de que haya una retención aguda de orina, así como el riesgo de un procedimiento quirúrgico futuro y brindan una mejoría sintomática moderada ("Urología Multidisciplinaria: Hiperplasia prostática benigna," 2015). Sin embargo presentan la desventaja de que los síntomas obstructivos se ven modificados hasta los 3 ó 6 meses luego de iniciada la terapia. También presenta efectos secundarios como dificultad para lograr una erección, disminución de la libido o deseo sexual, así como un menor volumen de eyaculado. Tanto las características como la aplicabilidad de estos agentes se discutirán en el apartado donde se profundice sobre dicha enzima.

▪ ***Terapia combinada***

En esta terapia se utilizan antagonistas α -adrenérgicos con inhibidores de la 5 α reductasa. Se emplea para próstatas aumentadas de tamaño con síntomas obstructivos (Chung & Kaplan, 2010). El tomar ambos medicamentos generalmente proporciona una moderada mejoría y disminuye el riesgo de que la enfermedad aumente y empeore la condición. En pacientes con próstatas grandes, la terapia combinada es muy efectiva para prevenir problemas agudos (retención urinaria) y en cierta forma puede reducir la

necesidad de cirugía en un futuro. Como desventajas se puede presentar que el paciente puede sentir los efectos secundarios de ambos tratamientos (Chung & Kaplan, 2010).

1.2 La enzima 5 α -reductasa (5 α R) y su papel biológico en el organismo

En condiciones normales, tanto el desarrollo como la maduración y función de la glándula prostática depende de los andrógenos u hormonas sexuales masculinas. Del mismo modo, se ha podido establecer que la HPB también depende de ellos. Sin embargo, el principal andrógeno responsable de estos eventos no es la T sino la DHT. Durante el desarrollo embrionario, los testículos fetales se diferencian bajo la influencia del cromosoma Y y sintetizan testosterona, lo que resulta en la diferenciación de la próstata y en el desarrollo de los genitales externos masculinos (Schmidt & Tindall, 2011). Sin embargo, la próstata comienza a diferenciarse a las 10 semanas de gestación bajo la influencia de la DHT por lo cual ambos andrógenos están involucrados en su desarrollo, maduración y función. La T se encuentra presente principalmente en la circulación, y la DHT en tejidos prostáticos (Schmidt & Tindall, 2011). Las células de Leydig en los testículos, producen del 90-95% de la T circulante, y un 5-10% es biosintetizada en las glándulas suprarrenales. La DHT surge principalmente de la conversión de T a DHT mediante las isoformas la 5 α R-I y 5 α R-II (Russell & Wilson, 1994).

Los andrógenos funcionan principalmente a través de su acción sobre el receptor de andrógenos (RA), un miembro de la familia de receptores de hormonas esteroides de factores de transcripción activados por ligando nuclear (Schmidt & Tindall, 2011). En comparación con la testosterona, la DHT se une al RA de una manera más estable, lo que lleva a un aumento de 10 veces en su activación transcripcional haciendo de la DHT, el ligando primario de la señalización mediada por el RA a nivel tisular (Harris, Mostaghel, Nelson, & Montgomery, 2009).

El RA se encuentra en el citoplasma, unido a las proteínas chaperonas de choque térmico, que lo estabilizan y le permiten la unión de los andrógenos. Tras la interacción con el ligando, se produce la dimerización y fosforilación del RA, seguido de su translocación al núcleo, donde se une a regiones específicas del ADN, conocidas como elementos de respuesta a andrógenos (ERA) que finalmente conducen a la síntesis proteica y por ende, a la respuesta androgénica (**Figura 1-4**) (Harris, et al., 2009).

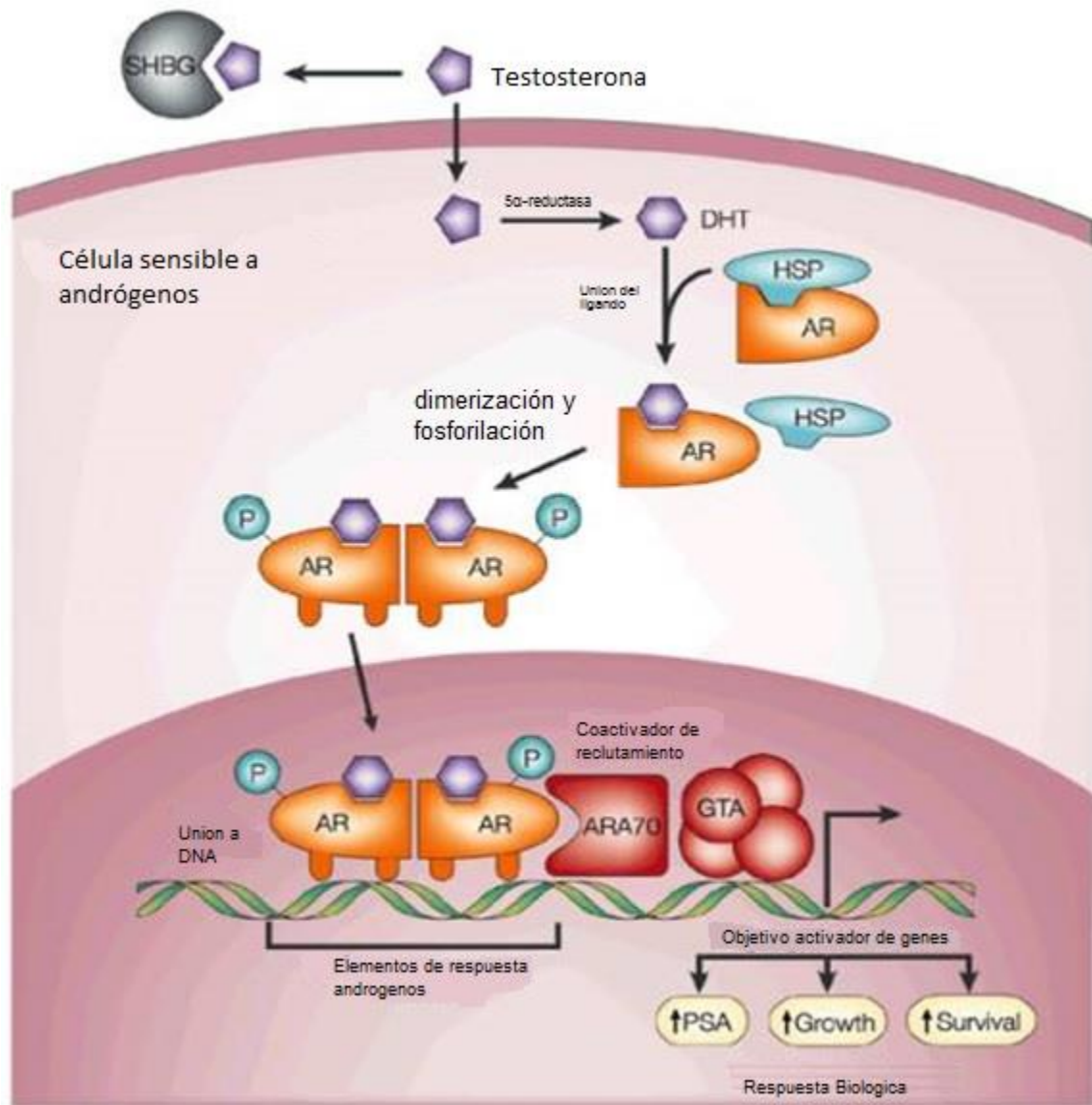


Figura 1-4. Mecanismo molecular de activación del receptor de andrógenos (Harris, et al., 2009).

La testosterona, se convierte en DHT por la enzima 5- Δ^4 -cetoesteroide α -reductasa (SRD5A2) también nombrada como 5 α -Reductasa o con EC:1.3.1.22. Esta enzima se caracterizó inicialmente en el año 1950 en cortes de hígado de ratas identificando su capacidad para convertir desoxicorticosterona a su metabolito 5 α reducido (Russell & Wilson, 1994). Trabajos posteriores, determinaron que esta enzima es capaz de metabolizar una variedad de sustratos esteroidales y que utilizaba el nucleótido de piridina

reducido como co-factor (Harris, et al., 2009). Sin embargo, en estos primeros estudios era incierto si solo era esta enzima o múltiples enzimas las responsables de las reducciones esteroidales. En los años 60s, se pudo documentar que la DHT es un andrógeno más potente que la T en bioensayos realizados sobre próstata. Se administró T radiomarcada a ratas y se identificó una acumulación de DHT en los núcleos de la próstata ventral (Russell & Wilson, 1994) lo cual significó evidenciar que este andrógeno es el responsable del desarrollo prostático por lo tanto, está implicado en el progreso de la HPB.

Hoy se conoce que en los humanos, las enzimas que catalizan la reducción estereoespecífica e irreversible de una molécula de un 3-oxo-4-en-esteroide a su metabolito 5 α -reducido es la enzima 5- Δ^4 cetosteroide α -reductasa también llamada 5 α -reductasa (5 α R; EC:1.3.1.22).

La enzima 5 α R, es una proteína microsomal anclada a la membrana citoplasmática y es dependiente de NADPH. Actúa sobre hormonas esteroidales que poseen en su estructura un grupo ceto en C3 y un doble enlace sobre C4-C5 del anillo esteroidal A, incluyendo a los andrógenos, glucocorticoides y mineralocorticoides (Russell & Wilson, 1994). La reacción que lleva a cabo es estereroespecifica resultando en la reducción del doble enlace $\Delta^{4,5}$ y en la formación del respectivo 5 α -metabolito reducido (**Figura 1-5**).

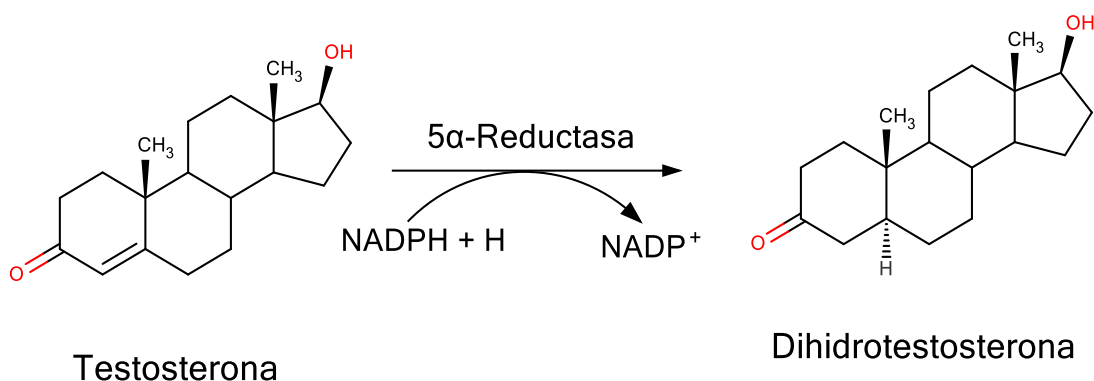
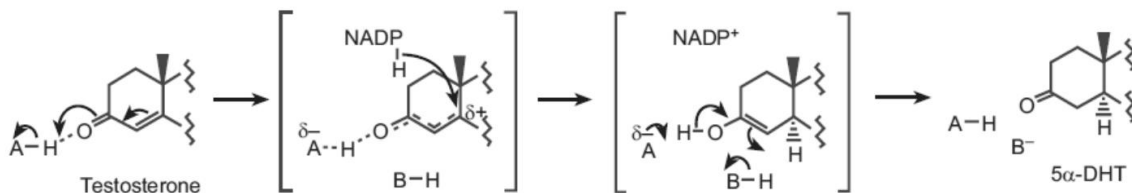


Figura 1-5. Conversión de testosterona a dihidrotestosterona por medio de la 5 α R (Russell & Wilson, 1994).

El mecanismo de reducción se lleva a cabo por la formación de un carbocatión intermediario que involucra la protonación del grupo ceto en C3 que sirve como ácido, y luego se transfiere un hidruro del NADPH a la posición C5, dándose la tautomerización del enol resultante y la protonación del C4 generando el producto (**Figura 1-6**).



A = ácido; B= base

Figura 1-6. Mecanismo propuesto para la reacción catalizada por la 5 α R (Jin & Penning, 2001).

Ha sido estudiado el papel que juegan las dos isoformas de la 5 α R en tejido normal, durante el desarrollo y maduración del cerebro y se ha demostrado que la 5 α R-I se expresa constitutivamente en el sistema nervioso central durante todas las etapas del desarrollo cerebral (Torres & Ortega, 2003).

Por otro lado, los folículos pilosos expresan la 5 α R-II. La activación de ésta, desempeña un papel en la pérdida de cabello. La finasterida puede evitar en cierto grado de pérdida de cabello. Además, algunos estudios sugieren una asociación entre la HPB y el patrón de calvicie masculina (Steers, 2001).

1.2.1 Isoformas de la enzima 5 α -reductasa

Dos isoformas de 5 α -R han sido identificadas en los seres humanos, ratas, ratones y monos, y se conocen como tipo 1 (5 α R-I) y tipo 2 (5 α R-II). Son proteínas de baja abundancia compuestas de 259 y 254 aminoácidos con pesos moleculares predichos de 29 y 28 kDa respectivamente (Schmidt & Tindall, 2011).

Aunque las isoenzimas de la 5 α R son proteínas de membrana que catalizan la misma reacción, comparten solamente un grado limitado de homología en la secuencia de aminoácidos. El promedio de identidad de secuencia entre estas isoenzimas dentro de una especie determinada es aproximadamente del 47%, mientras que la identidad entre la

misma isoenzima entre la de la especie humana y de rata es del 60% para 5 α R-I y 77% para 5 α R-II (Jin & Penning, 2001). Esto nos muestra que por el grado de conservación de la enzima con estos porcentajes de identidad sería posible utilizar alguna isoenzima de otra especie que se encontrara cristalizada como plantilla para el desarrollo del modelo de la isoforma desconocida.

La 5 α R-I se ubica predominantemente en piel no genital, hígado y hueso, mientras que la 5 α R-II está principalmente en el tejido urogenital en hombres y en piel genital tanto de hombres como mujeres (**Figura 1-7** y **Tabla 1 2**) (Steers, 2001).

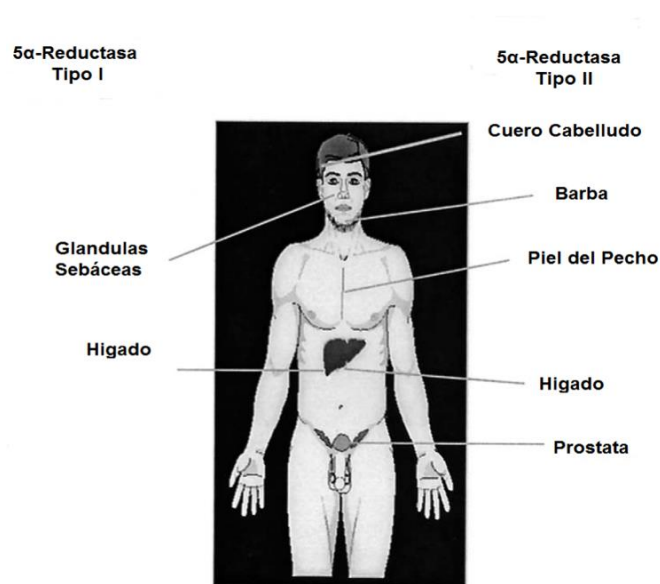


Figura 1-7. Distribución de las isoformas de la enzima 5 α -reductasa en el hombre (Steers, 2001).

Tabla 1-2. Propiedades de las principales isoformas de la enzima 5 α -reductasa (5 α R) (Schmidt & Tindall, 2011).

Propiedad	Isoforma	
	5 α R-I	5 α R-II
Tamaño (aminoácidos)	259	254
Peso molecular (kDa)	29.5	28.4
Estado bioquímico	Hidrofóbico	Hidrofóbico
Distribución tisular	Hígado, piel, cerebro, ovario, próstata, testículos	Próstata, epidídimo, vesículas seminales, piel de área genital, útero, mama, folículo piloso, placenta, testículos
Expresión en próstata	Normal (bajo), HPB y CP (alto)	Normal e HPB (alto), CP (alto)
Gen codificante	5RD5A1	5RD5A2

La 5 α R-I se expresa en la piel y el hígado. La DHT en el suero refleja la conversión de T por la 5 α R-I en el hígado y su conversión en la próstata por la acción de la 5 α R-II. La 5 α -reductasa de tipo 2 predomina en la próstata (**Figura 1-7**). Mediante técnicas de hibridación *in situ*³ y estudios de localización inmunohistoquímica⁴ se identificó que la 5 α R-II se expresa en las células del estroma y del epitelio basal de la próstata y que está ausente en las células acinares epiteliales ductales de dicha glándula. Por ejemplo, las células epiteliales en el epidídimo expresan la 5 α R-I, mientras que en el estroma se expresa la 5 α R-II (Schmidt & Tindall, 2011).

La región C-terminal de la 5 α R está altamente conservada entre las dos isoformas y algunos residuos, tales como Histidina (H) en posición 232, es probable que sean responsables de la actividad catalítica. Se ha sugerido que la región N-terminal es hidrofóbica y podría reaccionar con cadenas laterales de naturaleza alifática y aromática de los sustratos. Además, algunos autores sugieren que la región N-terminal y el residuo H en posición 296 podrían tener un papel crítico en la actividad 5 α R ya que las mutaciones en ambos sitios abolen su actividad (Andriole et al., 2010; Nickel et al., 2011; Uemura, et

³ **Hibridación *in situ*** es una técnica que detecta secuencias de ácidos nucleicos en células, cromosomas o tejidos preservados. La hibridación *in situ* toma como fundamento la complementariedad de los ácidos nucleicos, la cual puede ser ADN y/o ARN, a través de puentes de hidrógeno formados entre las bases: adenina–timina (ADN) o uracilo (ARN) y citosina-guanina (ADN y ARN).

⁴ **Inmunohistoquímica:** es una prueba de laboratorio para la que se usan anticuerpos para identificar ciertos antígenos en una muestra de tejido. Por lo general, el anticuerpo se une a una sustancia radiactiva o a un tinte que hace que los antígenos en el tejido se iluminen al microscopio.

al., 2007). A pesar de que las isoformas 5 α R comparten gran similitud de secuencia y son proteínas integrales de membrana, existen algunas diferencias químicas importantes entre ellas. Así por ejemplo, la 5 α R-I tiene un amplio rango de pH entre 6,0 y 8,5, mientras que 5 α R-II tiene un pH óptimo de 5,0 a 5,5 y la 5 α R-III parece ser eficaz a pH 6,9 (Heinlein & Chang, 2002; Uemura, et al., 2007). Bajo condiciones óptimas, 5 α R-II tiene una mayor afinidad por sustratos esteroides que 5 α R-I (Andersson, Berman, Jenkins, & Russell, 1991).

También se ha identificado la isoenzima 5 α R-III, en células de cáncer de próstata resistente a la castración (CRPC), que se puede presentar en algunos pacientes que están siendo tratados con terapia supresora de andrógenos, y que después de un tiempo de tratamiento ya no se responde a terapia de supresión (Amaral, Macedo, Fernandes, & Costa, 2011). El encontrar la enzima en esta condición patológica podría permitir utilizarla como un biomarcador de la enfermedad, y conocer de una mejor manera los mecanismos moleculares que subyacen por la producción de esta enzima y la progresión de CRPC, contribuyendo en el desarrollo de nuevas terapias para este tipo de CP (Schmidt & Tindall, 2011; Uemura, et al., 2007).

1.2.2 Inhibidores de la enzima 5 α -reductasa

El conocimiento de cómo la actividad de la 5 α R regula el crecimiento de la próstata, ha permitido el desarrollo de fármacos para el tratamiento y control de los síntomas de la BPH y prevención de la retención urinaria (Steers, 2001). La inhibición de la 5 α R-II bloquea la conversión de testosterona a DHT, lo que resulta en niveles intra-prostáticos de DHT más bajos conduciendo a la disminución del crecimiento de la próstata, a un aumento en la apoptosis y a su involución (Uemura, et al., 2007). Dado que la inhibición de la 5 α R causa una marcada reducción de los niveles de DHT intra-prostática, pero no de T, esto se refleja en una menor pérdida de funciones sexuales masculinas cuando éste se encuentra bajo tratamiento, consiguiendo una mejor adhesión al tratamiento. Además, como los inhibidores mejoran los STUI porque causan disminución del tamaño de la próstata, los pacientes que presentan próstatas más grandes pueden lograr un mayor beneficio terapéutico requiriendo de solamente de 6 meses de terapia (Deters & Raymond, 2014).

De las isoenzimas de la 5 α R caracterizadas a la fecha, solo se conoce su secuencia de aminoácidos, por esta razón, el diseño de inhibidores novedosos que permitan combatir la

HPB se encuentra restringido. Dada la naturaleza inestable de la enzima 5 α R, ha sido difícil su purificación y cristalización, por lo tanto, no se ha podido determinar su estructura tridimensional (Aggarwal, Thareja, Verma, et al., 2010). Sus primeros inhibidores han sido diseñados por modificación estructural de sustratos naturales, en especial tomando como base compuestos de naturaleza esteroidea. En esta búsqueda de inhibidores, Merck en el año 1980 informó sobre una serie de 4-azaesteroides, donde el C-4 de 3-oxo-5 α -esteroides fue reemplazado por un átomo de nitrógeno, estos compuestos mostraron efecto inhibidor *in vivo* considerable.

Los azaesteroides fueron diseñados con la finalidad de imitar el intermediario de reacción enolato formado durante el proceso de reducción enzimática requiriendo de algunas características estructurales claves para inhibir la 5 α -reductasa entre ellos, la presencia de una entidad 4-en-3-ona y una cadena lateral en C17 de configuración β con uno o más átomos de oxígeno. En búsqueda de un inhibidor no reducible de 5 α R Merck et al., (1980) informó sobre una serie de 4-azaesteroides donde el C-4 de la entidad 3-oxo-5 α -esteroide fue reemplazada por nitrógeno. Los estudios mostraron un aumento en la actividad inhibidora *in vivo* concluyendo que las características estructurales más importantes para la función de los 4-azaesteroides como inhibidores de la 5 α R son las que se encuentran resumidas en la **Figura 1-8**.

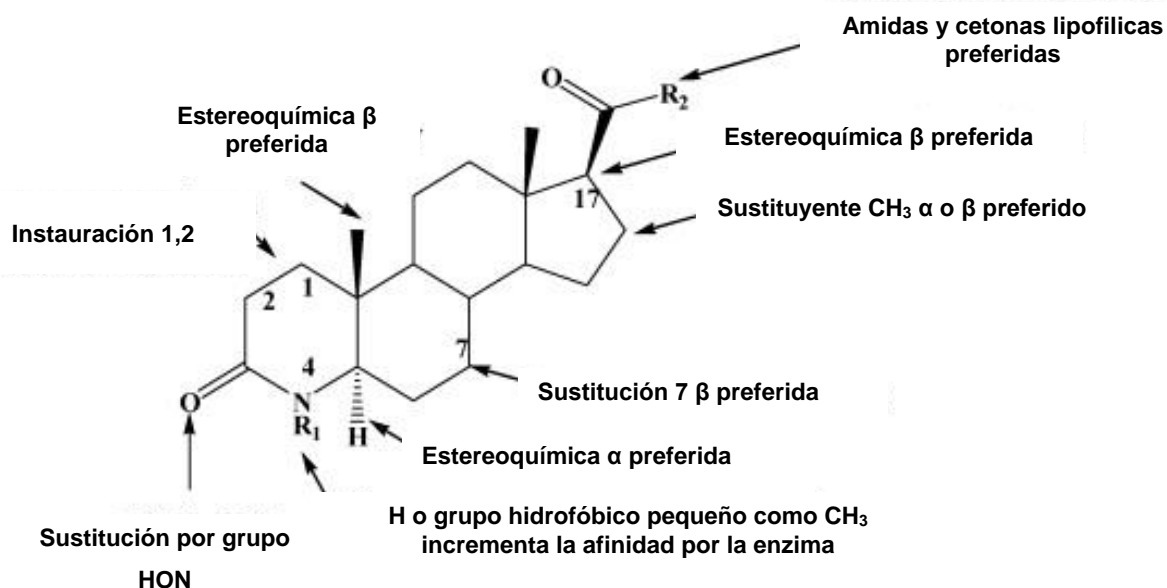


Figura 1-8. Relaciones estructura actividad de los 4-azaesteroides (Aggarwal, Thareja, Verma, et al., 2010).

La acción de los inhibidores se basa en la introducción de una lactama en el anillo A de los esteroides para imitar el estado de transición enol del complejo enzima-sustrato-NADPH (**Figura 1-9**). Además, la sustitución en C-17 se ha encontrado para mejorar la potencia mediante la unión a un bolsillo lipófilo sobre la enzima (Aggarwal, Thareja, Verma, et al., 2010).

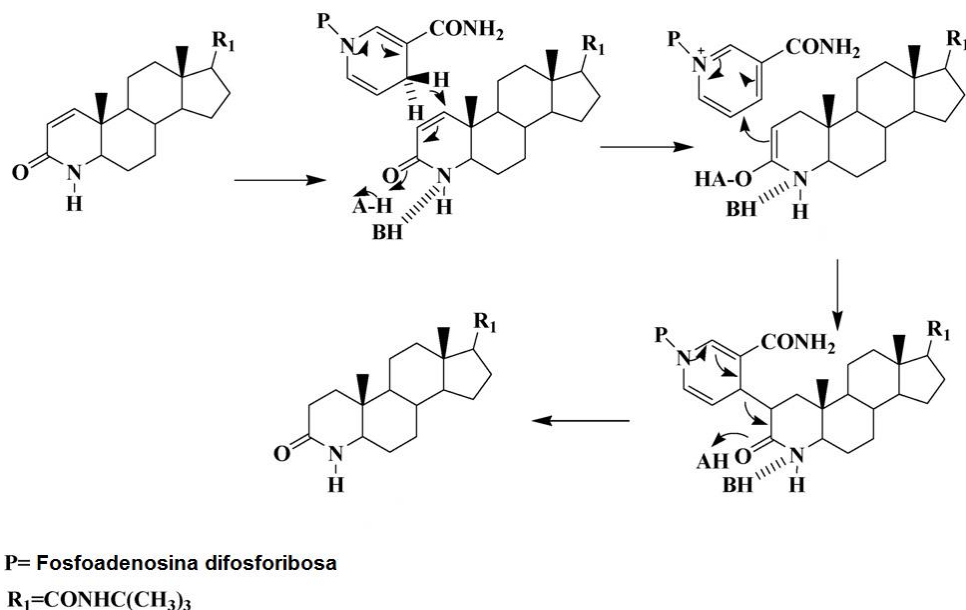


Figura 1-9. Mecanismo de inhibición de la finasterida sobre la 5 α R (Aggarwal, Thareja, Verma, et al., 2010).

Entre los azaesteroides, que han sido los inhibidores de la 5 α R más efectivos hasta el momento para el tratamiento de la HPB tenemos la finasterida y la dutasterida (**Figura 1-10**). La finasterida (Proscar®) fue el primer inhibidor de la 5 α R aprobado por la FDA en 1992 (Robertson, 2010). Es un 4-aza-esteroide que ha demostrado actividad como inhibidor suicida de la 5 α R-II, lo que resulta en la inhibición de la formación del complejo DHT-5 α R. En el mecanismo de reducción, la finasterida se une a la enzima y se lleva a cabo la transferencia de hidruro a partir del cofactor NADPH al doble enlace de la posición Δ^1 . El enolato resultante sufre tautomerización en el sitio activo de la enzima para formar un análogo del bisustrato el cual consiste en la unión a la enzima de la finasterida y no la testosterona el andrógeno endógeno, en el que la dihidrofinasterida formada se une covalentemente al NADPH⁺ (Salvador, et al., 2013). Este efecto provoca una marcada disminución en la concentración de DHT intra-prostática resultando en la disminución constante del tamaño de la próstata. Una tercera parte de los hombres tratados con este agente exhiben mejoras en el flujo de orina y en otros síntomas (Jin & Penning, 2001).

La dutasterida (Avodart®) es un inhibidor dual de la 5 α R-I y 5 α R-II. Este fármaco es un inhibidor competitivo irreversible potente, forma un complejo estable con ambas isoenzimas y tiene una tasa lenta de disociación (Rittmaster, 2008; Schmidt & Tindall, 2011).

Tanto la finasterida como la dutasterida reducen activamente los niveles de DHT en más de un 80%, mejoran los síntomas de la HPB; reducen la incidencia de retención urinaria, y disminuyen la probabilidad de la cirugía. Sin embargo, los efectos adversos son principalmente de naturaleza sexual (disminución de la libido, disfunción eréctil, y trastornos de la eyaculación) (Deters & Raymond, 2014).

También han sido estudiados ciertos inhibidores de 5 α R de naturaleza no esteroidea (**Figura 1-10**). Este hecho tiene como objetivo disminuir la interacción de dichos compuestos con otras enzimas y receptores endógenos blanco de compuestos esteroideos. Entre los inhibidores de 5 α R de naturaleza no esteroidea se incluyen las benzoquinolinonas (**Figura 1-10**), las piridonas y las quinolinonas. Este tipo de compuestos se han encontrado más activos sobre la 5 α R-I, como inhibidores no competitivos frente a la testosterona.

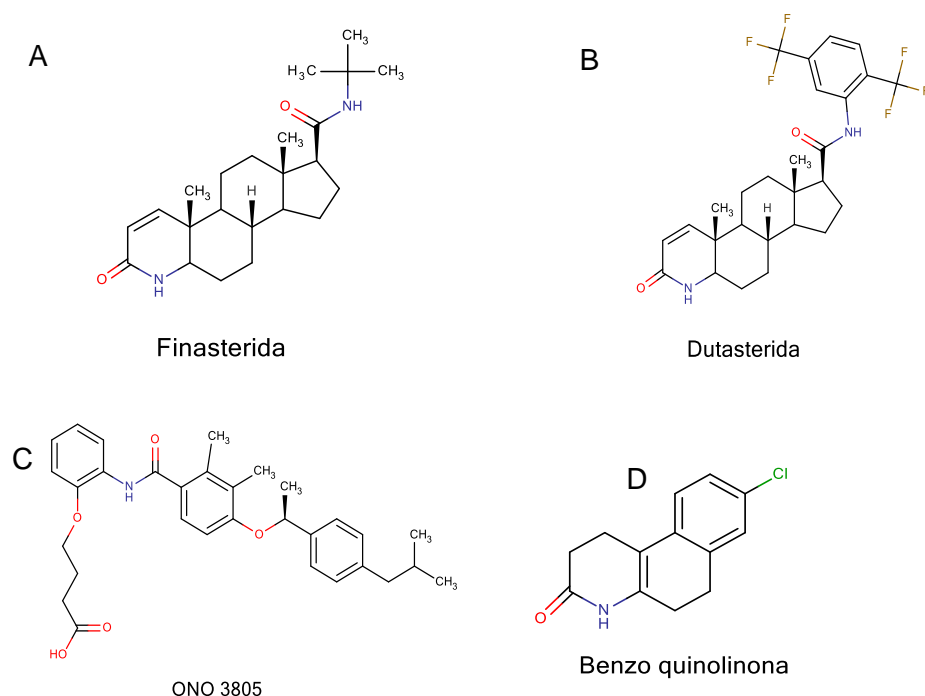


Figura 1-10. Inhibidores de la 5 α -reductasa. A y B: Compuestos de naturaleza esteroidea; C y D: Compuestos de naturaleza no esteroidea.

El 9 de junio de 2011, la Agencia de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos de América (Food and Drug Administration (FDA)) ha anunciado revisiones sobre la prescripción de inhibidores de la 5 α R. Estos agentes incluyen la finasterida y la dutasterida. Dos ensayos aleatorizados, uno de 7 años con finasterida y otro de 4 años con dutasterida, que fueron ensayados con el fin de validar su utilización como moléculas para prevenir el cáncer de próstata, y en los resultados mostraron una disminución en la incidencia de cáncer de próstata cuando a los hombres de 50 a 75 años, con un antígeno prostático entre 2.5 y 10.0 ng/mL; se les administró inhibidores de la 5 α R como tratamiento preventivo para cáncer de próstata. Sin embargo, en los casos en los que se desarrolló el cáncer de próstata, se observó que éste presentaba características de ser más agresivo, con una escala Gleason promedio superior a 7 en comparación con el placebo (Andriole, et al., 2010; Thompson, et al., 2003). Lo cual restringe su uso como agentes quimio preventores del CP.

1.3 Diseño de fármacos asistido por computador

Es conocido que los procesos tradicionales de investigación y desarrollo para la obtención de nuevos principios activos y por consiguiente de nuevos fármacos, son bastante largos y costosos. Tanto así, que la primera fase el proceso de descubrimiento de moléculas nuevas se estima en 3.5 años en promedio en países con tradición farmacéutica (Escalona, et al., 2005). Por otro lado, la fase de desarrollo que comprende los estudios clínicos y el registro farmacéutico se estima que dura entre 68 y 30 meses respectivamente. Este proceso, largo y engorroso tarda en promedio 12 años de investigación, con un costo promedio de 2 billones de dólares (Paul et al., 2010), lo cual quiere decir que la inversión tanto en tiempo como en dinero es muy grande para obtener un solo medicamento exitoso.

En la actualidad, se cuentan con diversos métodos experimentales para determinar la estructura molecular de una sustancia. Entre ellos, las técnicas espectroscópicas como la ultravioleta, infrarroja, la resonancia magnética nuclear de hidrógeno y carbono y la difracción de rayos X (Escalona, et al., 2005). No obstante, el desarrollo de las ciencias computacionales y la química computacional han propiciado la generación de sistemas *in silico* que permiten calcular la geometría y energía molecular, entre otros, con las cuales podemos generar datos con una amplia aplicación en la investigación, tanto para la interpretación de resultados como para deducir información no asequible de manera

experimental (Escalona, et al., 2005). Es tanto el volumen de datos que se ha generado en los últimos años mediante estas técnicas computacionales que ha sido posible identificar numerosas macromoléculas, y el conocimiento de su secuencia de nucleótidos o aminoácidos, e incluso, en algunos casos, la elucidación a nivel atómico de su estructura (Escalona, et al., 2005).

El contar tanto con información experimental como de la química computacional hace posible lograr relacionar la actividad del compuesto con su estructura química, lo cual permite que con estas herramientas computacionales sea más sencillo identificar a los candidatos que tengan mayor probabilidad de convertirse en fármacos exitosos (Jorgensen, 2004).

Los orígenes del diseño de fármacos asistido por computador también conocido como diseño *in silico* de fármacos comenzaron con los estudios de Corwin Hansch (Medina, et al., 2006) quienes llevaron a cabo estudios de relaciones cuantitativas que correlacionaban la estructura química de una serie de compuestos con su actividad biológica medida experimentalmente. Estos son conocidos como estudios QSAR (relación cuantitativa entre la estructura y la actividad) por su siglas en inglés (Medina, et al., 2006). En la década de los setenta, se inició con el uso de gráficas de las moléculas generadas por computador (Leach, 2001). Esto condujo al desarrollo del modelado molecular en tres dimensiones, que puede definirse como la generación, manipulación, cálculo y predicción de estructuras químicas mediante herramientas computacionales (Leach, 2001). En los años ochenta y noventa comenzó a crecer el número de aplicaciones de diseño de fármacos que utilizan la información estructural de las macromoléculas biológicas con las que interaccionan los fármacos (Tropsha & Abraham, 2003).

Debido a que los fármacos ejercen su acción por interacción con macromoléculas presentes en el organismo, el diseño de fármacos asistido por computador se divide en dos modalidades dependiendo de la asequibilidad del conocimiento de la estructura tridimensional (3D) de la diana molecular, y del ligando que actúa sobre el mismo. Los estudios se enfocan en el diseño basado en la estructura del ligando y el diseño basado en la estructura de la diana, respectivamente según con lo que se cuente.

1.3.1 Diseño de fármacos basado en la estructura del ligando

Cuando no se conoce la estructura del receptor en donde interactúa el ligando, los estudios se enfocan en métodos que dependen de la información experimental disponible para una serie de estructuras químicas con actividad biológica conocida. Uno de los métodos más utilizados para estos estudios son los métodos QSAR (Medina, et al., 2006; Medina-Franco, et al., 2015). En éstos, se aplican métodos matemáticos y estadísticos con el fin de encontrar relaciones empíricas entre diferentes variables que describen la estructura química de los compuestos, calculadas de manera computacional, con su actividad biológica experimental (Medina, et al., 2006). Para esto, se requiere de un conjunto de técnicas computacionales relacionadas con el diseño y visualización espacial virtual de moléculas calculando propiedades fisicoquímicas moleculares. Todo esto con el fin de hacer una predicción de la actividad biológica que permita el diseño teórico de posibles futuros nuevos fármacos evitando pasar por el proceso de prueba y error de la evaluación biológica y evitando la síntesis orgánica innecesaria de los compuestos a evaluar (Medina, et al., 2006; Puzyn, Leszczynski, & Cronin, 2010).

Cualquier investigación QSAR incluye cuatro etapas: (i) Recopilación de datos y preparación de los mismos; (ii) construcción de modelos mediante el cálculo de descriptores de la estructura química de los compuestos de interés y la aplicación de estadística para establecer una relación empírica entre los valores de los descriptores y la propiedad biológica; (iii) validación del modelo, y (iv) explotación modelo mediante para predecir nuevos compuestos con la propiedad deseada (Tropsha & Abraham, 2003).

Los desarrollos recientes en este campo muestran un aumento sustancial en el tamaño y la complejidad de los datos experimentales existentes para el análisis en los modelos QSAR. Actualmente se utilizan herramientas de cribado virtual aplicado a los modelos QSAR para descubrir moléculas biológicamente activas en bases de datos o bibliotecas de compuestos. La **Figura 1-11** muestra un esquema general para el desarrollo y aplicación de los modelos QSAR (Tropsha & Abraham, 2003).

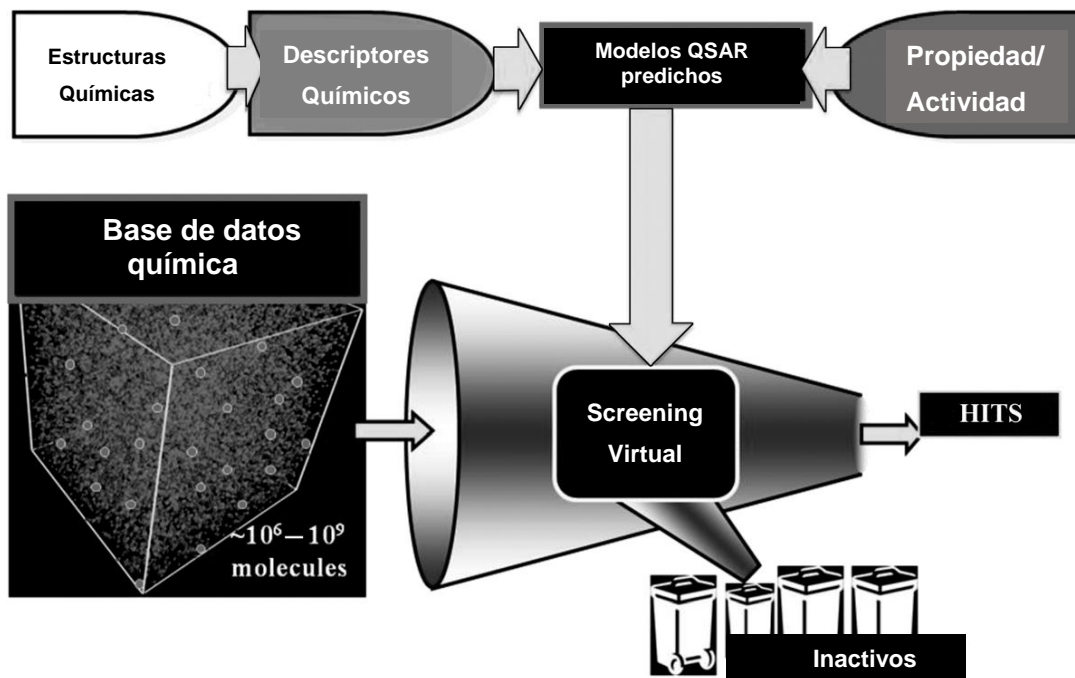


Figura 1-11. Esquema general para el desarrollo de modelos QSAR y aplicación del cribado virtual (Tropsha & Abraham, 2003).

Al momento de desarrollar un modelo QSAR se establecen ecuaciones para llegar a predecir la actividad biológica (A) de moléculas novedosas, gracias a que las propiedades estructurales conocidas como descriptores (d) que pueden ser calculadas o medidas experimentalmente pueden ser relacionadas con la actividad biológica mediante alguna transformación matemática (k) (**Ecuación 1-1**).

Ecuación 1-1. Ejemplo ecuación QSAR

$$A = k(d_1, d_2, d_3 \dots)$$

La relación entre los descriptores y la actividad biológica puede ser lineal, donde la propiedad puede calcularse directamente a partir del valor de los descriptores, o no lineal, donde el valor de los descriptores se utiliza para caracterizar la similitud química entre las moléculas, lo cual se usa para predecir la propiedad química que se busca de algún compuesto nuevo (Ekins & Obach, 2000; Medina, et al., 2006).

Los diferentes métodos que se han desarrollado en este sentido pueden clasificarse de dos formas según los parámetros estructurales que se utilizan para caracterizar a las moléculas o según los procedimientos matemáticos que se emplean para obtener las relaciones cuantitativas entre los descriptores moleculares y la actividad biológica. De acuerdo con el origen de los descriptores moleculares usados en los cálculos, los métodos QSAR pueden clasificarse mediante el uso de propiedades fisicoquímicas y parámetros que describen, por ejemplo, efectos estéricos y electrostáticos. Estos métodos son conocidos como el análisis de Hansch (Medina, et al., 2006). Otro grupo se basa en las características cuantitativas de las fórmulas estructurales bidimensionales que se conocen como estudios QSAR en dos dimensiones o QSAR-2D. Un tercer grupo de métodos se basa en los descriptores obtenidos de la representación tridimensional de gráficas moleculares y se les conoce como QSAR en tres dimensiones o QSAR-3D. El ejemplo más conocido de QSAR-3D es el análisis comparativo de campos moleculares (del inglés *Comparative Molecular Field Analysis*, CoMFA). Esta metodología puede mostrar los resultados en forma gráfica, interpretándose en términos de las interacciones estéricas y electrostáticas importantes para que el ligando se una al receptor.

Como se mencionó, la cantidad de datos disponibles en las bases de datos que contienen información biológica, han crecido enormemente en los últimos años, tanto en tamaño como en diversidad. En muchos casos, estas bases de datos se han establecido para hacer frente a los intereses específicos de sus desarrolladores de acuerdo a la evolución de las investigaciones y teniendo en cuenta que con el desarrollo de nuevas tecnologías es posible diseñar modelos más complejos que proporcionen datos completos y confiables (Badenas, 1993). La industria farmacéutica se basa cada vez más en este tipo de bases de datos para la generación de nuevas ideas para la identificación de posibles candidatos de fármacos (Ekins & Obach, 2000). En la **Tabla1-3** se pueden evidenciar las bases de datos más relevantes para llevar cabo estudios *in silico* para descubrir fármacos (Ekins & Obach, 2000).

Tabla1-3. Bases de datos relevantes para el descubrimiento *in silico* de fármacos (Oprea & Tropsha, 2006; Tropsha & Abraham, 2003).

Información suministrada	Nombre de la Base de Datos y sitio web	Creador
Estructuras químicas y actividad biológica de compuestos en general	PubChem: http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/	National Center for Biotechnology Information
	NCI: http://dtp.nci.nih.gov/docs/dtp_search.html	National Cancer Institute
	BINDING DB: http://www.bindingdb.org/bind/index.jsp	Skaggs School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences at the University of California
Estructura química de metabolitos humanos	http://www.hmdb.ca/	Canadian Institutes of Health Research
Fármacos y candidatos clínicos información química y seguridad de los mismos	NLM's Dailymed: http://dailymed.nlm.nih.gov/	U.S. National Library of Medicine
	DrugBank: http://drugbank.ca/	Canadian Institutes of Health Research
	FDA: http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drug_satfda/	Food and Drug Administration
	WHO Essential Drugs: http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/en/	World Health Organization
Datos toxicológicos	NIEHS: http://ntp.niehs.nih.gov/	National Institute of Environmental Health Sciences
	EPA ToxCast: http://www.epa.gov/ncct/toxcast/	United States Environmental Protection Agency
	EPA DSS-Tox: http://www.epa.gov/ncct/dsstox/index.html	
Estructuras químicas	ChemSpider: http://www.chemspider.com/	Royal Society of Chemistry
	ZINC: http://zinc.docking.org/	Bioinformatics and Chemical Informatics Research Center
	e-Molecules: http://www.emolecules.com/	eMolecules Corporate Office/Lab

Las ventajas del estudio QSAR son su bajo costo porque puede ser ejecutado mediante el empleo de programas computacionales de libre acceso además de que la información necesaria para llevarlos a cabo se encuentra relativamente accesible. El cálculo de descriptores moleculares puede ser sumamente rápido según el tipo de modelo propuesto. Sus desventajas consisten en la necesidad de familiarizarse con las metodologías computacionales, por ejemplo se debe aprender a manejar diferentes sistemas operativos e interfaces gráficas y el modo de extraer la información a partir de las bases de datos (Puzyn, et al., 2010). En este sentido, la resolución de diferentes problemas de cómputo para el manejo de las herramientas en algunas ocasiones no son fáciles de utilizar (Lozano-Aponte & Scior, 2012). Adicionalmente se encuentran desafíos para mejorar la exactitud y fiabilidad de los modelos QSAR porque el modelaje molecular sigue siendo una metodología en constante crecimiento con la necesidad de mejorar la accesibilidad a herramientas computacionales confiables (Tropsha & Abraham, 2003).

1.3.2 Diseño de fármacos basado en la estructura de la diana

En el diseño de fármacos basado en la estructura de la diana biológica, se debe contar con la estructura tridimensional de la macro-molécula o diana biológica con la que interactúa el ligando pues es en ésta donde se van a evaluar los compuestos para ver su interacción con la misma (Medina, et al., 2006). Las macromoléculas juegan un papel importante en los procesos metabólicos y en las rutas biosintéticas por lo tanto, la elucidación de la estructura tridimensional de estas moléculas ya sea por métodos experimentales como lo son la cristalografía de rayos X, la RMN y el barrido electrónico o por métodos *in silico*, mediante el empleo de herramientas bioinformáticas a través del modelamiento molecular, conducen al conocimiento de la misma pudiéndose aplicar en procedimientos computacionales para el diseño de moléculas con actividad biológica (Anderson, 2003).

Una fuente muy común para la obtención de estructuras tridimensionales de biomoléculas es la base de datos de proteínas conocida como el Protein Data Bank (PDB). Es el repositorio mundial de estructuras tridimensionales de miles de proteínas obtenidas por cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear ("National Center for Biotechnology Information," 2004).

Una vez que la estructura y el sitio en la diana se identifican, hay varios caminos para el diseño de fármacos con base en la estructura de la diana. Estos caminos pueden clasificarse en tres modalidades: a) acoplamiento molecular; b) cribado virtual y c)

generación *de novo* de fármacos. En el acoplamiento molecular o *docking*, se estudia como algunas moléculas conocidas que se unen al sitio activo de la diana, tales como sustratos o cofactores, en el caso de las enzimas o péptidos e incluso las mismas proteínas, en el caso de las proteínas (Medina, et al., 2006). En el cribado virtual, se estudian múltiples moléculas obtenidas de una o varias bases de datos sobre algún sitio de interés de la diana con el fin de seleccionar los candidatos que muestren las mejores características de interacción con ella. En el diseño *de novo*, consistente en construir las moléculas directamente dentro del sitio activo de la diana biológica, por lo general se sintetizan fragmentos de moléculas que están acoplados en el sitio activo, unidos de una forma ideal (Medina, et al., 2006) buscando analizar a fondo el sitio de unión de un compuesto predefinido. Existen también algunos programas para predecir la accesibilidad sintética de los nuevos compuestos generados como LUDI, GRID, MCSS, CONCERTS, y SMOG (Anderson, 2003).

Una vez obtenidos los compuestos promisoriamente más afines por el sitio activo de la diana de interés por cualquiera de los métodos *in silico* mencionados, éstos deben ser sintetizados en el laboratorio con la finalidad de determinar y validar experimentalmente la actividad biológica sobre la diana. Los programas computacionales más utilizados en estas metodologías se muestran en el Anexo A de acuerdo con su uso principal (Anderson, 2003).

1.3.2.1 Acoplamiento molecular o *docking*

El acoplamiento molecular se puede utilizar para identificar la interacción entre una molécula pequeña y una proteína a nivel atómico, lo que nos permite caracterizar el comportamiento de las moléculas pequeñas en el sitio de unión de proteínas diana y dilucidar los procesos bioquímicos resultantes de dicha interacción (Meng, Zhang, Mezei, & Cui, 2011). también se puede utilizar para predecir la actividad biológica potencial de compuestos, a partir de la energía libre resultante de la interacción entre la proteína (diana) y el ligando o sustrato (compuesto de interés) (Meng, et al., 2011). Aquellos ligandos con mayores puntajes de unión, resultantes de una mayor afinidad de unión, pueden ser mejores candidatos para llevar a cabo su síntesis y evaluación experimental de su actividad biológica.

Para los estudios de *docking* es importante conocer con antelación la ubicación del sitio activo o de unión en la diana, con el fin de asegurar que el compuesto a ser acoplado se

una a éste y por lo tanto, exista mayor probabilidad de que posea un mecanismo de acción similar a compuestos con reconocida actividad sobre el mismo (Morris & Lim-Wilby, 2008). En muchos casos, el sitio de unión se conoce solo cuando se dispone de la estructura tridimensional de la proteína. Sin embargo, también se puede obtener información sobre los sitios activos por comparación de la proteína diana con una familia de proteínas que comparten una función similar o cuando hacen parte de la misma familia de proteínas con las proteínas co-cristalizada con otros ligandos.

Teniendo en cuenta la limitación de los gastos informáticos requeridos para llevar a cabo un estudio de acoplamiento molecular flexible y los recursos informáticos con los que se cuenta a la fecha, en especial las capacidades de cómputo requeridas, los estudios de acoplamiento molecular en su mayoría se realizan con un ligando flexible y un receptor rígido (Meng, et al., 2011).

Otro de los usos establecidos del acoplamiento molecular, es para identificar el modo de unión entre una diana farmacológica y un posible ligando, es decir, permite establecer la orientación y conformación que el ligando o sustrato adopta en la cavidad de la proteína diana, para identificar el sitio de unión y la modificación de la actividad biológica (*blind docking*) (Hetényi & Van der Spoel, 2002).

Para lograr una predicción del acoplamiento molecular exitosa son necesarios básicamente tres pasos:

1. La definición de la estructura de la diana. Esta puede determinarse experimentalmente o por modelado molecular.
2. La localización del sitio de unión. Este puede ser determinado computacionalmente, utilizando algoritmos simples basados en la forma del ligando o sustrato y la superficie macromolecular del receptor. También puede ser determinado por métodos empíricos tomando como base complejos proteína-ligando conocidos (Meng, et al., 2011).
3. La determinación del modo de unión. Esto se puede hacer empleando los algoritmos de cada uno de los programas diseñados para este propósito como los de Glide o Autodock (Hetényi & Van der Spoel, 2002).

El estudio de la interacción de un fármaco con su receptor es un problema complejo porque muchas fuerzas energéticas están involucradas en esa unión. Entre ellas, las fuerzas hidrofóbicas, las de dispersión de London, las de van der Waals, los puentes de

hidrógeno y las electrostáticas (Hetényi & Van der Spoel, 2002). De todas éstas, las interacciones hidrofóbicas parecen ser la principal fuerza de unión, sin embargo la especificidad de la unión entre la diana y el ligando parece ser debida a los puentes de hidrógeno y a las interacciones electrostáticas (Nadendla, 2004). El modelado de las interacciones moleculares en el complejo proteína-ligando es una tarea difícil porque existen muchos grados de libertad en cuanto a las rotaciones que pueden tener los grupos de las estructuras que se están ensayando, también es posible que se estudien las interacciones de una diana biológica como una estructura flexible donde dependiendo de la molécula a ensayar puede cambiar la disposición en el receptor y cambiar la fuerza de interacción, además de que no se tiene conocimiento suficiente de los efectos del disolvente en dicha asociación (Nadendla, 2004).

El proceso del *docking* consta de dos partes. La primera, consiste en la generación de las diferentes conformaciones de una molécula ligando con el fin de identificar la geometría correcta del acople de éste en el sitio de unión. En la segunda, se predice la afinidad de unión entre el ligando y su proteína diana para cada una de las conformaciones generadas, las cuales pueden ser organizadas en orden de afinidad, según los resultados de la función de puntuación o evaluación, en donde se tiene en cuenta la energía libre de Gibbs de unión ($-\Delta G$), para evaluar la fuerza de unión de los ligandos a la diana biológica (Kontoyianni, McClellan, & Sokol, 2003).

Uno de los programas más usados para realizar los estudios de acoplamiento molecular automatizado es el AutoDock. Este programa utiliza un método basado en una rejilla para permitir la evaluación rápida de la energía unión, se basa en estimar átomo por átomo la contribución a la unión entre el ligando y la proteína utilizando la diferencia en la superficie entre el área del complejo de la proteína no unida y el espacio ocupado por el ligando unido, calculando la energía libre de unión ΔG .

Treinta complejos de proteínas con su ligando publicadas fueron utilizados en la calibración de la libre función de energía de AutoDock utilizando sólo complejos en donde las estructuras cristalográficas estaban disponibles (Morris et al., 1998).

En este método, la rejilla (grid) cuadrícula es ubicada en el sitio de unión o sitio activo de la proteína diana en donde un átomo de sondeo se coloca secuencialmente en cada punto de la rejilla y se calcula la energía de interacción entre el átomo y el objetivo (Morris & Lim-Wilby, 2008) almacenando el valor en la rejilla. Estas rejillas de energías pueden

entonces ser utilizadas como una tabla de búsqueda durante la simulación de acoplamiento (Morris et al., 2009).

El diseño de fármacos basado en la estructura del receptor o diana es un método de gran alcance, especialmente cuando es posible utilizar una gran cantidad de herramientas computacionales que se encuentran actualmente disponibles. Dado que se está enfocado a las bibliotecas de compuestos sintetizados, se puede llevar a cabo de una manera muy sencilla la evaluación de todas estas moléculas sobre las proteínas que cuentan estructura 3D representando una ventaja sobre los métodos experimentales (Badenas, 1993). Cada día más investigadores se dedican a los estudios de interacciones moleculares, lo que hace que este tipo de investigaciones estén creciendo rápidamente y se conviertan en una herramienta idónea para la búsqueda y descubrimiento de entidades moleculares bioactivas.

1.3.3 Modelado molecular de proteínas

Cuando se realizan los estudios de diseño de fármacos basados en la diana es indispensable contar con un receptor caracterizado estructuralmente ya sea experimentalmente o mediante herramientas computacionales o *in silico*. Este proceso de predicción de la estructura terciaria se conoce como modelado molecular, el cual en la actualidad es de gran utilidad en la comunidad científica, ya que han mostrado resultados confiables comparables con los obtenidos experimentalmente (Medina, et al., 2006).

La falta de conocimiento de las estructuras tridimensionales de las dianas biológicas ha obstaculizado el comprender cómo es la unión de ligandos a éstas dificultando la obtención de entidades químicas activas (Badenas, 1993). Gracias al surgimiento de diversos programas de cómputo especializados en modelado molecular, y al desarrollo del proyecto del genoma humano, ha sido posible conocer gran cantidad de genes y las proteínas que estos codifican, lo que ha llevado a identificar un gran número de nuevas dianas terapéuticas para el descubrimiento de fármacos (Escalona, et al., 2005). Además, ha permitido enriquecer las bases de datos con información biológica que están a disposición en internet (Vyas, Ukawala, Ghate, & Chintha, 2012).

Desde la década de los 60 con los estudios de (Anfinsen, 1959) sobre enzimas ribonucleasas presentes en diferentes organismos y mamíferos que participan en procesos fisiológicos diversos como: muerte celular, replicación del DNA, transcripción,

procesamiento y edición del RNA; defensa del hospedero y control del crecimiento tumoral (Usuga & Rugeles, 2006), se determinó que la información de la estructura 3D de una proteína reside en su secuencia de aminoácidos (Selvaraj, 2014) por lo tanto, a partir de la secuencia de aminoácidos es posible predecir un modelo tridimensional de la misma.

La función de una proteína está determinada principalmente por su estructura tridimensional, pero los métodos para la determinación experimental de esta estructura requieren de mucho tiempo y dinero. El proceso incluye comúnmente el desarrollo de un sistema de expresión de proteínas, purificación de las mismas, cristalización y finalmente determinación de la estructura, donde cada paso sucesivo puede tomar hasta años para lograrlo con éxito (Pitman & Menz, 2006). Por este motivo, aunque el número de secuencias de proteínas disponibles ha aumentado de forma exponencial, el número de estructuras de 3D de proteínas derivadas experimentalmente es muy bajo (Pitman & Menz, 2006).

La predicción estructural de proteínas, entendida como aquella que hace uso de herramientas computacionales y de medios informáticos constituye una herramienta idónea cuya aplicabilidad se ha incrementado en los últimos por la dificultad de hacer dicha determinación de manera experimental. La predicción estructural de proteínas se puede clasificar en dos grandes categorías: a) Predicción de la estructura secundaria y b) predicción de la estructura terciaria. La predicción de la estructura secundaria intenta localizar los segmentos de la cadena polipeptídica que adoptan la estructura de α -hélice o de hoja β -plegada y las regiones que contienen estos elementos estructurales secundarios (Leach, 2001). En la predicción de estructura terciaria, se intenta obtener la estructura tridimensional o estructura nativa de la proteína (Selvaraj, 2014). Dado que como objetivo del presente trabajo se determinará *in silico* la estructura tridimensional de la 5 α R a continuación nos enfocaremos a explicar en qué consiste la predicción de la estructura terciaria por este método.

Para la predicción de la estructura terciaria de las proteínas, se utilizan tres metodologías principales: 1) El modelado por homología, también llamado modelado comparativo; 2) el *threading* o plegamiento y 3) la predicción estructural *de novo* (**Figura 1-12**). Según el tipo de proteína a modelar y la información que se tenga previamente de la proteína, se elige la metodología o metodologías necesarias para realizar la construcción de la estructura 3D (Kalyaanamoorthy & Chen, 2013).

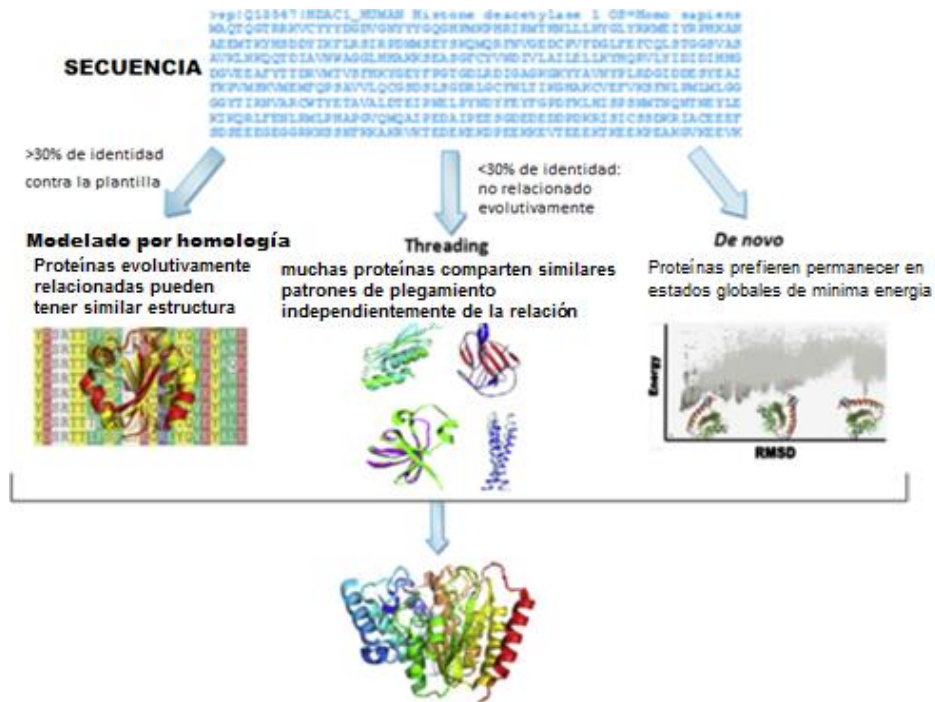


Figura 1-12. Metodologías empleadas para el modelado de proteínas (Kalyaanamoorthy & Chen, 2013).

1.3.3.1. Modelado de proteínas por homología

El modelado por homología consiste en la construcción del modelo de una proteína de la que no se conoce su estructura cristalina, a partir de su secuencia de aminoácidos (o estructura primaria) y de una o unas estructuras tridimensionales de una proteína homóloga empleada como plantilla o *template*. Se sabe que proteínas relacionadas evolutivamente tienen secuencias similares y estructura tridimensional similar (Pitman & Menz, 2006). Por lo tanto, esta metodología se basa en la identificación de estructuras conocidas con cierta relación con la estructura 3D de la proteína a elucidar (Chothia, 1992; Chothia & Lesk, 1986).

El objetivo consiste en construir un modelo *in silico* con una precisión comparable al obtenido experimentalmente, permitiendo generar rápidamente modelos confiables cuando las técnicas experimentales para la predicción proteica fallan, como en el caso de proteínas muy grandes difíciles de analizar por RMN o cuando no se pueden determinar por difracción de rayos X, como por ejemplo las proteínas trans-membranales que son difíciles de cristalizar (Chung & Subbiah, 1996).

En este sentido, el modelado por homología se está convirtiendo en el método de elección para obtener las coordenadas 3D de las proteínas diana, permitiéndonos realizar una representación similar de los residuos de las proteínas en su ambiente correspondiente, en ausencia de datos experimentales y proporciona información sobre las bases moleculares y funciones de una diana biológica particular (Abbaszadegan et al., 2013).

Dado que la estructura de la proteína está determinada por su secuencia de aminoácidos, es muy importante conocer dicha característica de la proteína que se va a modelar. En este sentido y como se mencionó, hay que considerar que las secuencias de aminoácidos similares se pliegan de forma similar (Krieger, Nabuurs, & Vriend, 2003).

Existen cuatro pasos importantes durante el modelado de homología (**Figura 1-13**). En el primero, a partir de la secuencia de aminoácidos se identifica la estructura de la proteína que se va a utilizar como plantilla. En el segundo, la secuencia de la proteína conocida se alinea o sobrepone sobre la plantilla para observar la similitud de la misma con la secuencia problema o con la proteína a ser modelada o secuencia diana. En el tercero, se utiliza la alineación como guía para generar las coordenadas 3D del modelo tridimensional que se busca generar. Por último, el modelo se optimiza utilizando técnicas de cálculo y estereoquímica. A menudo, este proceso se repite tantas veces sea necesario a fin de obtener un modelo adecuado (Pitman & Menz, 2006).

En este método de modelado se busca encontrar proteínas relacionadas entre sí desde el punto de vista evolutivo siendo esto posible, cuando la proteína desconocida y la proteína que se va a utilizar como plantilla comparten más del 30 % de identidad en su secuencia o estructura primaria (Abbaszadegan, et al., 2013). Cuando no se encuentre una plantilla con este porcentaje de identidad se recurre al empleo de otros métodos como es el *threading* y *de novo* a fin de realizar el modelado (Kalyaanamoorthy & Chen, 2013).

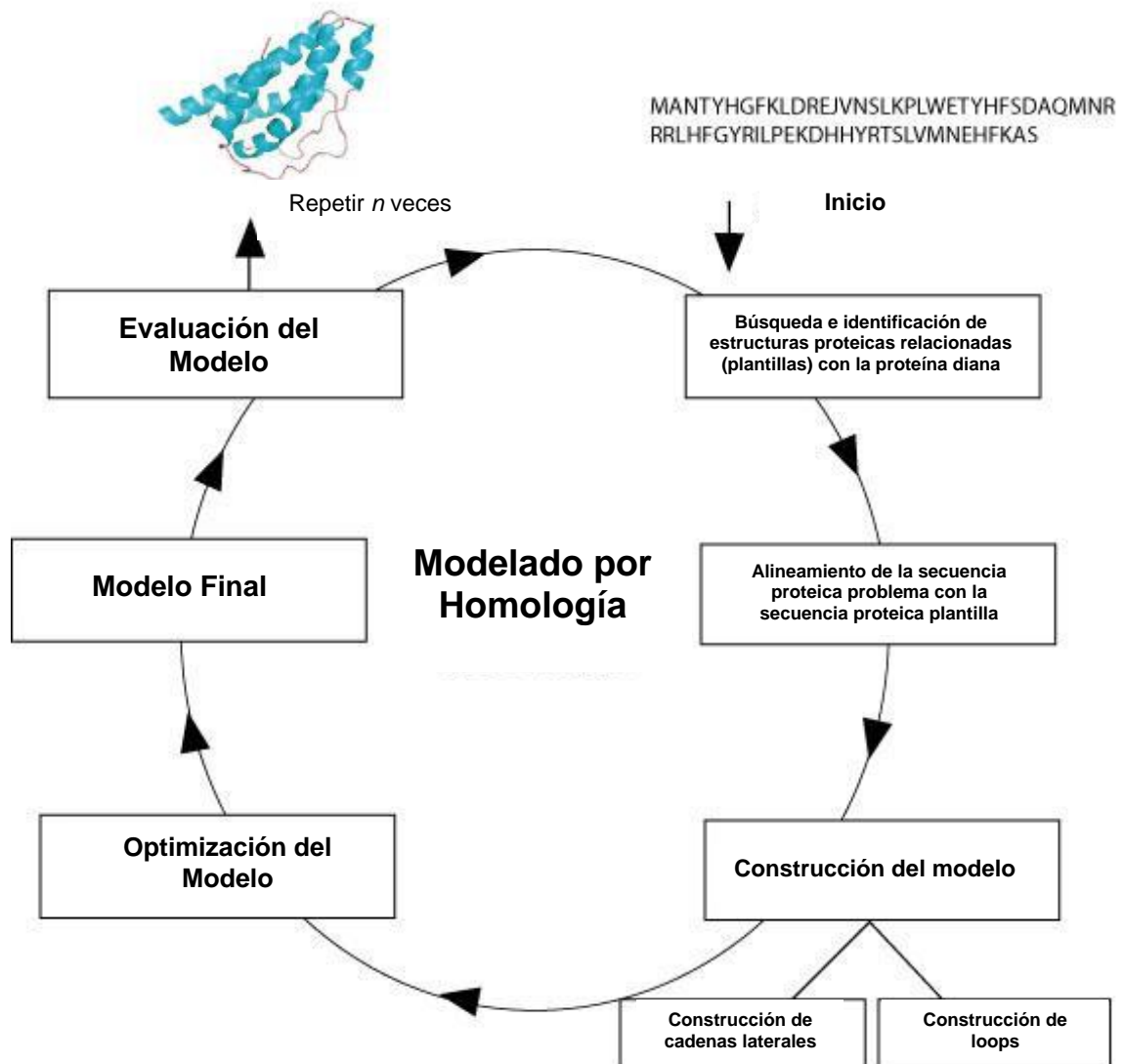


Figura 1-13. Modelado de proteínas por el método de homología (Pitman & Menz, 2006).

1.3.3.2. Modelado de proteínas por *threading* o plegamiento

Los métodos de predicción por plegamiento se basan en que las estructuras 3D de las proteínas muestran una mejor conservación durante su evolución en comparación con su secuencia de aminoácidos, es decir, las proteínas sin aparente similitud de secuencias podrían tener pliegues similares (Rangwala, 2010). Hay varios casos que pares de proteínas son estructuralmente similares pero no comparten identidad de secuencia de aminoácidos. Hoy en día, se conoce que hay aproximadamente diez diferentes pliegues

en el cincuenta por ciento de las proteínas con estructura 3D conocida (Dorn, Silva, Buriol, & Lamb, 2014).

El objetivo general de la predicción de estructuras en 3D por métodos de plegamiento consiste en adaptar de manera correcta una secuencia de aminoácidos de una proteína a un modelo estructural en 3D (Dorn, et al., 2014). Este método utiliza los pliegues de las proteínas conocidas en las proteínas para la construcción de la estructura terciaria de una proteína cuya estructura 3D es desconocida. En este método, la secuencia diana se utiliza para buscar en las bases de datos el plegado de la estructura con el fin de identificar las proteínas que tienen patrones de plegamiento similares (Kalyaanamoorthy & Chen, 2013). Durante esto, se coloca la secuencia de aminoácidos problema en las posiciones estructurales de una estructura 3D utilizada como plantilla, implicando dos procedimientos básicos: a) La selección de un modelo estructural a partir de una biblioteca de modelos de proteínas con estructura 3D y b) el encontrar la sustitución correcta entre la secuencia problema y los modelos estructurales llenando los posibles espacios entre la secuencia y la estructura 3D. Para poder obtener un modelo adecuado, este método utiliza información estructural como son los patrones de contacto de entre residuos, la estructura secundaria de la proteína y la accesibilidad del solvente a ciertos puntos de ésta, las cuales no pueden ser detectadas únicamente por las similitudes entre las secuencias de aminoácidos (Dorn, et al., 2014). Sin embargo, este tipo de modelado puede ser inapropiado cuando una secuencia de aminoácidos objetivo posee un patrón de plegamiento que no coincide con ninguno de los pliegues de proteínas conocidas (Kalyaanamoorthy & Chen, 2013).

Un método de modelado por plegamiento consta de tres pasos (**Figura 1-14**): 1) Identificación de una biblioteca de plantillas estructurales; 2) Construcción del modelo y 3) Evaluación energética del modelo (Dorn, et al., 2014).

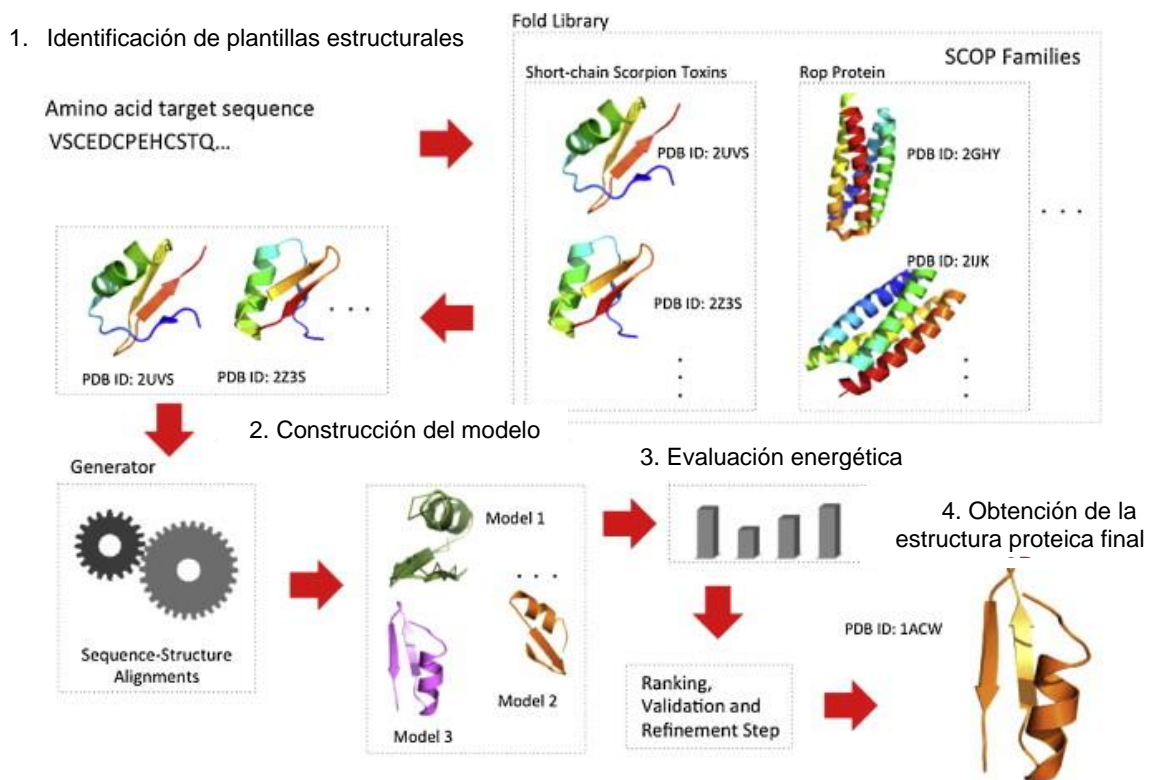


Figura 1-14. Representación esquemática de un procedimiento de *threading*. 1) Los plegamientos de la proteína plantilla se seleccionan a partir de una biblioteca de estructuras 3D de proteínas; 2) se construyen los modelos para la proteína diana; 3) se calcula la energía potencial de las estructuras y se puntúan los modelos (Dorn, et al., 2014).

1.3.3.3. Modelado de proteínas por el método *de novo*

Cuando el modelado por homología y *threading* no es aplicable, se puede utilizar el método *de novo* para el modelado de proteínas que se basa en el principio fisicoquímico de preferir el estado de mínima energía de las proteínas para hacer el modelado (Kalyaanamoorthy & Chen, 2013). Se realiza una búsqueda conformacional a gran escala para identificar aquellas conformaciones estructurales de mínima energía para una secuencia de aminoácidos determinada empleando para ello Simulaciones Monte Carlo y enfoques de dinámica molecular que requieren de un gasto computacional considerable (Koliński & Bujnicki, 2005). Recientemente con el desarrollo de diversos programas computacionales como ROSETTA e I-TASSER se han alcanzado varios avances en el desarrollo de modelos tridimensionales, sin embargo, el tiempo elevado de cálculo sigue

siendo una limitante de esta metodología (Kalyaanamoorthy & Chen, 2013; Selvaraj, 2014).

Aunque el modelado comparativo se limita a las familias de proteínas con al menos una estructura conocida, la predicción de estructuras *de novo* no tiene tal limitación. Los métodos *de novo* parten de la suposición de que el estado natural de una proteína está en el mínimo global de energía libre y lleva a cabo una búsqueda a gran escala del espacio conformacional de estructuras terciarias de proteínas que tienen baja energía libre para la secuencia de aminoácidos dada. Los dos componentes principales de estos métodos son el procedimiento para la búsqueda conformacional y la función de energía libre utilizada para la evaluación de dichas conformaciones. Para permitir la búsqueda rápida y eficiente del espacio conformacional, a menudo sólo un subconjunto de los átomos de la cadena proteica se representa de forma explícita (Rohl & Baker, 2002).

Recientemente se han evidenciado avances prometedores en la predicción de la estructura proteica por el método *de novo*. Un método particularmente exitoso emplea el programa ROSETTA (Rohl & Baker, 2002) que se basa en el plegamiento de proteínas por segmentos cortos y que produce el plegamiento para el estado nativo de la proteína cuando estos segmentos locales están orientados de tal manera que generan interacciones de baja energía libre (Baker & Sali, 2001).

2. Materiales y Métodos

2.1 Equipos

En la **Tabla 2-1** se detallan las características de los equipos utilizados en este trabajo.

Tabla 2-1. Características de los equipos utilizados.

Equipo/Marca	Características
Computador portátil marca TOSHIBA Satellite	Modelo: S845. Procesador: Intel Core i5-3210M CPU @2.5 GHz 8Gb de Ram Disco Duro de 680 Gb
Hewlett-Packard	Pavilion Procesador AMD Athlon (tn) X2 Dual-Core QL-62 2GHz 4Gb de Ram Disco duro de 500Gb

2.1.1 Programas computacionales

Los programas computacionales y servidores web utilizados en este trabajo se describen en la **Tabla 2-2**.

Tabla 2-2. Características de los programas computacionales y servidores empleados.

Programa o Servidor web/versión/compañía desarrolladora	Características	Referencia
National Center for Biotechnology (NCBI) Protein Database National Institute of Health	Base de datos del Centro Nacional de Biotecnología de los Estados Unidos. Es una división de la biblioteca nacional de medicina (NLM) donde se reúnen bases de datos biomédicas.	("National Center for Biotechnology Information," 2004)

Tabla 2-2. Características de los programas computacionales y servidores empleados (Continuación).

Programa o Servidor web/versión/compañía desarrolladora	Características	Referencia
<p>BLASTp</p> <p>Versión: 2.2.31</p> <p>Altschul S.F., Gish W., Miller E.W., Lipman D.J.,</p> <p>NCBI</p>	<p>Programa computacional para el alineamiento de secuencias locales de ADN, ARN o de proteínas. Es capaz de comparar una secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos problema contra una gran cantidad de secuencias que se encuentren en la base de datos. El algoritmo que emplea el programa permite encontrar las secuencias que tienen mayor identidad con la secuencia problema en dicha base de datos.</p>	<p>(Altschul et al., 1997)</p>
<p>MODELLER</p> <p>Versión: 9.14</p> <p>Andrej Šali</p> <p>University of California, San Francisco</p>	<p>Programa computacional para el modelado tridimensional de proteínas por homología teniendo en cuenta la alineación de una secuencia problema con proteínas de estructura 3D relacionada conocida.</p> <p>El programa calcula automáticamente un modelo proteico considerando todos los posibles átomos de carbono y heteroátomos en la estructura predicha, sin considerar los átomos de hidrógeno.</p>	<p>(Eswar et al., 2006)</p>
<p>I-TASSER</p> <p>Versión: 4.3</p> <p>Yang Zhang Lab</p>	<p>Servidor web para la predicción de la estructura 3D y función biológica de moléculas proteicas a partir de su secuencia de aminoácidos.</p>	<p>(Zhang, 2008)</p>

Tabla 2-2. Características de los programas computacionales y servidores empleados (Continuación).

Programa o Servidor web/versión/compañía desarrolladora	Características	Referencia
PHYRE2 Versión: 2.0 Lawrence Kelley Biotechnology and Biological Sciences Research Council	Servidor web para la predicción estructural de proteínas de uso no comercial. Utiliza una biblioteca de estructuras proteicas conocidas tomadas de la Clasificación Estructural de Proteínas (SCOP) y del Protein Data Bank (PDB)	(Kelley, Mezulis, Yates, Wass, & Sternberg, 2015)
PSIPRED Versión: 3.3 David T. Jones	Servidor web que analiza la estructura secundaria de las proteínas. Trabaja bajo la modalidad de redes neuronales teniendo en cuenta las salidas de PSI-BLAST. Cuenta con diferentes algoritmos para la predicción de la estructura secundaria, según la topología de las proteínas.	(Buchan, Minneci, Nugent, Bryson, & Jones, 2013)
Protein Wizard Preparation Schrodinger, Inc.	Programa computacional que permite la preparación de proteínas para su análisis bioinformático mediante la corrección estructural del sistema en estudio, permitiendo obtener una estructura ideal de alta precisión.	(Schrodinger, 2011c)
Prime Versión: 2.3 Schrodinger, Inc.	Programa para predicción estructural de proteínas con una interfaz fácil de usar. Permite generar modelos precisos de dianas para el diseño de fármacos con base en la estructura.	(Schrodinger, 2011b)
Marvin Sketch Versión: 6.1 ChemAxon	Programa para construir estructuras químicas a través de una interfaz gráfica.	(ChemAxon, 2013)

Tabla 2-2. Características de los programas computacionales y servidores empleados (Continuación).

Programa o Servidor web/versión/compañía desarrolladora	Características	Referencia
AutoDock Versión: 4.2.6 The Scripps Research Institute	Programa automatizado que permite predecir cómo pequeñas moléculas pueden interaccionar con una diana de estructura 3D conocida en estudios de acoplamiento molecular.	(Morris, et al., 2009)
AutoDockTools Versión: 4.2 The Scripps Research Institute	Interfaz gráfica del programa AutoDock 4.2.6 y AutoDock Vina. Facilita tanto la preparación de la molécula ligando como la de la diana biológica para los estudios de acoplamiento molecular.	(Morris, et al., 2009)
Avogadro Versión: 2.07	Programa editor y visualizador de estructuras moleculares diseñado para uso multiplataforma en química computacional. Cuenta con diversas herramientas para la optimización de la geometría molecular.	(Hanwell et al., 2012)
Discovery Studio Versión: 4.0 Acelerys	Programa visualizador y simulador de moléculas que permite la modificación y estudio de éstas.	(Biovia, 2014)
PyMol Versión: 1.7.6 Schrodinger, Inc.	Programa visualizador de moléculas que permite la personalización de imágenes 3D de éstas. Posee una interfaz gráfica que proporciona a los usuarios un control preciso y potente que a su vez permite interpretar más de 30 formatos de archivos diferentes.	(Schrödinger, 2013)
Swiss-model-QMEAN Swiss Institute of Bioinformatics	Servidor para estimar la calidad de los modelos obtenidos que permite clasificar un conjunto de modelos e identificar regiones potencialmente poco fiables dentro de éstos.	(Benkert, Biasini, & Schwede, 2011; Benkert, Künzli, & Schwede, 2009)

Tabla 2-2. Características de los programas computacionales y servidores empleados (Continuación).

Programa o Servidor web/versión/compañía desarrolladora	Características	Referencia
Clustal Omega Versión: 1.2.0 Des Higgins European Molecular Biology Laboratory	Programa para la alineación de secuencias múltiples de proteínas que calcula la mejor combinación de alineación entre secuencias. Permite calcular la identidad y la similitud entre secuencias.	(Larkin et al., 2007)
SiteMap Schrodinger, Inc.	Es una herramienta del programa Schrödinger útil para obtener información sobre los sitios de unión en las proteínas que pueden ser más adecuados para la unión de ligandos.	(Schrodinger, 2011d)

2.2 Métodos

2.2.1 Procedimientos generales

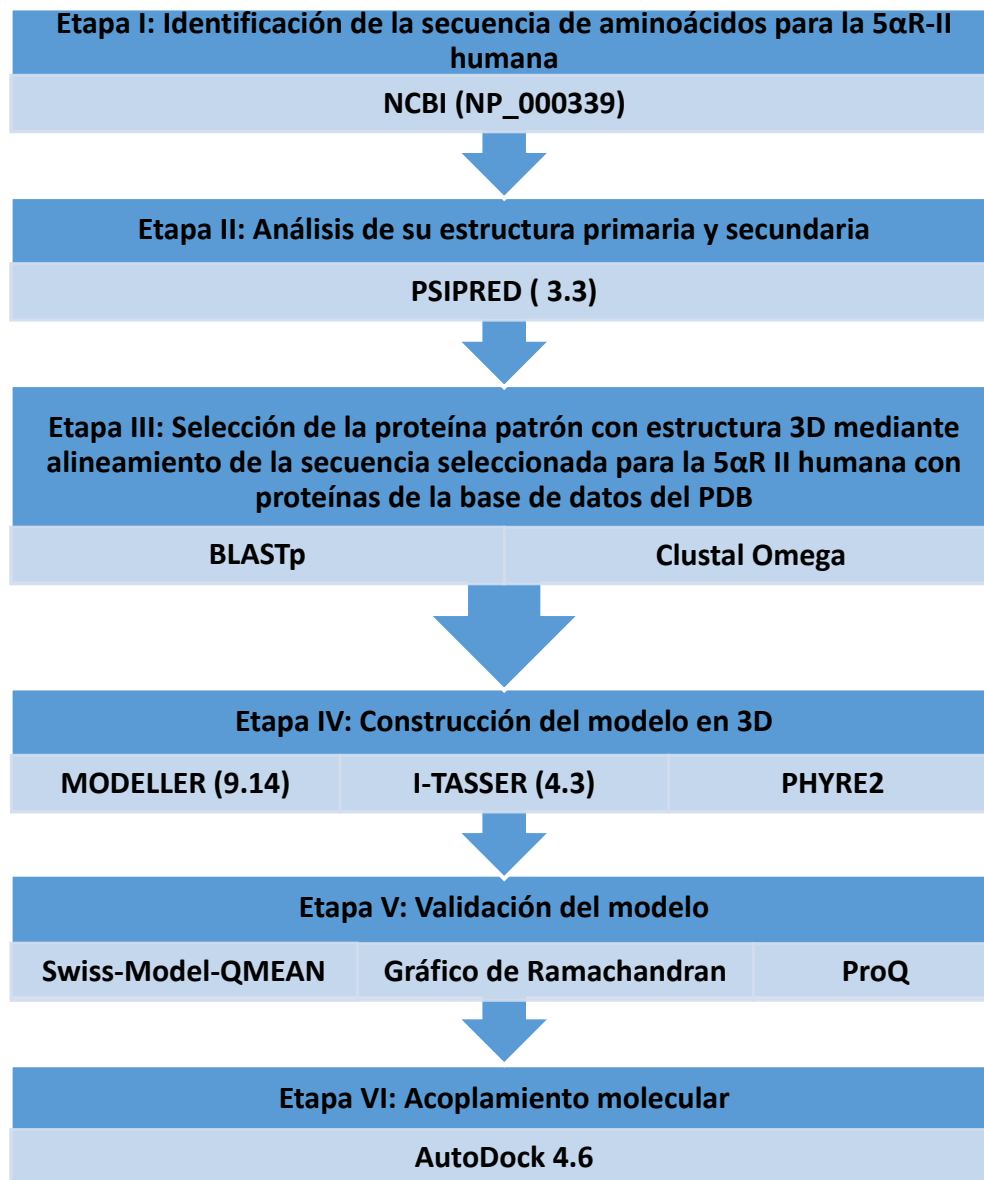


Figura 2-1. Proceso metodológico llevado a cabo en el presente estudio.

2.2.2 Archivos y entradas utilizados

La identificación de la secuencia de aminoácidos para la enzima 5 α R-II se realizó por búsqueda con palabras clave descargándola en un archivo de texto en formato .fasta, archivo de entrada para otros servidores.

Para el análisis de su estructura primaria y secundaria por PSIPRED (Buchan, et al., 2013) solo fue necesario utilizar como archivo de entrada la secuencia de aminoácidos de la 5 α R-II en formato de texto tipo .fasta

El alineamiento de la secuencia de la 5 α R-II seleccionada con cada una de las plantillas identificadas se realizó utilizando como archivos de entrada las secuencias en formato de texto tipo .fasta

La construcción de los modelos en MODELLER (Eswar, et al., 2006) requirió de archivos de texto de entrada con la secuencia .ali y los script o archivos de programación con órdenes ejecutables se diseñaron en el lenguaje de programación Python. Una vez ejecutados, el programa entregó los modelos 3D con las coordenadas en formato .pdb y un archivo de texto .txt con el resumen de la construcción del modelo su evaluación energética.

La construcción de los modelos con I-TASSER (Zhang, 2008) requirió como archivo de entrada la secuencia de aminoácidos en formato .fasta. Las plantillas de proteínas estuvieron especificadas en el servidor por el código PDB al momento de enviar el trabajo y a vuelta de correo se recibieron los modelos en formato .pdb con un link con el análisis de los mismos.

La construcción de los modelos con PHYRE2 (Kelley, et al., 2015) requirió como archivo de entrada la secuencia de aminoácidos en formato .fasta o .txt, recibiendo a vuelta de correo un link para descargar los modelos predichos en formato .pdb junto con un análisis de los mismos.

Para la validación de los modelos por Swiss Model-QMEAN (Benkert, et al., 2009) se requirió como archivo de entrada el modelo en .pdb y la secuencia de aminoácidos en formato de texto .fasta

Para la validación de los modelos por el gráfico de Ramachandran (Cooper, 1995) se ingresó el modelo en formato .pdb dentro del programa.

En el estudio de acoplamiento molecular los ligandos se construyeron en formato .mol y luego se exportaron en formato .mol2 a coordenadas 3D. Los modelos y ligandos en formato .pdb se cambiaron a formato .pdbqt en el programa AutoDock para el acoplamiento molecular obteniéndose los resultados en formato .pdbqt posible de convertirlo a .pdb para leer los resultados en un programa externo.

2.2.3 Selección de la secuencia de aminoácidos de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana para la construcción del modelo tridimensional

La secuencia de aminoácidos de la enzima 5 α R-II (SRD5A2) se obtuvo de la base de datos de la NCBI (código NP_000339) cuya búsqueda se realizó por el nombre 3-oxo-5-alpha-steroid-4-dehydrogenase 2 (Kang, et al., 2013). A partir de ésta se identificó la secuencia que pertenecía a la especie *Homo sapiens* y a la isoforma tipo 2 que fue la que se eligió para el estudio.

2.2.4 Determinación de la estructura secundaria a la secuencia de aminoácidos seleccionada de la 5 α -reductasa tipo 2 humana para la construcción del modelo

A partir de la secuencia de aminoácidos identificada, se analizó su estructura primaria y secundaria por medio del servidor PSIPRED (Buchan, et al., 2013), un servidor web de libre acceso en el cual solo es necesario enviar la secuencia proteica para recibir los resultados por correo electrónico mediante un link para analizarlos visualmente.

2.2.5 Alineamiento de la secuencia proteica seleccionada de la 5 α -reductasa tipo 2 humana para la construcción del modelo tridimensional

Con la secuencia identificada se realizó un alineamiento por medio de la herramienta BLAST® disponible en la misma página de la NCBI, específicamente utilizando el módulo BLASTp para la comparación de secuencias de aminoácidos de proteínas. Dicho

alineamiento tuvo la finalidad de comparar la secuencia y el nivel de conservación de la enzima 5 α R-II con las proteínas disponibles en la base de datos Protein Data Bank (PDB) con estructura 3D conocida (Berman et al., 2000). De esta manera se seleccionaron las proteínas de mayor identidad que permitieran comenzar a construir el modelo.

Además de llevar a cabo el alineamiento de secuencias de aminoácidos y nivel de conservación entre las proteínas del PDB y la 5 α R-II mediante BLASTp, también se realizó un alineamiento múltiple en el servidor ClustalW (Larkin, et al., 2007) entre las secuencias de aminoácidos de la enzima 5 α R-II con la enzima 5 β -reductasa (5 β R) (código PDB: 3BUR) y con otra reductasa trans-membranal (código PDB: 4QUV) recientemente determinada (Li, Roberti, & Blobel, 2015). Dicho alineamiento tuvo como finalidad determinar si alguna de estas enzimas con estructura 3D conocida podría servir como patrón para la construcción del modelo 3D de la 5 α R-II.

2.2.6 Construcción del modelo tridimensional de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana

Con la finalidad de contar con un modelo válido de la enzima 5 α R-II se construyeron varios modelos mediante el empleo de diferentes plataformas computacionales como MODELLER , I-TASSER (Zhang, 2008) y PHYRE2 (Kelley, et al., 2015). Además esto permitió identificar el mejor programa computacional o servidor web para modelar esta proteína.

Los modelos proteicos tridimensionales se construyeron a partir de las plantillas de las secuencias de proteínas que resultaron con mejor puntaje durante el estudio de acoplamiento o alineamiento entre ellas.

Para la construcción del modelo en el programa MODELLER (Eswar, et al., 2006) primero se realizó un alineamiento de la secuencia problema con las plantillas identificadas siguiendo los criterios del programa. Para ello, se programaron y ejecutaron los scripts del programa obteniéndose los archivos en .pdb de los modelos tridimensionales. El programa MODELLER evalúa los modelos mediante funciones de puntuación propias como DOPE (Discrete Optimized Protein Energy) que toma en cuenta la menor energía de los modelos construidos siendo el modelo más adecuado el que presente la menor energía (Fiser & Šali, 2003). El parámetro G341 score evaluó la similitud del modelo comparado con la plantilla utilizada para su construcción (Eswar, et al., 2006).

Para los modelos 3D construidos en el servidor I-TASSER (Zhang, 2008) se tomaron en cuenta alineamientos múltiples comparando los plegamientos de estructuras de su base de datos con los de la secuencia problema y con los de la plantilla (Zhang, 2008). Para este caso fue necesario ingresar la secuencia de aminoácidos seleccionada al servidor y el código PDB de la plantilla a utilizar en los formatos solicitados. Los resultados se recibieron a través de correo electrónico en formato .pdb con su respectivo análisis utilizado la función de puntuación llamada *C-score* relacionada con la similitud entre el modelo final y las estructuras determinadas experimentalmente. La puntuación va de -5 a 2 indicando que cuando el modelo muestra una puntuación más positiva es de mejor calidad (Roy, Kucukural, & Zhang, 2010).

La tercera herramienta con la que se construyó el modelo tridimensional de la 5 α R-II fue el servidor PHYRE2 (Kelley, et al., 2015), en este servidor al igual que en I-TASSER se puede generar un modelo de forma sencilla con solo proporcionar la secuencia de aminoácidos que se desea modelar. La secuencia se carga al servidor y a vuelta de correo electrónico se recibe un enlace con los resultados del trabajo y las estructuras 3D. Este mismo servidor evalúa los modelos según el análisis por el gráfico de Ramachandran (Cooper, 1995). Hay que tener en cuenta que cualquier método de predicción de estructura tridimensional necesita un punto de partida para el modelado sin embargo todavía no hay métodos fiables para predecir la estructura de la proteína pura de la secuencia sola, sin referencia a las estructuras conocidas (Kelley, et al., 2015).

2.2.7 Optimización del modelo tridimensional de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana

Dado que las estructuras de los modelos generados por los distintos programas computacionales o servidores web pueden contener errores, como falta de átomos de hidrógeno, presencia de algunos aminoácidos espacialmente en zonas no permitidas o algunas de las cadenas predichas del modelo pueden resultar incompletas, es necesario mejorar u optimizar el modelo. Por ello, las cadenas se completan y se minimiza su energía para obtener la conformación energética más estable del modelo (Tastan, De Beer, & Joubert, 2008).

La optimización de los modelos tridimensionales generados de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 se llevó a cabo mediante la aplicación Protein Preparation Wizard (Schrodinger, 2011c) del módulo Maestro versión 9.2 del programa computacional Schrödinger

(Schrodinger, 2011a) . Para ello, cada uno de los modelos generados en formato PDB se revisó con esta herramienta para completar las cadenas faltantes y adicionar átomos de hidrógeno faltantes y una vez hecho esto, se procedió a minimizar energéticamente la proteína mediante el campo de fuerza OPLS-2005, utilizando una minimización por gradiente con 500 pasos, con el fin de refinar pequeños detalles espaciales y de distancias entre aminoácidos haciendo un reordenamiento espacial de su estructura, minimizando su energía sin empaquetar la estructura (Stortz, Johnson, French, & Csonka, 2009).

2.2.8 Validación de los modelos tridimensionales de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana

Una vez optimizados los modelos 3D, el paso a seguir consistió en su validación con el fin de determinar si dichos modelos eran estructuras viables para llevar a cabo estudios computacionales. Para ello, se evaluó la calidad global de la proteína mediante diferentes servidores especializados buscando que las regiones estructurales de los modelos evaluados se encontraran en regiones aceptables según su disposición espacial e identificando que las cadenas laterales de los aminoácidos se encontraran completas (Santos, Andrade, & Alencastro, 2003). El proceso de validación se realizó por medio del servidor web Swiss Model (<http://swissmodel.expasy.org/>) que cuenta con el servidor QMEAN que significa “análisis cualitativo de modelo energético” (Benkert, Tosatto, & Schomburg, 2008). Este es un servidor que evalúa por puntuación a los mejores modelos 3D, describiendo los principales aspectos geométricos de las proteínas. Para ello, utiliza diferentes parámetros descriptivos como el potencial dependiente de la distancia entre el modelo a evaluar y las distintas estructuras cristalizadas que se encuentran en las bases de datos, así como también su potencial de solvatación y ángulo de torsión (Benkert, et al., 2008). A partir de dichos parámetros se obtuvieron diferentes puntajes que permitieron validar los diferentes modelos encontrando al más adecuado para los estudios de acoplamiento molecular. El servidor ProQ por su parte, permitió identificar los modelos correctos según sus plegamientos a través de los parámetros de calidad LG score y MaxSub ingresando el modelo en formato .pdb en el servidor y recibiendo el resultado bajo los parámetros de calidad “Correcta, Buena y Muy Buena” según la **Tabla 2-3** (Wallner & Elofsson, 2003).

Tabla 2-3. Parámetros del programa ProQ para la evaluación de la calidad de modelos obtenidos *in silico*.

Parámetro y calidad del modelo		
Correcta	Buena	Muy Buena
LG score > 1.5	LG score > 3	LG score > 5
MaxSub > 0.1	MaxSub > 0.5	MaxSub > 0.8

De manera adicional, los modelos también fueron validados mediante las gráficas o mapas de Ramachandran (Morris, MacArthur, Hutchinson, & Thornton, 1992). Esta es una técnica eficiente para visualizar la distribución de los ángulos de torsión ϕ y ψ en una estructura proteica, constituyéndose en un parámetro importante para el plegamiento de la proteína (Morris, et al., 1992). En este sentido, un modelo más viable tendrá la mayor parte de sus residuos de aminoácidos dentro de los cuadrantes del mapa de Ramachandran donde se presente la agrupación más favorable en cuanto a los ángulos mencionados. En el caso contrario, un modelo pobre no tendrá la agrupación correcta y como resultado, los ángulos de algunos de sus residuos pueden estar presentes en las regiones no permitidas (Morris, et al., 1992). En el gráfico de Ramachandran las diferentes regiones de la proteína suelen representarse mediante códigos de colores así, las zonas de color rojo son las más favorables en cada uno de los cuadrantes y hacia afuera de esa zona comienza las regiones menos favorables pasando de color rojo como la más favorable a color amarillo como la menos favorable y zona color blanco como no favorable tal y como se ve en la **Figura**. Este gráfico agrupa a los aminoácidos de la proteína evaluada según su estructura secundaria en cada uno de los cuadrantes (Cooper, 1995).

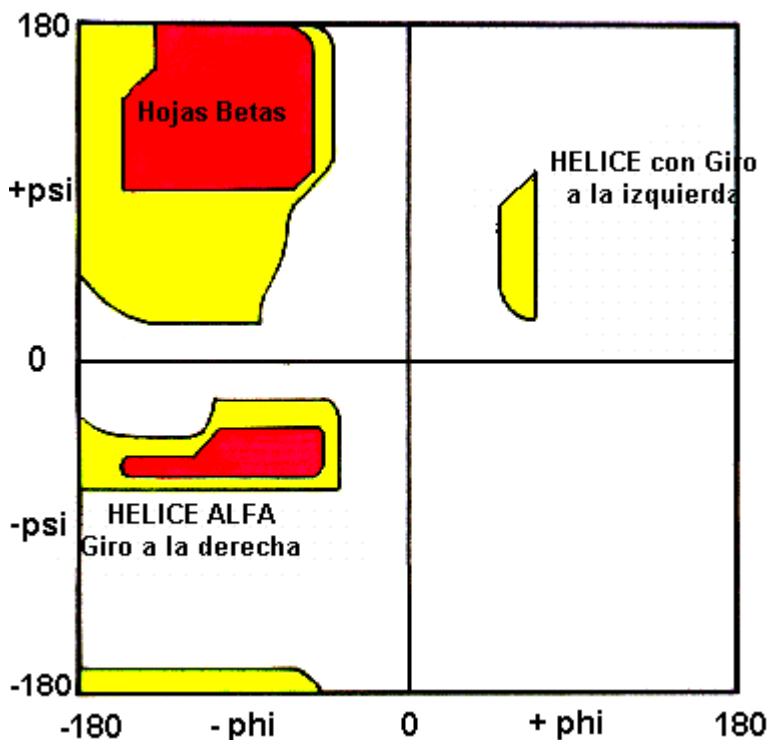


Figura 2-2. Gráfico de Ramachandran mostrando sus cuadrantes (Cooper, 1995).

2.2.9 Estudio de acoplamiento molecular (*Docking*) entre el modelo tridimensional determinado y su sustrato endógeno e inhibidores

Una vez optimizado y validado el modelo 3D de la enzima 5α -reductasa tipo 2, se llevó a cabo un estudio de su acoplamiento molecular tanto con su sustrato endógeno testosterona como con sus inhibidores de aplicación clínica finasterida y dutasterida (Deters & Raymond, 2014) en el programa computacional AutoDock versión 4.2. (Morris, et al., 1998). Tanto las moléculas del sustrato como inhibidores se construyeron en 2D mediante el programa MarvinSketch 6.1.3 (ChemAxon, 2013). Acto seguido, se obtuvo su estructura 3D guardando los archivos en formato .mol2. A las estructuras 3D se les optimizó la geometría molecular a través de la obtención de los conformeros de mínima energía (Stortz, et al., 2009). Los parámetros de minimización energética y optimización molecular fueron: 500 pasos por gradiente en el software Avogadro con un campo de fuerza MMFF94, aconsejado para estudios de acoplamiento entre un receptor y su ligando (Bort, Herrero, Rodríguez, Lorenzo, & Munar, 2001).

Las moléculas 3D del sustrato, inhibidores y enzima 5 α -reductasa tipo 2 optimizadas geométrica y energéticamente, se cargaron a la herramienta AutoDockTools (Morris, et al., 2009), que es la interfaz gráfica que permitió preparar y realizar el estudio de acoplamiento molecular (*docking*). En esta interfaz, se emplearon tanto el modelo 3D de la diana biológica (enzima 5 α -reductasa tipo 2) determinado *in silico* como las estructuras del sustrato endógeno testosterona e inhibidores finasterida o dutasterida y se les dejó rígidos (Meng, et al., 2011) generando una rejilla (grid⁵) y los archivos de órdenes (scripts) necesarios para el acoplamiento molecular en AutoDock4 en su versión 4.2.6 (última versión estable disponible), parametrizando el algoritmo bajo 100 corridas en todos los casos. Los resultados se analizaron por medio de AutoDock Tools que es el visualizador gráfico del programa que arroja una puntuación de acoplamiento tomando como base la estimación de la energía libre de Gibbs de unión ($\Delta G_{\text{unión}}$) entre el sustrato endógeno e inhibidores con el modelo de la 5 α R-II. Además este programa mostró el número de poses que tomó cada acoplamiento dentro del modelo evaluado y permitió inferir un sitio probable para la unión a la enzima a través del análisis de las regiones donde tanto el sustrato endógeno como los inhibidores interactuaban con la misma.

De manera adicional y con la finalidad de ubicar el sitio activo de la 5 α -reductasa tipo 2 en el modelo construido, se llevó a cabo la búsqueda de los sitios potenciales de unión mediante el programa SiteMap (Schrodinger, 2011d). Este programa es una herramienta del programa Schrodinger que hace una búsqueda sobre la superficie de la proteína (modelo 3D de la 5 α -reductasa tipo 2) visualizada en el programa Maestro, sobre la cual se establece una rejilla (grid) de puntos para localizar los sitios potenciales de unión (Schrodinger, 2011d). Posteriormente, se hicieron mapas del sitio determinado, evaluando sitios hidrofóbicos e hidrofílicos, que fueron puntuados a fin de mostrar cuales serían los sitios de unión más probables (Schrodinger, 2011d).

⁵ Grid: Es una red o rejilla tridimensional establecida o generada en ciertos puntos de la diana biológica para facilitar los cálculos del acoplamiento molecular. Dicha rejilla puede rodear parcial o totalmente a la macromolécula en estudio en una zona de interés con el fin de facilitar los cálculos de acoplamiento.

Otro método que se empleó para determinar el sitio activo de la enzima, fue el *docking* ciego o acoplamiento molecular ciego (Meng, et al., 2011) que consistió en realizar un *docking* en un grid que cubriera toda la superficie de la proteína para que el sustrato endógeno testosterona buscara los mejores sitios para su unión. Posteriormente, tomando como base el análisis de la energía libre de Gibbs de unión ($\Delta G_{\text{unión}}$) representativo de la afinidad por dicho sitio, se determinó el lugar más apropiado para el acoplamiento (Meng, et al., 2011).

2.2.10 Adecuación de sustratos e inhibidores para el acoplamiento molecular

Tanto las moléculas del sustrato endógeno testosterona como la de los inhibidores finasterida y dutasterida fueron sometidos a optimización molecular. La **Figura 2-3** muestra a manera de ejemplo, el proceso llevado a cabo para la optimización energética de la geometría molecular de la testosterona. Para ello, dichas moléculas fueron construidas en el programa MarvinSketch (ChemAxon, 2013) y guardados en archivos electrónicos con extensión .mol (extensión válida para almacenar estructuras en 2D). Acto seguido, estos archivos se abrieron en el programa Maestro (Schrodinger, 2011a) para realizar su conversión a 3D y proceder a adicionar los átomos de hidrógeno faltantes. La estructuras completas se minimizaron mediante la herramienta LigPrep que hace parte del programa Schrodinger aplicando un campo de fuerza OPLS_2005 y un valor de pH de 5.5 +/- 0.5, ya que la enzima 5 α R-II trabaja de forma óptima a este pH en el organismo (Aggarwal, Thareja, Verma, et al., 2010). Luego de la preparación, las estructuras fueron exportadas en .mol2 para ser utilizadas en AutoDock.

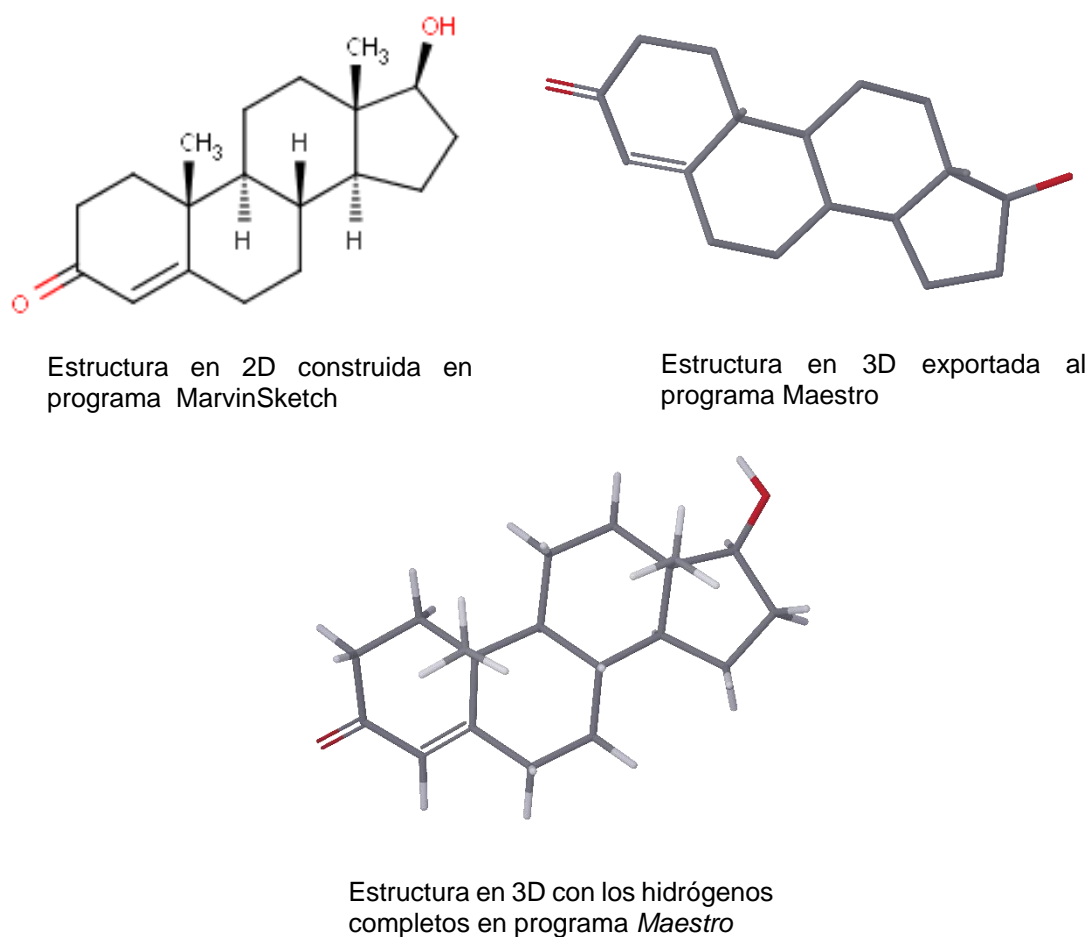


Figura 2-3. Diagrama del proceso de optimización energética de la geometría molecular para la testosterona.

2.2.11 Adecuación del modelo tridimensional de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana para el estudio de acoplamiento molecular con su sustrato e inhibidores

Debido a que para llevar a cabo los estudios de *docking* molecular era necesario contar con las estructuras completas de las proteínas incluyendo todas las cadenas laterales y átomos de hidrógeno explícitos a fin de poder evaluar su interacción con los ligandos o sustratos, fue necesario llevar a cabo la preparación de la proteína. Esto se hizo mediante el programa Protein Preparation Wizard de la suite de Schrodinger (Schrodinger, 2011c) en donde se adicionaron los hidrógenos faltantes a la estructura a fin de proceder a llevar a cabo la minimización energética de la proteína.

3. Análisis y Discusión de Resultados

3.1 Selección de la secuencia de aminoácidos de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 para la construcción del modelo

La secuencia de aminoácidos (**Tabla 3-1**) para la construcción del modelo en 3D de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 (5 α R-II) se tomó de la base de datos del NCBI ("National Center for Biotechnology Information," 2004). Esta fue identificada como "3-oxo-5-alpha-steroid 4-dehydrogenase 2" con código NP_000339.2 del NCBI. Cabe mencionar que esta secuencia de aminoácidos pertenece a los ser humano (*Homo sapiens*) y consta de 254 aminoácidos (Kang, et al., 2013).

Tabla 3-1. Secuencia de aminoácidos de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana (3-oxo-5-alpha-steroid 4-dehydrogenase 2) seleccionada para el estudio.

Formato de archivo	Secuencia de aminoácidos de la enzima 5 α -reductasa tipo 2
<i>fasta</i>	<pre>>gi 39812447 ref NP_000339.2 3-oxo-5-alpha-steroid 4-dehydrogenase 2 [Homo sapiens] MQVQCQQSPVLGASATLVALGALALYVAKPSGYGKHTESLKPAATRLPARA AWFLQELPSFAVPAGILARQPLSLFGPPGTVLLGLFCLHYFHRTFVYLLNRGR PYPAILILRGTAFACTGNGVLQGYLIYCAEYPDGWYTDIRFSLGVFLFILGMGINI HSDYILRQLRKPGEISYRIPQGGLFTYVSGANFLGEIIEWIGYALATWSLPALAFA FFSLCFLGLRAFHHHRFYLKMFEDYPKSRKALIPFIF</pre>

3.2 Análisis de la estructura primaria de la secuencia de aminoácidos seleccionada para la construcción del modelo

Una vez establecida la secuencia de aminoácidos, se procedió a evaluar sus dominios conservados teniendo en cuenta que la identificación de una huella de dominio conservado puede ser una pista hacia la función celular o molecular de una proteína, ya que indica similitud local o parcial a otras proteínas, algunas de las cuales pudieron haber sido caracterizadas experimentalmente (Marchler-Bauer et al., 2011). Esto se llevó a cabo mediante el programa Conserved Domains del NCBI (Marchler-Bauer, et al., 2011) (**Figura 3-1**). Se puede observar que la secuencia seleccionada (3-oxo-5-alpha-steroid 4-dehydrogenase 2) posee dominios propios de esteroide 3-oxo-5-alfa-4-deshidrogenasa, a

la que pertenece la 5- α -reductasa tipo 2 humana (5 α R-II) lo cual era de esperarse en caso de que la proteína de interés se encontrara bien secuenciada. En la **Figura 3-1** también se puede observar que a partir del aminoácido 105 hasta el 254 de la 5 α R-II dicha porción hace parte de secuencias esteroidales (identificada en color verde). Cabe mencionar que en la **Figura 3-1** se tiene el alineamiento entre la proteína problema con otras plantillas que por su secuencia de aminoácidos sean similares, otorgándoles funciones similares. Así mismo también se ve en color rojo las coincidencias de aminoácidos entre la secuencia de la 5 α R-II seleccionada y una plantilla conservada según las características de la 5 α R obtenida de la literatura.

De manera adicional, se identificó otro dominio conservado característico de enzimas esteroidales entre los aminoácidos 105 y 254, que fue confirmada mediante la utilización de otros programas de búsqueda de dominios conservados como el InterProScan5 (Jones et al., 2014) (**Figura 3-2**). En la **Figura 3-2** se puede ver de color morado el dominio esteroidal y el dominio reductasa. Además de que identificaron las regiones transmembranales y se le pudo asociar una actividad redox como lo indican las barras de color gris de la **Figura 3-2** que muestran las regiones de la secuencia de aminoácidos perteneciente a cada característica.

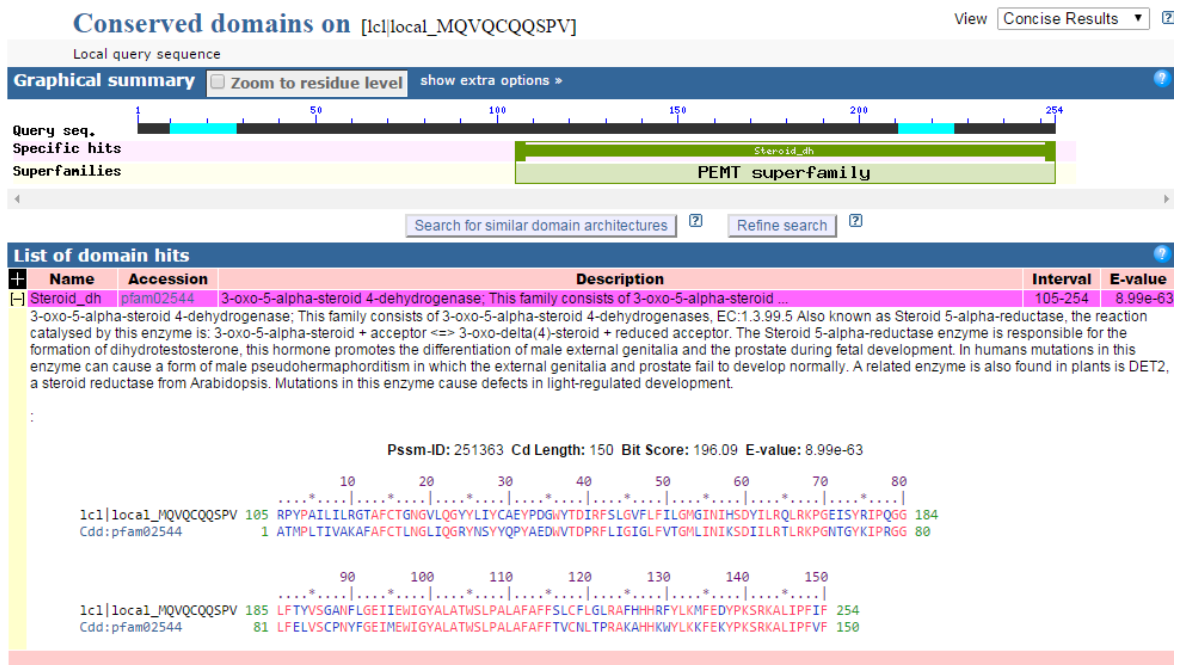


Figura 3-1. Identificación de dominios conservados en la secuencia de aminoácidos seleccionada para la 3-oxo-5-alpha-steroid 4-dehydrogenase 2 (código NCBI: NP_000339.2 d). Obtenido por el programa Conserverd domains (Marchler-Bauer, et al., 2011).



Figura 3-2. Confirmación de los dominios conservados en la secuencia de aminoácidos seleccionada para la 3-oxo-5-alpha-steroid 4-dehydrogenase 2 (código NCBI: NP_000339.2 d). Obtenido por el programa InterProScan 5 (Jones, et al., 2014).

3.3 Determinación de la estructura secundaria a la secuencia de aminoácidos seleccionada de la 5 α -reductasa tipo 2 humana para la construcción del modelo

Con el fin de determinar la estructura secundaria de la secuencia seleccionada para la 5 α R-II se utilizaron dos servidores especializados para este proceso: PSIPRED (Jones, 1999) y JPRED (Cole, Barber, & Barton, 2008). Mediante el empleo de estos servidores solo es necesario enviar la secuencia de aminoácidos de la 5 α R-II a la plataforma web y esperar a que se envíen los resultados vía correo electrónico para posteriormente proceder a analizarlos. Con el programa PSIPRED (Jones, 1999) se encontró que la estructura secundaria de la enzima 5 α R-II fue predicha con un alto grado de confianza teniendo en cuenta los estándares de evaluación propios del servidor como lo muestran las barras de “Confianza de la predicción” que se ve en la **Figura 3-3** como barras azules. Entre mayor sea la longitud de la barra, mayor es el grado de confianza de la predicción. Este parámetro está representado por una medición numérica que va de 0 a 9 donde 0 indica una mala predicción y 9 una predicción adecuada (Lin, Chang, Wu, Sung, & Hsu, 2005). En la **Figura 3-3** además se ve la composición de la estructura secundaria,

observando la cantidad de hojas beta y hélices alfa y loops presentes. Se puede decir que la enzima estudiada, se compone principalmente de hélices α en un 68.1%, seguido de cadenas tipo loop (hilos) en un 30.3%, las cuales son regiones que sirven de unión para las *hélices α* y *hojas β* quedando en menor proporción las hojas β con un 1,6% de la composición total de la enzima.

Según los resultados del servidor JPRED (Cole, et al., 2008) (**Figura 3-4**), en los cuales se puede observar un alto grado de confianza, según sus parámetros de evaluación internos (Jnet y JnetRel), en donde Jnet muestra la clase de estructura secundaria predicha identificada por letras, H es estructura predicha como hélices alfa, E como hojas beta, y con puntos la estructura tipo hilo o (loop); el parámetro JnetRel clasifica la confianza de la estructura predicha calificándola de 0 a 9 donde 0 es una estructura no identificada o predicha y 9 una estructura confiable.

Se encontró que las estructuras predichas por ambos métodos de evaluación (JPRED y PSIPRED) eran similares por lo cual se puede inferir que la estructura secundaria de la 5 α R-II humana muestra una tendencia mayoritaria a encontrarse en forma de hélices alfa y en menor proporción en forma de hojas beta. Esto se da debido a que en las proteínas los dominios trans-membranales están compuestos de estructura helices alfa en su mayoría (Fuchs & Frishman, 2010).

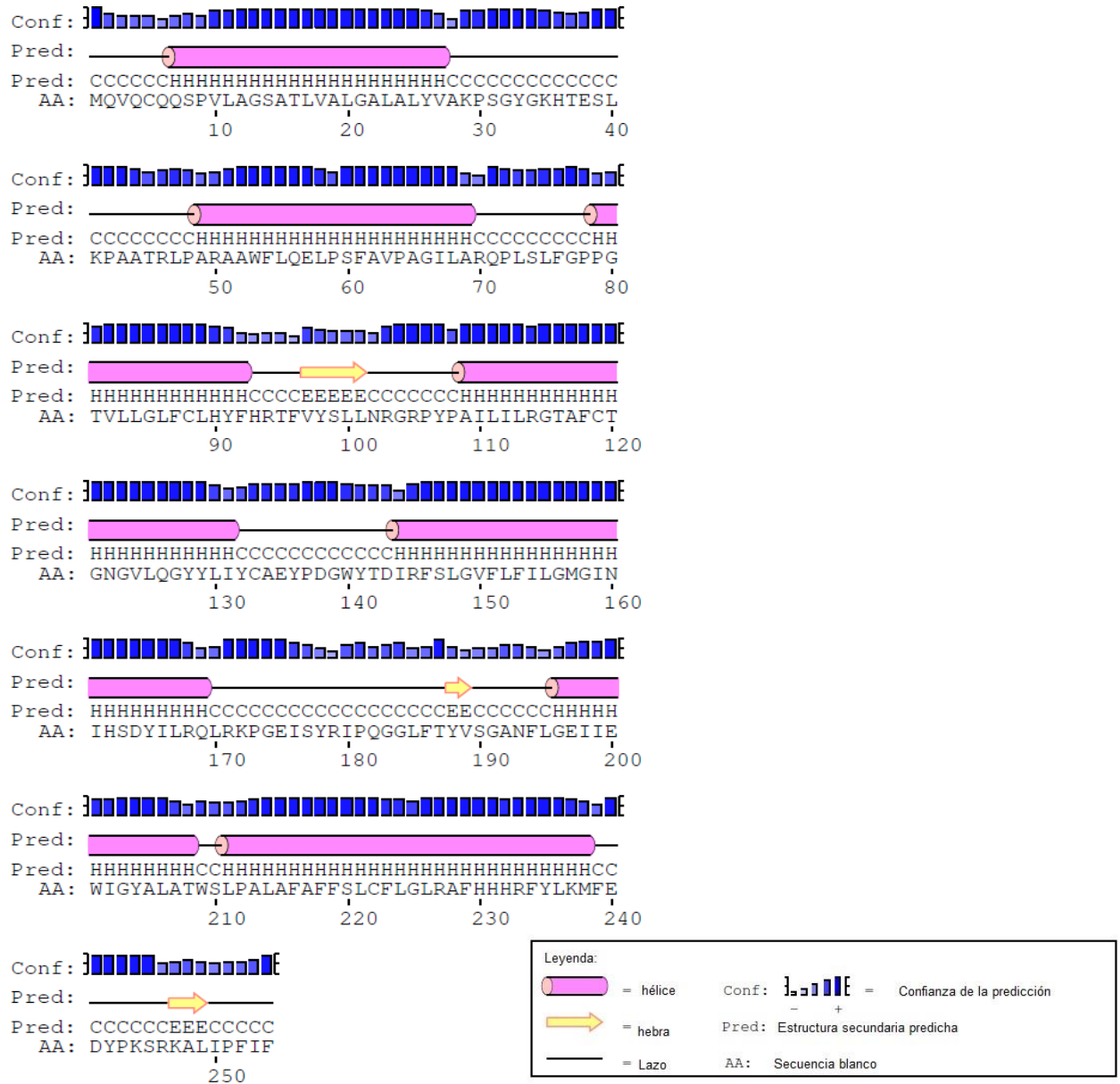


Figura 3-3. Predicción de la estructura secundaria de la enzima 5α-reductasa tipo 2 humana. Obtenida con el programa PSIPRED (Jones, 1999).

```

OrigSeq      : 1-----11-----21-----31-----41-----51-----61-----71-----81-----91-----101-----111-----121-----
               : MQVQCQSPVLAGSATLVAGALALVYAKPSSGYGKHTESLKPAAATRLPARAAWFLQELPSFAVPAIGILARQPLSLFGPPGTVLLGLFCLHYFHRTPVYSLNLRGRPYPAILILRGTAFCTGNGVLQG'

Jnet         : -----HHHHHHHHHHHHHHHHHHHH-----HHHHHHH-----HHHHHHHH-----HHHHHHHHHHHHHEEEEEEE-----HHHHHHHHHHHHHHHHHH

Jnet Rel     : 99241189999754878999999999986236777754566777777512233331041899999882168887648999999999988863024787487887427899999999999874;

---131-----141-----151-----161-----171-----181-----191-----201-----211-----221-----231-----241-----251-
YYLIYCAEYPOGNYTDIRFSLGVFLFILGWGINIHSDYILRQLRKPGEISYRIPOGGLFTYVSGANFLGEIIEWIGYALATHSLPALAFAPFSLCFLGLRAFHHHRFYLKMFEDYPKSRKALIPPIF
HH-----HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH-----EEE-----EEEE-----HHHHHHHHHHHHHH-----HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH-----EEE-----

1306777777777751468999999999999999999998116888516753788516748466247899999999998713127899999999999999999998604778876335147899
    
```

Leyenda:

OrigSeq: Secuencia Original
 Jnet: Predicción final de la estructura secundaria evaluada.
 JnetRel: Confiabilidad de exactitud de predicción, 0 a 9 más alto

Figura 3-4. Predicción de la estructura secundaria de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana. Obtenida con el programa con JPRED (Cole, et al., 2008)

Cabe mencionar que el servidor PSIPRED contiene herramientas adicionales como el módulo MEMSAT (Nugent & Jones, 2009) para la predicción de la topología de proteínas trans-membranales. Dado que la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana es una proteína trans-membranal, se predijo su topología mediante el análisis por este programa (**Figura 3-5**). Se encontró que la 5 α R-II, es una proteína trans-membranal con 7 subunidades (Sn) de estructura hélices alfa trans-membranal entre los aminoácidos: S1. 10 a 28; S2. 52 a 67; S3. 81 a 98; S4. 108 a 130; S5. 146 a 163; S6. 192 a 208 y S7 212 a 230 confirmando la complejidad de la proteína y por ende, el por qué aún no ha podido ser determinada su estructura 3D de manera experimental.

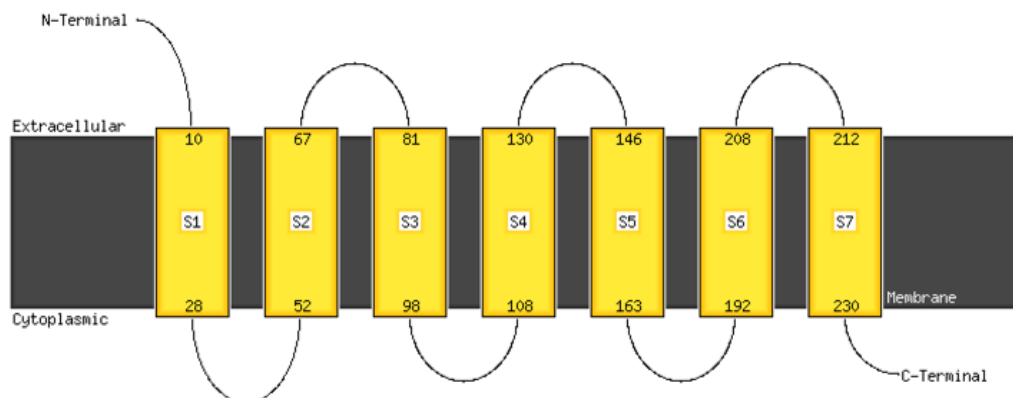


Figura 3-5. Modelo trans-membranal de la enzima 5α-reductasa tipo 2 humana. Obtenido con el programa MEMSAT (Jones, Taylor, & Thornton, 1994).

3.3 Alineamiento de la secuencia proteica seleccionada de la 5α-reductasa tipo 2 humana para la construcción del modelo tridimensional

El primer alineamiento de la secuencia proteica seleccionada de la 5αR-II fue Heurístico⁶ tipo BLAST, con una matriz de sustitución tipo BLOSUM, específicamente BLOSUM 62, adecuada para alineamientos locales. Este procedimiento consistió en alinear las partes más parecidas de la secuencia o sub-regiones buscando regiones conservadas de alta similitud entre secuencias proteicas (Chothia & Lesk, 1986). Se encontró que solo cuatro de ellas (**Tabla 3-2**) presentaron identidad máxima mayor del 25%, considerado adecuado para realizar alineamiento por homología (Vyas, et al., 2012). De ellas, la identificada con el código PDB: 1MG7 presentó la identidad máxima con un valor del 33% y una mejor puntuación y valor E, representativo de la significancia estadística del alineamiento (Altschul, et al., 1997). Analizando las secuencias de aminoácidos identificadas por BLAST en este estudio (**Tabla 3-2**), se puede observar que las proteínas más similares a la secuencia proteica seleccionada para la enzima 5α-reductasa tipo 2 humana no están completamente relacionadas con la especie humana, ni con la función de la 5αR, ya que la mayoría de las proteínas pertenecen a microorganismos como en el caso de la proteína con código PDB: 1MG7 proveniente de

⁶ **Alineamiento Heurístico.** Corresponde al método para realizar la búsqueda en bases de datos, cuyo objetivo no es la búsqueda de un alineamiento óptimo entre secuencias, sino la identificación de secuencias similares en un intervalo de tiempo razonable y sensibilidad significativa.

un nemátodo con diferenciación sexual. Las otras proteínas tuvieron funciones fisiológicas muy diferentes ya sea como reguladores de la transcripción como en el caso de la proteína 1UTH o con función oxido-reductasa como en el caso de la proteína 2HAE, por lo tanto se puede inferir que el alineamiento por el programa BLAST relacionó la secuencia proteica seleccionada para la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana con proteínas de organismos muy lejanos según su evolución filogenética y con funciones muy variadas, muy posiblemente porque no se encontraron proteínas evolutivamente relacionadas con la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana, ni con regiones suficientemente conservadas en ella. Esto se puede evidenciar también por el valor del parámetro E-valué obtenido, que fue elevado en todos los alineamientos, indicando que éste no fue producto completo del azar (Altschul, et al., 1997). Sin embargo, cabe mencionar que el parámetro E-valué es un parámetro definitivo para cadenas de aminoácidos largas (Altschul, et al., 1997), sin embargo en nuestro caso, al ser una cadena de solo 254 aminoácidos, el E-valué no es un parámetro definitivo de confiabilidad, razón por la cual los valores E-valué altos no son un factor definitivo para descartar la plantilla.

Tabla 3-2. Estructuras proteicas más similares a la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana encontradas por alineamiento en la plataforma BLAST.

Código PDB	Nombre y Origen	Puntaje frente a la 5 α R-II humana			Resolución (Å)	Referencia
		Identidad (%)	Score	E-valué		
1MG7	Xol-1 <i>Caenorhabditis elegans</i>	33	32	0.47	1.55	(Luz et al., 2003)
1UTH	Regulador DntR <i>Burkholderia</i> sp. Complejo con tiocianato	27	28.5	6.1	2.20	(Smirnova et al., 2004)
2HAE	Malato oxidoreductasa <i>Thermotoga maritima</i>	26	25	8.4	3.13	(Seetharaman & Swaminathan 2005)
1J0A	1-aminociclopropano-1-carboxilato desaminasa <i>Pyrococcus horikoshii</i>	26	27.7	9.7	2.50	(Fujino et al., 2004)

De manera adicional, se realizaron alineamientos múltiples de la 5 α R-II seleccionada con diversas proteínas, por medio del servidor ClustalOmega (Larkin, et al., 2007), utilizando las cuatro secuencias proteicas de la **Tabla 3-2**. Esto, con el objetivo de comparar en conjunto todas las secuencias seleccionadas y valorar si podrían ser utilizadas como plantilla patrón (*template*) en la construcción del modelo tridimensional de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana.

Se encontró un nivel de identidad entre 15 y 26 % para las secuencias seleccionadas, siendo un valor aceptable para la selección de las plantillas para modelado por homología (Pitman & Menz, 2006). En la **Tabla 3-3** se observan los porcentajes de identidad entre las cinco secuencias alineadas encontrando el mayor porcentaje de identidad entre la secuencia de la 5 α R-II y la 1MG7, con 25.84 % de identidad, siendo esta misma plantilla la encontrada por alineamiento con BLAST. En la **Tabla 3-3** también se puede apreciar que todas las plantillas son muy diferentes entre sí alcanzando un porcentaje de identidad máxima entre ellas del 21.52 %.

Tabla3-3. Matriz de identidad entre las secuencias alineadas durante la construcción del modelo tridimensional de la 5 α R-II.

Secuencia No.		Identidad entre secuencias alineadas (%)				
		1	2	3	4	5
1	2HAE	100.00	20.82	16.74	15.29	21.52
2	1J0A	20.82	100.00	15.76	19.69	20.16
3	1UTH	16.74	15.76	100.00	15.00	18.33
4	5 α R-II	15.29	19.69	15.00	100.00	25.84
5	1MG7	21.52	20.16	18.33	25.84	100.00

Además de llevar a cabo el alineamiento múltiple mencionado, se alineó la 5 α R-II con otro par de secuencias proteicas: la 5-beta-reductasa (5 β R) humana (Russell & Wilson, 1994) (**Tabla 3-4**) y una esterol reductasa membranal de origen bacteriano (código PDB: 4QUV) (Li, et al., 2015). La enzima 5 β R se encarga de reducir el doble enlace de 4-en-3-cetoesteroides a su correspondiente 5 β -dihidroesteroide, actuando en el primer paso de la biosíntesis de hormonas esteroidales (Russell & Wilson, 1994). Cabe mencionar, que dicha reducción se realiza también con la transferencia de un hidruro del cofactor NADPH de manera similar a como lo hace la 5 α R (Di Costanzo, Drury, Penning, & Christianson, 2008). En el caso de la esterol reductasa membranal de origen bacteriano, aislada de *Methylomicrobium alcaliphilum*, también tiene acción reductasa sobre grupos esteroides (Li, et al., 2015). Por lo tanto, dado que ambas proteínas poseen funciones similares como

reductasas se pensó que también podrían compartir el mismo tipo de plegamiento aunque no presentaran un ancestro en común.

Para la enzima 5 β R, las secuencias se seleccionaron mediante una búsqueda en la base de datos PDB (Berman, et al., 2000), en donde se identificaron las secuencias enumeradas en la **Tabla 3-4**, todas correspondientes a humanos diferenciándose por la resolución en su determinación y el ligando con el que se asocian. El alineamiento se realizó entre estas secuencias y la secuencia de la 5 α R-II. Analizando el alineamiento de las secuencias de aminoácidos con la enzima 5 β R humana, se encontró que son idénticas entre sí, razón por la cual se pudo seleccionar cualquier secuencia indistintamente para alinear con la secuencia problema.

Tabla 3-4. Secuencias proteicas con actividad reductasa que fueron alineadas con la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana.

Código PDB	Nombre y origen	Resolución (Å)	Ligando asociado	Referencia
3BUR	Delta(4)-3-cetoesteroide 5-beta-reductasa	1.62	NADP ⁺ y testosterona	(Di Costanzo, et al., 2008)
3DOP	5-beta-reductasa (AKR1D1)	2.00	NADP ⁺ y 5- β -dihidrotestosterona	(Di Costanzo, Drury, Christianson, & Penning, 2009)
3G1R	5-beta-reductasa de hígado humano (AKR1D1)	1.70	NADP ⁺ y finasterida	(Di Costanzo, et al., 2009)
3BUV	Delta(4)-3-cetoesteroide 5-beta-reductasa humana	1.35	NADP ⁺ y HEPES	(Di Costanzo, et al., 2008)
4QUV	Delta(14)-esterol reductasa integral de membrana	2.74	NADPH	(Li, et al., 2015)

Una vez realizado el alineamiento entre las tres secuencias proteicas de la enzima 5 β R con la 5 α -reductasa tipo 2 humana (**Tabla 3-5**) también se pudo observar que el porcentaje de identidad entre ellas era bajo (24.79 % entre la 5 α R-II y 4QUV, 15.45% entre la 5 α R-II y 5 β R reductasas (3BUR Y 3BUV) sin embargo se consideró que dichas plantillas constituían candidatos adecuados para la construcción de los modelos de la 5 α R-II por el método de *threading* o plegamiento.

Tabla 3-5. Matriz de identidad entre secuencias de enzimas reductasas alineadas durante la construcción del modelo tridimensional de la 5 α R-II.

Secuencia No.		Identidad entre secuencias alineadas (%)			
		1	2	3	4
1	3BUR	100.00	100.00	15.45	18.38
2	3BUV	100.00	100.00	15.45	18.38
3	5 α R-II	15.45	15.45	100.00	24.79
4	4QUV	18.38	18.38	24.79	100.00

3.4 Construcción de los modelos tridimensionales de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana

El modelado molecular se ha convertido en una de las herramientas más útiles para la predicción de la estructura proteica cuando solo se dispone de la secuencia de aminoácidos de la misma (Badenas, 1993). Esta herramienta es muy útil porque para el diseño y desarrollo de fármacos es más valioso conocer la información estructural tanto de la diana como del fármaco, y de este modo poder determinar la función de la proteína (Pitman & Menz, 2006). En los últimos años, se han desarrollado diversos programas computacionales de modelado molecular que utilizan diferentes enfoques y métodos para producir un modelo adecuado. Dado que en cada proceso del modelado existen factores que pueden afectar su calidad, la selección del programa computacional desempeña un papel fundamental porque puede influir significativamente en el resultado que se busca.

Por medio de una búsqueda en la literatura se seleccionaron algunos programas y plataformas que pudieran permitirnos elucidar la estructura tridimensional de la 5 α R-II, estos programas cuentan con reconocimiento dentro de la comunidad científica en el campo de modelado molecular. (Eswar, et al., 2006; Kelley & Sternberg, 2009; Zhang, 2008).

Con el fin de facilitar la identificación de los modelos construidos, estos se nombraron teniendo en cuenta la plataforma o programa utilizado para su construcción y la plantilla o *template* utilizada para el mismo; los modelos construidos se identificaron como se muestra en la **Tabla 3-6**.

Tabla 3-6. Programas, plataformas web y plantillas utilizadas en la construcción de modelos tridimensionales de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana.

Plataforma/Programa	Código de la plantilla	Código del modelo construido
MODELLER	1MG7	MOD1MG7
	1J0A	MOD1J0A
	1UTH	MOD1UTH
	3BUR	MOD3BUR
	3BUV	MOD3BUV
	4QUV	MOD4QUV
I-TASSER	1MG7	ITA1MG7
	1J0A	ITA1J0A
	1UTH	ITA1UTH
	3BUR	ITA3BUR
	3BUV	ITA3BUV
	4QUV	ITA4QUV

3.4.1 Modelos tridimensionales de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana construidos con el programa MODELLER

El programa MODELLER realiza modelado por homología para la predicción tridimensional de proteínas (Fiser & Šali, 2003). En este sentido, se construyeron tres modelos en 3D para la enzima 5 α R-II humana, utilizando como plantilla las proteínas 1MG7, 1J0A y 1UTH encontradas por alineamiento con la plataforma BLAST (ver sección 3.3). La proteína 1MG7 se seleccionó por tener el menor E-Valué y el mejor porcentaje de identidad frente a la 5 α R-II, mientras que las proteínas 1J0A y 1UTH fueron seleccionadas solo por tener el mayor porcentaje de identidad.

Estas plantillas en conjunto con la secuencia de la 5 α R se programaron y ejecutaron en MODELLER como lo explican los tutoriales del programa (Eswar, et al., 2006) conduciendo a la obtención de cinco modelos tridimensionales para cada una de las plantillas seleccionadas dando un total de 30 modelos para las proteínas plantilla del alineamiento por BLAST. Cabe mencionar que el programa MODELLER comparó entre sí los cinco modelos de cada plantilla indicando como el mejor al que presentara menor energía libre de acuerdo a los parámetros energéticos del programa o puntuación DOPE (Discrete Optimized Protein Energy) (Fiser & Šali, 2003) y el G341 score que se encuentra

puntuado de 0 a 1 donde los modelos más cercanos a 1 se consideran como los mejores, como se mencionó en la metodología. En el Anexo B se pueden ver los valores para los modelos construidos referentes a cada plantilla.

En general, los modelos reflejaron un DOPE score de -22000 a -27000 kcal/mol siendo éste un valor no comparable entre modelos por lo que no se puede deducir si este valor es adecuado. Por otro lado, dado que el G341 score califica al modelo de 0 a 1 (donde 1 indica que se trata de modelo adecuado) en este caso, a excepción del modelo MOD3BUR (G341 score de 0.2) los demás tuvieron un puntaje alrededor de 0.1 indicando posiblemente que no se trata de modelos adecuados siendo necesaria la validación de los mismos (Anexo B).

En la **Figura 3-6** muestran los tres modelos construidos con las plantillas identificadas por el alineamiento mediante la plataforma BLAST. Como se puede apreciar, los tres modelos están compuestos en su mayoría por loops o estructura en hilo y por regiones que no tienen forma definida, así como también se observa mayor cantidad de regiones en hojas β que las que fueron predichos por el programa PSIPRED (sección 3.2) indicando posiblemente que los modelos obtenidos con estas plantillas y programas para la 5 α R-II no serían los más adecuados.

Los tres modelos 3D construidos, se optimizaron geoméricamente y se minimizaron energéticamente comparando entre sí las distancias RMS entre cada uno de ellos con el fin de identificar que tan alejados estaban entre sí y de las plantillas seleccionadas. En la **Tabla 3-7** se observa que las distancias RMS entre cada uno de los modelos es grande, lo que permite inferir que cada modelo es muy diferente entre sí y frente a cada una de las plantillas seleccionadas, por lo tanto fue necesario llevar a cabo la validación de cada uno de los modelos generados para concluir cuál de ellos era el más adecuado.

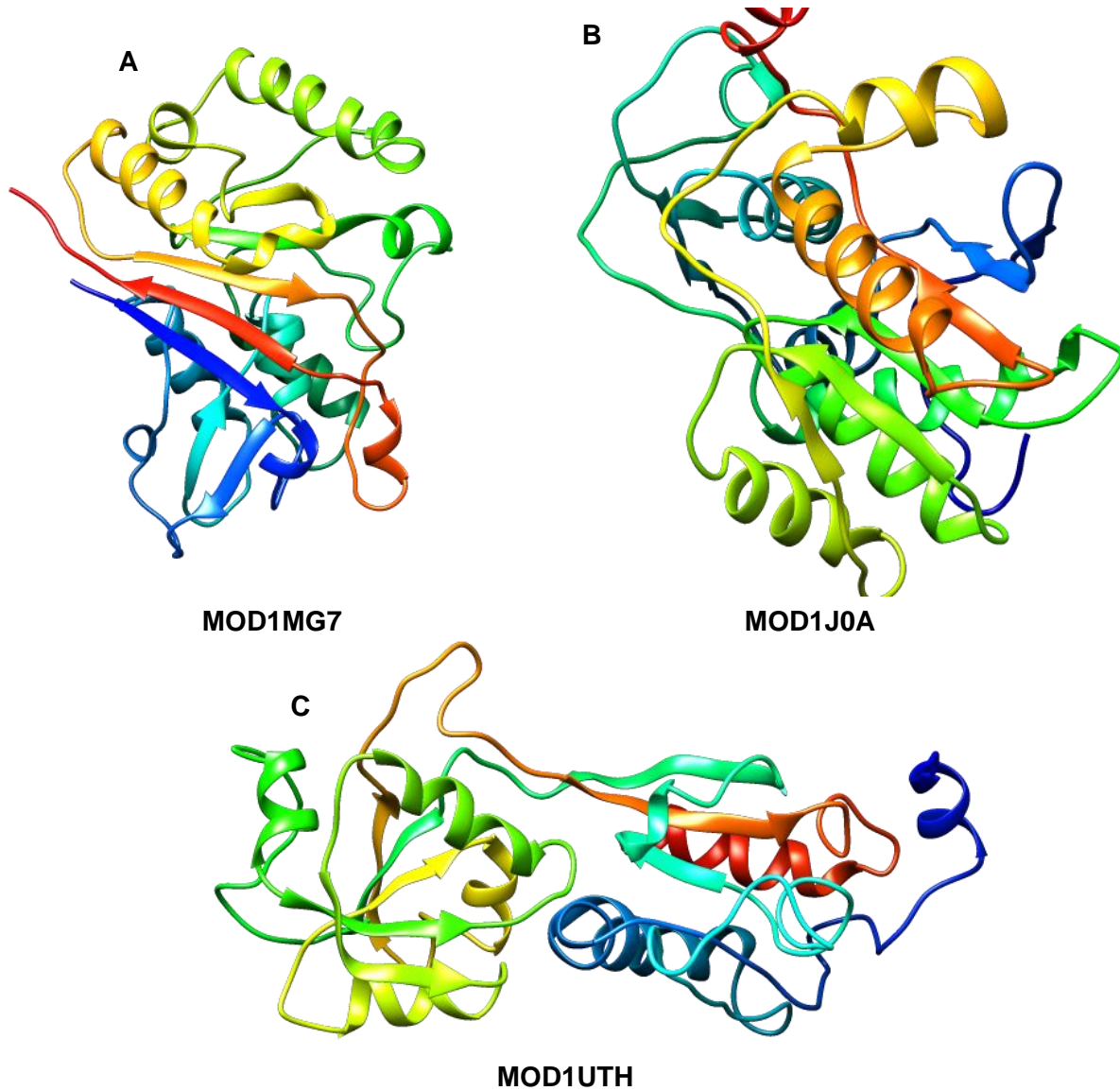


Figura 3-6. Modelos 3D de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana construidos a través del programa MODELLER empleando como plantillas las proteínas encontradas por alineamiento con la plataforma BLAST. A. Modelo construido con la proteína 1MG7. B. Modelo construido con la proteína 1J0A. C. Modelo construido con la proteína 1UTH.

Tabla 3-7. Comparación de las distancias RMS entre los modelos 3D de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana construidos a través del programa MODELLER empleando como plantillas las proteínas encontradas por alineamiento con la plataforma BLAST.

Modelos comparados		Valor RMS
MOD1MG7	MOD1J0A	18.796
MOD1MG7	MOD1UTH	19.869
MOD1J0A	MOD1UTH	21.770

Por otro lado, las proteínas con actividad reductasa (códigos PDB: 3BUR, 3BUV y 4QUV) (**Tabla 3-4**) también fueron empleadas como plantilla para la construcción de los modelos tridimensionales de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana en MODELLER. Cabe mencionar que las dos primeras proteínas (3BUR y 3BUV) se escogieron porque corresponden a las proteínas de la enzima 5 β -reductasa determinadas por métodos de difracción de rayos X con mejor resolución, mientras que la tercera (4QV) corresponde a la reductasa que más similitud tiene con la 5 α R-II (24.79 %). A partir de los modelos generados con estas tres plantillas (**Figura 3-7**) se pudo observar que tanto el modelo **A** construido con la proteína 3BUR, como el modelo **B** construido con la proteína 3BUV son muy similares a los obtenidos cuando se emplearon como plantilla las proteínas 1MG7 y 1UTH obtenidas por alineamiento por la plataforma BLAST. Se observa también que estos modelos presentan muchas regiones de loops y hojas beta (**Figura 3-7**). Por otro lado, el modelo **C** a diferencia de **A** y **B** muestra gran cantidad de α -hélices acercándose a lo predicho por los servidores empleados para el análisis de la estructura secundaria de la secuencia de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana.

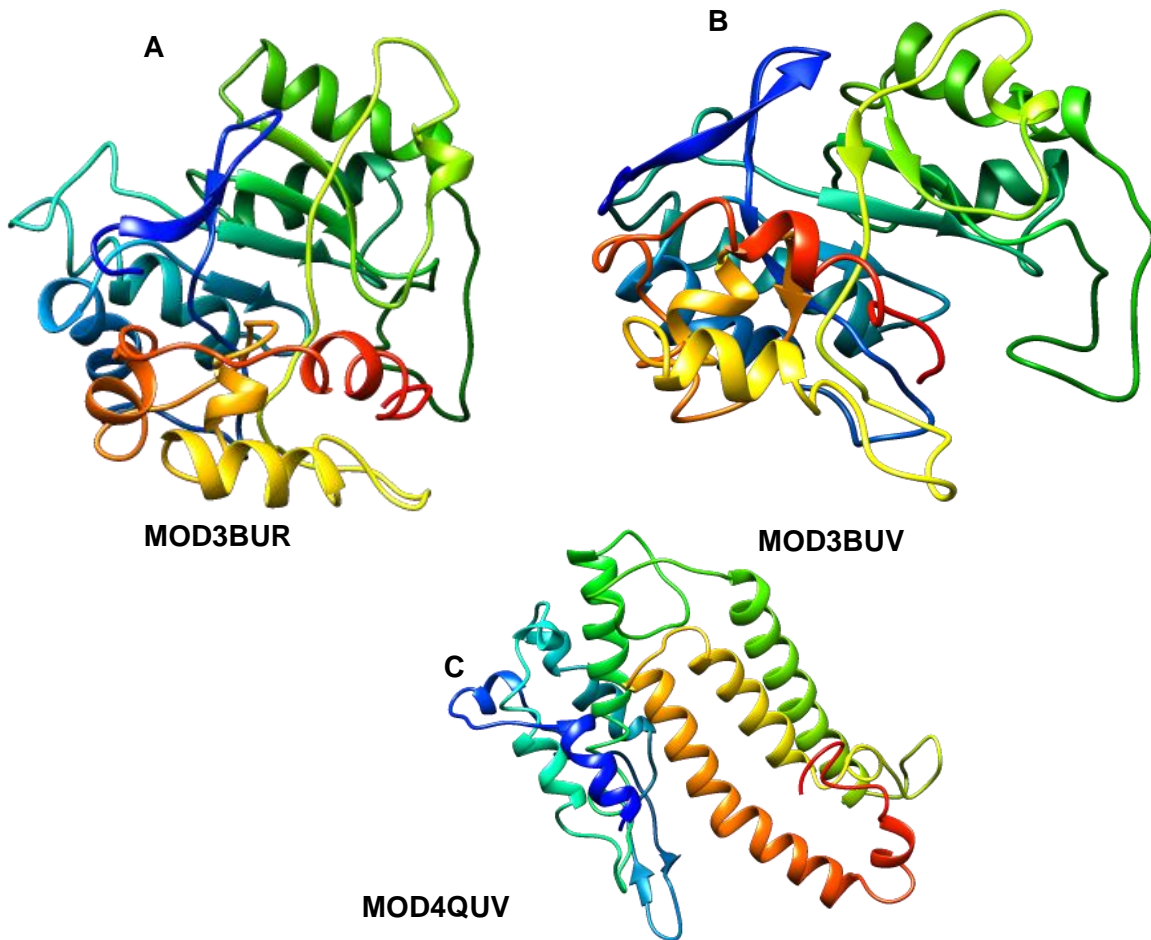


Figura 3-7. Modelos 3D de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana construidos a través del programa MODELLER empleando como plantillas las proteínas reductasas. A. Modelo construido con la proteína 3BUR. B. Modelo construido con la proteína 3BUV. C. Modelo construido con la proteína 4QUV.

Analizando las distancias RMS entre los tres modelos 3D construidos con las plantillas proteicas reductasas (**Tabla 3-8**) se puede confirmar que los modelos **A** y **B** son muy similares entre sí, dado su valor de RMS de 0.5, lo cual era esperado ya que estos modelos fueron construidos con la plantilla de la 5 β R cuya diferencia radica en los sustratos con los cuales están cristalizadas, la 3BUR con testosterona y la 3BUV con HEPES (**Tabla 3-4**). El valor de RMS entre el modelo MOD4QUV y los otros dos modelos (MOD3BUR Y MOD3BUV, **Tabla 3-8**) es grande (22.01 y 21.728, respectivamente) ya que el modelo MOD4QUV fue construido con una plantilla muy distinta a la de la 5 β R, la cual no muestra cercanía estructural ni de secuencia al generar el modelo tridimensional.

Tabla 3-8. Comparación de las distancias RMS entre los modelos 3D de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana construidos a través del programa MODELLER empleando como plantillas las proteínas con actividad reductasa.

Modelos comparados		RMS
MOD3BUR	MOD3BUV	0.513
MOD3BUR	MOD4QUV	22.010
MOD3BUV	MOD4QUV	21.728

3.4.2 Modelos tridimensionales de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana construidos en la plataforma I-TASSER

La plataforma I-TASSER es un servidor automatizado para la predicción de estructura tridimensional de proteínas que utiliza técnicas de reconocimiento por plegamiento o *threading* (Zhang, 2008). El servidor genera la estructura tridimensional tomando en cuenta la proteína plantilla que se ingresó para cada uno de los modelos. En este servidor se ingresó la secuencia de la enzima 5 α R y adicionalmente se proporcionó la secuencia plantilla sin alinear para generar cada uno de los modelos. Al igual que en el modelado por el programa MODELLER, se generaron seis modelos uno con cada plantilla para la 5 α R-II (**Tabla 3-6**) indicando los C-score y TM-Score para los mismos. Con el C-score, I-TASSER evalúa los modelos correlacionando la similitud del modelo final con estructuras determinadas experimentalmente. La puntuación va de -5 a 2 y cuando el modelo muestra una puntuación más positiva indica mejor calidad del mismo (Zhang, 2008).

El TM-Score mide la similitud estructural entre dos estructuras y predice la calidad del modelo calculando su topología (Fiser & Šali, 2003). Un valor de TM-score > 0.5 indica un modelo con correcta topología y TM-score < 0.17 indica similitud al azar. Esto no depende de la longitud de la proteína (Zhang & Skolnick, 2004).

De la misma manera que con los modelos construidos por el programa MODELLER se seleccionó el mejor modelo obtenido con cada plantilla para su análisis.

El servidor muestra cinco modelos construidos para cada plantilla ingresada clasificados según los dos parámetros de score mencionados anteriormente, para los mejores modelos se observó un TM score mayor a 0.5 y un C-score comprendido entre -1.30 a 0.65 mostrando modelos adecuados (Anexo C) siendo los mejores puntajes para los modelos ITA1MG7, ITA3BUR y ITA4QUV (**Figura 3-8**).

La **Figura 3-8** muestra los tres mejores modelos tridimensionales de la enzima 5 α R-II humana construidos por la plataforma I-TASSER, y las plantillas obtenidas por el programa BLAST. Se pueden observar diferencias entre estos modelos y los construidos utilizando las mismas plantillas con MODELLER, en cuanto a la estructura secundaria, encontrándose mayor cantidad de estructura proteica en hélices alfa que en hojas beta, pero de la misma manera que con estas plantillas y MODELLER se encuentran grandes porciones compuestas por loops.

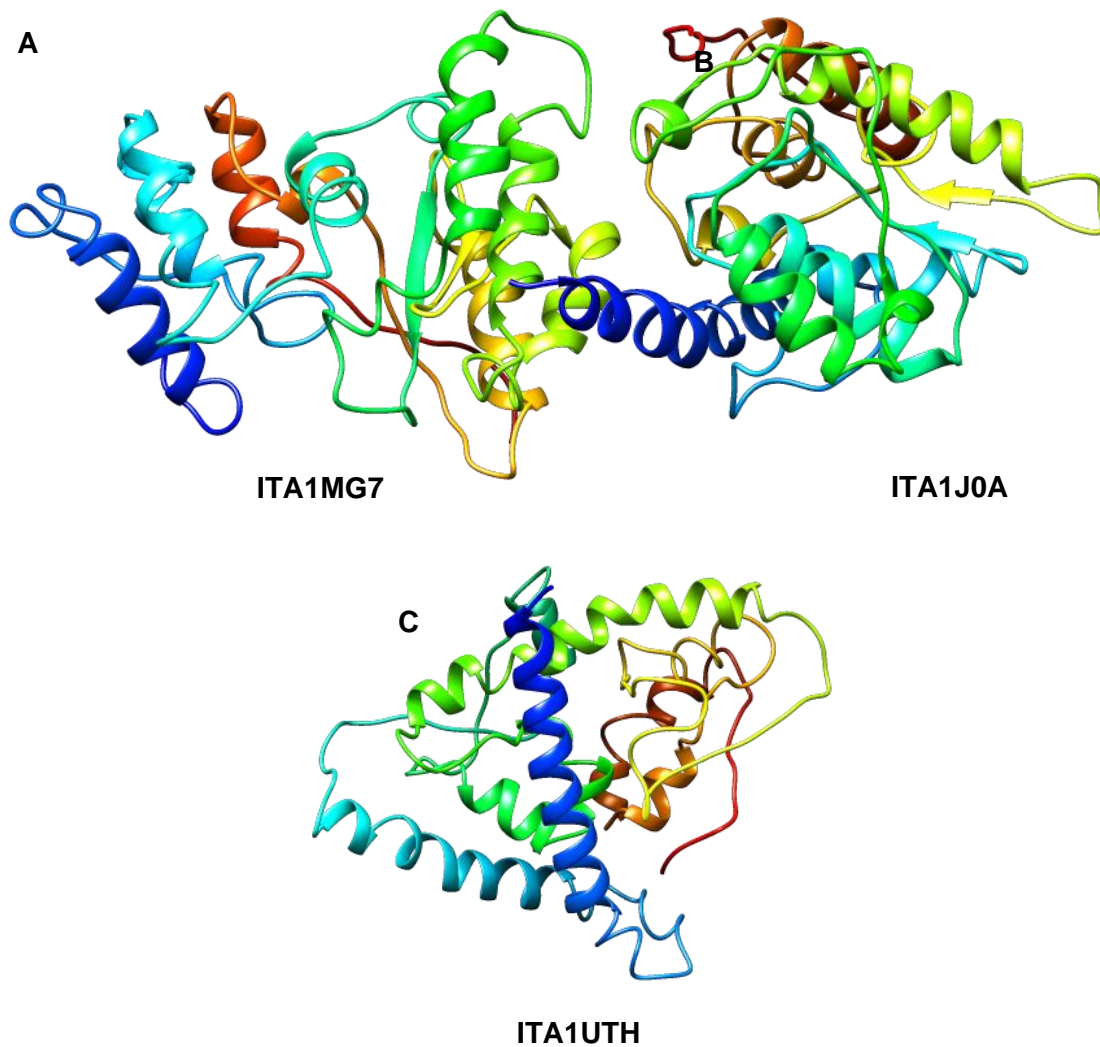


Figura 3-8. Modelos 3D de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana construidos a través de la plataforma I-TASSER empleando como plantillas las proteínas encontradas por alineamiento con BLAST. A. Modelo construido con la proteína 1MG7. B. Modelo construido con la proteína 1J0A. C. Modelo construido con la proteína 1UTH.

En la **Tabla 3-9** se observan las distancias RMS obtenidas de comparar entre sí los tres modelos construidos con I-TASSER y las plantillas con BLAST. Se puede apreciar que las distancias RMS son grandes entre sí lo que permite inferir que el cambiar la plantilla de construcción el modelo cambia drásticamente la disposición de la estructura tridimensional de los modelos, estas diferencias tan amplias hacen que sea necesario evaluar cada uno de los modelos individualmente para determinar si son viables o no como predicciones de la 5 α R-II.

Tabla 3-9. Comparación de las distancias RMS entre los modelos 3D de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana construidos a través de la plataforma I-TASSER empleando como plantillas las proteínas encontradas por alineamiento con la plataforma BLAST.

Modelos comparados		RMS
ITA1MG7	ITA1J0A	20.611
ITA1MG7	ITA1UTH	16.412
ITA1J0A	ITA1UTH	20.304

También se construyeron los modelos tridimensionales para la 5 α R-II humana empleando como plantilla las proteínas con actividad reductasa seleccionadas PDB ID: 3BUR, 3BUV 4QUV (**Figura 3-9**). En este caso, se pueden apreciar unos modelos 3D más organizados estructuralmente que permiten identificar claramente las secciones de hélices alfa organizadas en posición vertical. Sin embargo, cabe mencionar que por el hecho de poseer dicha característica no implica que sean los mejores obtenidos por lo cual se debió llevar a cabo la validación de los mismos.

En la **Tabla 3-10** se observan las distancias RMS obtenidas de la comparación entre los tres modelos 3D construidos para la 5 α R-II humana empleando como plantilla las proteínas con actividad reductasa seleccionadas. Se puede apreciar que dichos valores no son tan grandes como en el caso de los modelos construidos con la plataforma MODELLER y las mismas plantillas reductasas, sin embargo, la distancia es grande de acuerdo a valores aceptables de referencia lo que permite deducir que al cambiar la proteína plantilla para el estudio provoca que el modelo generado cambie en cuanto a su conformación estructural por lo tanto hubo necesidad de determinar la funcionalidad de los modelos mediante los estudios de validación, y de esta manera poder identificar el mejor modelo *in silico* de la 5 α R-II.

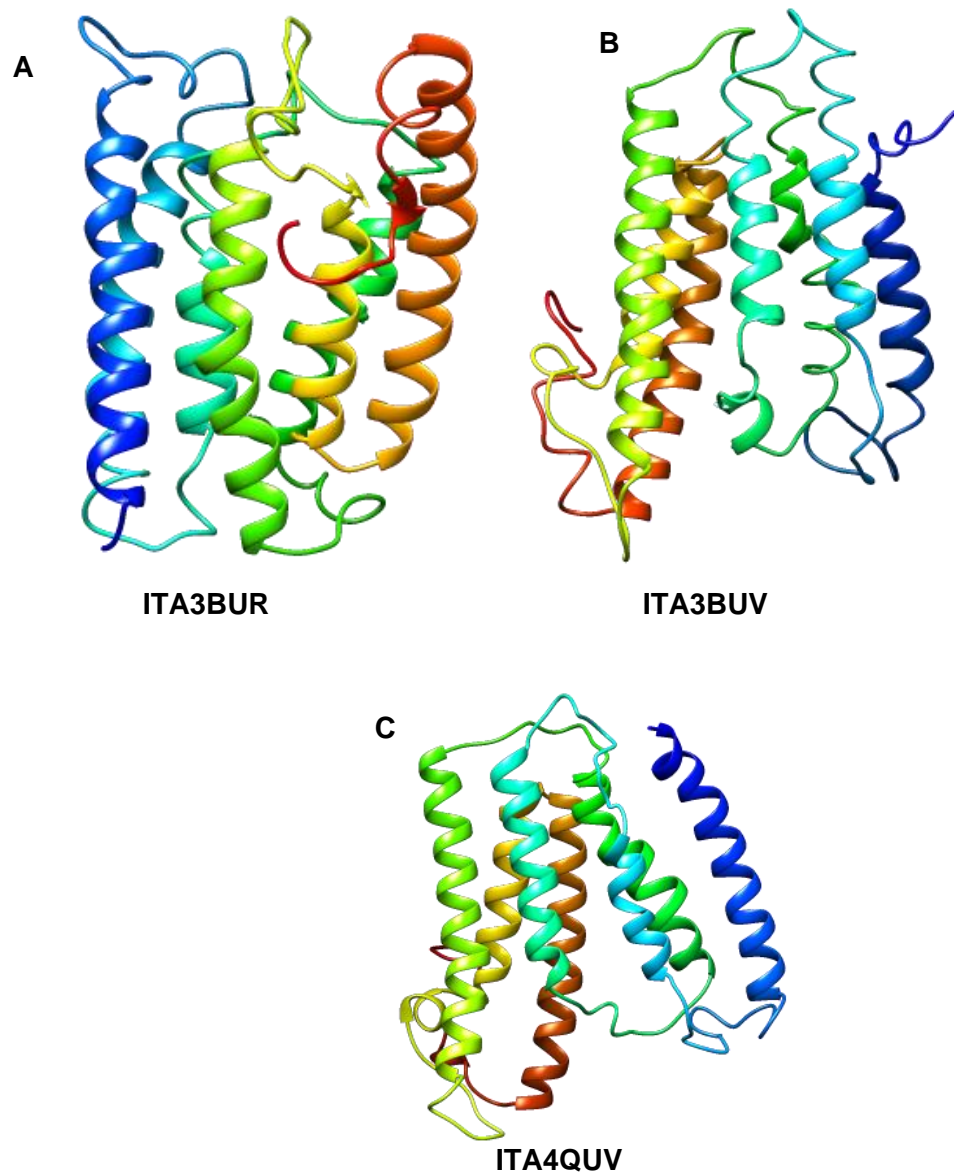


Figura 3-9. Modelos 3D de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana construidos a través de la plataforma I-Tasser empleando como plantillas las proteínas reductasas. A. Modelo construido con la proteína 3BUR. B. Modelo construido con la proteína 3BUV. C. Modelo construido con la proteína 4QUV.

Tabla 3-10. Comparación de las distancias RMS entre los modelos 3D de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana construidos a través de la plataforma I-TASSER empleando como plantillas las proteínas con actividad reductasa.

Modelos comparados		RMS
ITA3BUR	ITA3BUV	4.951
ITA3BUR	ITA4QUV	5.774
ITA3BUV	ITA4QUV	2.017

3.4.3 Modelos tridimensionales de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana construidos en la plataforma PHYRE2

La plataforma PHYRE2 es un servidor automatizado muy sencillo de utilizar donde solo es necesario contar con la secuencia de aminoácidos para realizar la construcción del modelo tridimensional utilizando herramientas de modelado por homología y por *threading* (Kelley, et al., 2015). En este servidor se ingresó la secuencia de aminoácidos y se seleccionó un modelado automático donde la plataforma seleccionó como plantilla de alineamiento para la secuencia de la enzima 5 α R-II a la proteína reductasa identificada como 4QUV:B generando el modelo de la **Figura 3-10** con una confianza del 99.9%. Adicionalmente, este servidor modeló el 80 % de los aminoácidos de la secuencia de la 5 α R-II sin embargo los que no logró modelar fueron los primeros 50 aminoácidos de la 5 α R-II ya que esta parte de la secuencia no se ve cubierta por el alineamiento (**Figura 3-11**). El servidor PHYRE2 además predice la estructura secundaria de la proteína problema, que para el caso de la 5 α R-II muestra estructura desordenada en un 16 %, helices alfa en un 67 %, y hélice transmembranal en un 52% y a diferencia del programa PSIPRED este servidor predice que la proteína no contiene secuencia en hojas beta (Anexo D).

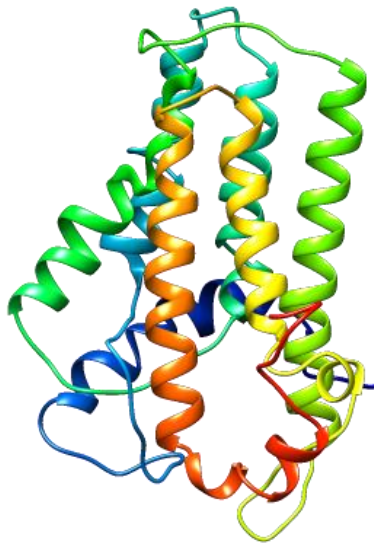


Figura 3-10. Modelo 3D de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana construido a través de la plataforma PHYRE2 empleando como plantilla la proteína reductasa 4QUV: B.

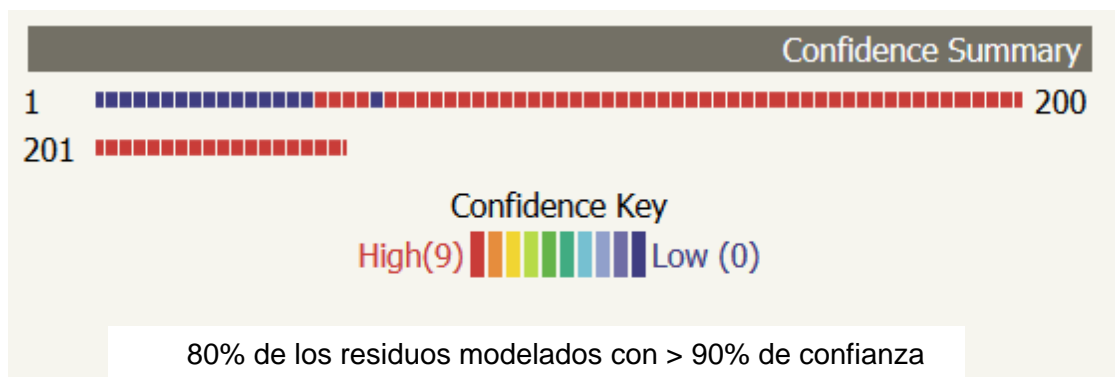


Figura 3-11. Nivel de confianza para el modelado de la enzima 5 α R-II utilizando el servidor PHYRE2.

3.5 Validación de los modelos tridimensionales de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana construidos

Durante los procesos de modelado molecular por los diferentes programas y plataformas solo es necesario realizar algunas acciones para obtener una estructura tridimensional, sin embargo, esto no garantiza que el modelo sea adecuado y refleje la realidad en el organismo, ya que no se dispone de referencia para las regiones de las secuencias de la proteína modelada. Cuando la identidad de la secuencia problema y la

plantilla es inferior al 42 %, aumenta la probabilidad de que el modelo resultante sea inapropiado. Por ello, la evaluación de la calidad de un modelo ha sido una parte de suma importancia para la predicción estructural de proteínas (Rodríguez-Sotres, Samantha, Gaytán-Mondragón, Hernández-Domínguez, & Valencia, 2011).

El proceso de validación de los modelos se realizó por medio de la plataforma SWISS-MODEL, el servidor ProQ y el gráfico de Ramachandran. En cuanto a la plataforma SWISS-MODEL, ésta cuenta con su herramienta llamada QMEAN un servidor exclusivo para la validación de modelos determinados *in silico*, al igual que ProQ que es un servidor muy sencillo basado en redes neuronales que predice la calidad del modelo teniendo en cuenta dos parámetros el LGscore y MaxSub, según la calidad de la composición de los modelos que están siendo evaluados (Wallner & Elofsson, 2003). El gráfico de Ramachandran por su parte, evalúa la correcta disposición de los ángulos de aminoácidos y las cadenas laterales de la enzima modelada (Cooper, 1995).

El servidor QMEAN de SWISS MODEL tiene dos sistemas de puntuación para estimar la calidad de los modelos, el primero se conoce como QMEAN, capaz de evaluar la estructura de la proteína ya sea, de manera global o local (por residuos), sobre la base de un único modelo (Benkert, et al., 2009). El segundo sistema de validación se denomina QMEANclust en donde se determina la puntuación de un modelo mediante análisis diferencial de su estructura con respecto a un grupo de modelos tomados como base fundamentado en que las características estructurales observadas con mayor frecuencia tienen mayor probabilidad de ser correctas (Benkert, et al., 2009).

En el presente trabajo se seleccionó la puntuación QMEAN teniendo en cuenta que en la actualidad no se conoce gran cantidad de estructuras tridimensionales de proteínas trans-membranales por lo tanto, sería un error evaluar un modelo novedoso como el construido de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana, con una muestra de modelos que no comparten grandes similitudes con ella, lo que podría generar un sesgo en la cualificación del modelo de la 5 α R-II.

Los modelos sometidos a validación (**Tabla 3-11**) muestran que el QMEAN score refleja un mejor puntaje para los modelos construidos bajo la plataforma I-TASSER ya que se observan en un rango de 0.2 a 0.4 mientras que los modelos que fueron construidos con el programa MODELLER se encuentra en un rango de 0.1 a 0.2

Para el servidor ProQ también se ve la diferencia entre los modelos construidos con los programas MODELLER e I-TASSER, ya que los construidos con el primero no alcanzan el rango de un modelo válido según el LGscore cuyos valores se encuentran en el rango de 0.6 a 1.4 y según el parámetro MaxSub se encuentran en 0.1; mientras que los modelos de I-TASSER en este servidor se pudieron clasificar como válidos con LGscore en el rango de 2,2 a 3,8 y el MaxSub entre 0.3 y 0.4 (**Tabla 3-11**).

Según la **Tabla 3-6** al evaluarse los modelos por las plataformas QMEAN y ProQ se encontró al modelo ITA3BUR como el mejor, debido a que fue el que presentó las mejores puntuaciones en las dos plataformas. Los modelos construidos con la plataforma I-TASSER mostraron mayores puntuaciones que los construidos con el programa MODELLER tanto en QMEAN como en ProQ debido al tipo de predicción que realiza I-TASSER que tiene en cuenta el plegamiento de proteínas similares, mientras MODELLER construye los modelos por homología, según las proteínas que tengan mayor porcentaje de identidad en los estudios de alineamiento (Eswar, et al., 2006). Dado que los modelos construidos en MODELLER no generaron un puntaje adecuado bajo los parámetros propios del servidor, se puede decir que no se encontraron proteínas adecuadas para una construcción del modelo 3D de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana en dicha plataforma, básicamente porque no se encontraron plantillas homologas cristalizadas de función similar. Por lo tanto, los mejores modelos 3D de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana se realizaron con el servidor I-TASSER (Zhang, 2008) (**Figura 3-9**) mostrando los mejores puntajes y coincidencia visual entre la estructura secundaria modelada y la predicha con el programa PSIPRED.

Tabla 3-11. Parámetros de validación para los modelos tridimensionales de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana construidos en las distintas plataformas informáticas.

Modelo	Parámetro de validación			
	QMEAN score ¹	ProQ		Gráfico de Ramachandran (%) ²
		LGscore	MaxSub	
ITA3BUR	0.446	3.843	0.411	90.5
ITA3BUV	0.373	2.917	0.204	75.4
ITA1J0A	0.305	3.395	0.378	79.6
ITA1MG7	0.237	2.216	0.246	82.0
ITA1UTH	0.305	3.390	0.410	73.9
ITA4QUV	0.381	3.476	0.273	87.2
MOD1J0A	0.181	1.433	0.125	82.5
MOD1MG7	0.198	1.352	0.164	83.9
MOD1UTH	0.061	0.659	0.008	84.8
MOD3BUR	0.152	1.017	0.104	89.6
MOD3BUV	0.146	0.868	0.099	84.4
MOD4QUV	0.222	1.123	0.106	85.8
PHYRE2	0.336	2.146	0.290	80.1

¹score global obtenido mediante QMEAN. ²Porcentaje de aminoácidos en las regiones más favorables.

En cuanto a los resultados del gráfico de Ramachandran para los modelos 3D de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana construidos con la plantilla 3BUR, indistintamente del programa utilizado para su construcción, se encontró que los modelos ITA3BUR (Anexo E) y MOD3BUR muestran en un 90.5 y 89.6 %, respectivamente, los ángulos de los aminoácidos en la región más favorable lo cual era de esperarse para este tipo de modelos (Cooper, 1995). Dado que los demás modelos tienen un 80 % de los aminoácidos en la región favorable, nos permite inferir que estos modelos no están construidos adecuadamente. Por lo tanto, la elección del mejor modelo se basó en aquel con las mejores puntuaciones en cada uno de los ensayos infiriendo al ITA3BUR como el válido.

A modo de ejemplo, a continuación se presenta el análisis de la validación del modelo ITA3BUR de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana, construido en la plataforma I-TASSER empleando como plantilla la proteína con actividad reductasa 3BUR. Para ello, el modelo se optimizó geoméricamente por gradiente con el campo de fuerza OPLS_2005

por medio del programa Maestro (Schrodinger, 2011a) a fin de calcular su calidad absoluta estimada después de la minimización energética (**Figura 3-12**), la cual se determinó por comparación con un conjunto de estructuras proteicas 3D de tamaño similar, obtenidas experimentalmente con alta resolución por difracción de rayos X. Dicha comparación se hizo mediante la puntuación denominada Z-score, que en el caso del modelo ITA3BUR el Z-score QMEAN fue de -3.46 indicando que difiere de los valores esperados según las estructuras 3D experimentales (**Figura 3-12A**). El valor Z-score QMEAN va acompañado de una gráfica de densidad de puntajes (**Figura 3-12B**) tomados como referencia y es una proyección de la primera gráfica (**Figura 3-12A**) en donde se muestra una distribución de los puntajes de las estructuras en donde se ubica el modelo ITA3BUR. Para el presente ejemplo, el modelo ITA3BUR no se ubica dentro de la distribución normal de la gráfica de densidad de puntajes (**Figura 3-12B**), además tiene un QMEAN score global de 0.446. Cabe mencionar que el valor normal de QMEAN va de 0 a 1 indicando la fiabilidad del modelo, donde los valores más cercanos a cero indican baja fiabilidad y los más cercanos a 1 indican que el modelo es fiable (Benkert, et al., 2008). Para este valor se tienen en cuenta todos los parámetros analizados por el Z-score. En cuanto a la evaluación local, esta mostró que prácticamente todos los aminoácidos se encuentran en regiones fiables no mayores a 3.5 Å como se puede ver en la **Figura 3-12**.

El modelo el ITA3BUR fue el que obtuvo los mejores puntajes de evaluación y aunque estos no se ubican dentro de los modelos que se pueden considerar fiables, hay que tener en cuenta que la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana al ser una enzima trans-membranal, este tipo de modelos pueden obtener puntuaciones muy bajas ya que sus propiedades fisicoquímicas difieren considerablemente en comparación a las enzimas solubles las cuales son consideradas por el Z-score (Benkert, et al., 2011; Benkert, et al., 2008).

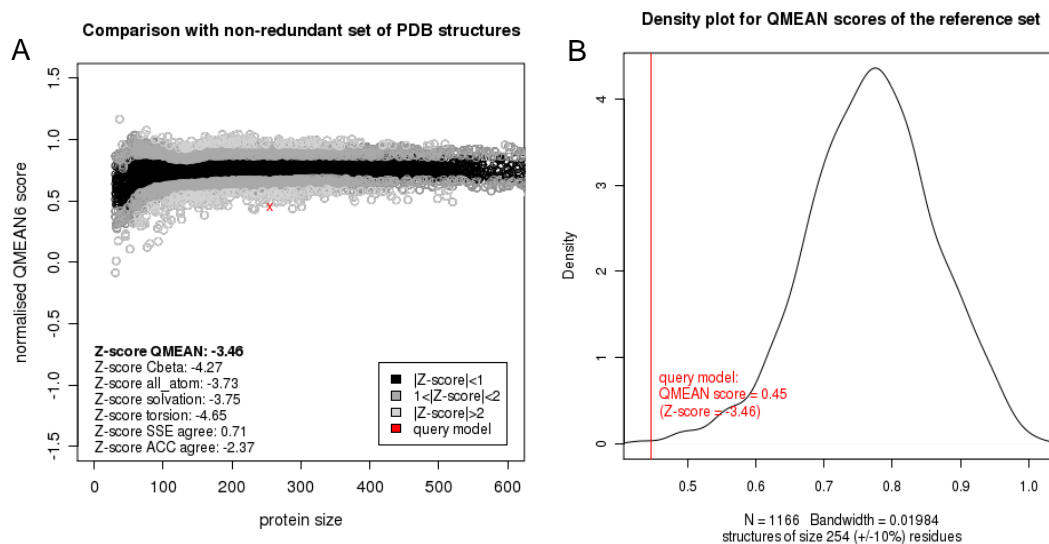


Figura 3-12. Puntajes globales para el modelo tridimensional de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana ITA3BUR, construido en la plataforma I-TASSER empleando como plantilla la proteína con actividad reductasa 3BUR. A. Diagrama de comparación con estructuras proteicas determinadas experimentalmente por difracción de rayos. B. Gráfica de densidad de puntajes para 1166 estructuras proteicas.

El análisis del modelo ITA3BUR por ProQ arrojó un LGscore de 3.843 y un MaxSub de 0.311 en donde un LGscore y un MaxSub > a 2.5 y 0.5, respectivamente son indicativos de modelos predichos adecuadamente (Wallner & Elofsson, 2003). El valor de LGscore busca los segmentos de la proteína no continuos más significantes correctamente conformados. El parámetro MaxSub se calcula a partir de la mayor cantidad de residuos que se pueden encontrar en una distancia corta de 3.5 Å entre el modelo y una estructura comparada (Cristobal, Zemla, Fischer, Rychlewski, & Elofsson, 2001).

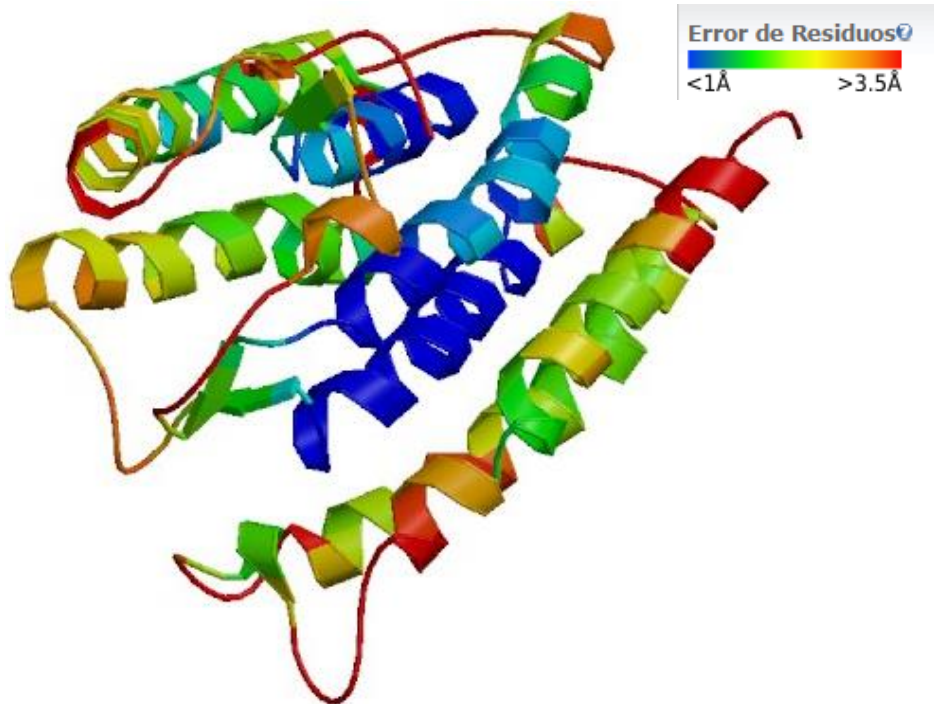


Figura 3-13. Modelo tridimensional ITA3BUR para la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana, construido en la plataforma I-TASSER empleando como plantilla la proteína con actividad reductasa 3BUR. Gráfico de error de residuos en evaluación local del modelo por el programa swiss-model.

Otro de los parámetros que se analizaron durante la construcción y validación del modelo 3D de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana correspondió a la evaluación del modelo mediante el gráfico de Ramachandran (Cooper, 1995). En él se pueden visualizar todas las combinaciones posibles de ángulos diedros Ψ (psi) contra Φ (phi) en los aminoácidos de un polipéptido que contribuyen a la conformación de la estructura de las proteínas, a modo de ejemplo se utilizó el mismo modelo el ITA3BUR (Anexo E). El proceso de validación por el gráfico de Ramachandran se realiza por la clasificación de los aminoácidos de los modelos construidos en tres regiones, el modelo estudiado contiene el 90.5 % de los aminoácidos en las regiones más favorables del gráfico siendo A, B y L las zonas de color rojo más intenso; el 6.6 % se encuentran en regiones adicionales permitidas a, b, l y p que son de color amarillo en el gráfico; el 2.8 % de los residuos se encuentran en regiones generosamente permitidas \sim a, \sim b, \sim l y \sim p que son de color beige y un 0 % en regiones no permitidas. Se espera que siempre los aminoácidos se encuentren en las regiones más favorables, si esto no es así es necesario realizar modificaciones al modelo con el fin de mejorar los ángulos y posiciones de los mismos, al

igual que con la evaluación en las diferentes plataformas el mejor modelo calificado es el que se muestra en el ejemplo: ITA3BUR.

3.6 Acoplamiento molecular (*docking*) entre los modelos tridimensionales de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana construidos y sustrato e inhibidores

Para los estudios de acoplamiento molecular de los modelos tridimensionales construidos se prepararon los inhibidores como se indica en la metodología (Sección 2.2.10) y se adecuó la enzima como se indica en (Sección 2.2.11).

3.6.1 Determinación del sitio catalítico en el modelo tridimensional de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana

Dado que la diana biológica, en este caso la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana, no proviene de una estructura determinada experimentalmente por difracción de rayos X o RMN, sino que se trata de un modelo construido computacionalmente, esta no contiene un sustrato unido a ella que permita conocer las coordenadas espaciales donde se une éste, es decir, no se conoce la ubicación de su sitio activo o catalítico. Por esta razón, fue necesario identificar dicha zona para realizar el estudio de acoplamiento molecular porque es precisamente en este sitio donde se espera haya acoplamiento entre el sustrato endógeno e inhibidores con la enzima 5 α R (Meng, et al., 2011). Con la finalidad de identificar el sitio catalítico de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana en el modelo tridimensional construido (ITA3BUR), se utilizaron dos métodos, en el primero se realizaron ensayos de acoplamiento molecular ciego (*blind docking*) (Meng, et al., 2011). Se estableció una rejilla de interacción amplia (zona de estudio o acoplamiento) y utilizando la testosterona como sustrato endógeno, para determinar la interacción sobre toda la estructura proteica y conocer los sitios potenciales donde el sustrato tiene preferencia de unión. En el segundo método, se utilizó la herramienta SiteMap (versión 2.5) (Schrodinger, 2011d) perteneciente a la suite de *Schrodinger* la cual se especializa en predecir los posibles sitios de unión a una determinada proteína. Para ello, evalúa la superficie proteica, observando el tipo de aminoácido en la superficie evaluada y la accesibilidad al mismo, para identificar sitios de unión adecuados y generar mapas de sitios hidrofóbicos e hidrofílicos según las características del sitio de unión o sitio activo determinado (Schrodinger, 2011d). Los mapas de sitios hidrofílicos se dividen a su vez en

zonas de grupos donadores para formación de enlaces por puentes de hidrógeno; en zonas de grupos aceptores para formación de enlaces por puentes de hidrógeno y en regiones de grupos de unión a metal; luego calcula las propiedades hidrofílicas o hidrofóbicas de cada sitio y las muestra en el programa Maestro por medio de una escala de colores (Halgren, 2007).

A los 12 modelos de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana que se validaron (**Tabla 3-6**) se les realizó la búsqueda amplia (*blind docking*) de las regiones de mayor accesibilidad y que por sus propiedades fisicoquímicas, tienen la mayor probabilidad de unión con el sustrato endógeno testosterona a fin de identificar el sitio catalítico de la enzima. Además, se realizó la búsqueda de este sitio por medio de la herramienta SiteMap (Schrodinger, 2011d), que muestra los resultados visuales adicionando una red de puntos sobre la estructura proteica además de puntuar numéricamente mediante un "Dscore" (valor obtenido según el algoritmo que utiliza SiteMap para la evaluación de dianas biológicas) y tener en cuenta el tamaño de la región sobre la cual se llevó a cabo el acoplamiento, mostrando un valor numérico identificado como "size" (tamaño). A modo de ejemplo, en la **Figura 3-14** se muestra la red del sitio de unión identificada para el modelo ITA3BUR pudiéndose observar la red de puntos de color gris que identifica la zona hidrofóbica, además del Dscore con valor de 1.163. Se esperaría que una rejilla con características apropiadas para unión de sustratos o ligandos tuviera un valor de Dscore mayor a 1.0 (Schrodinger, 2011d) sin especificar el tamaño.

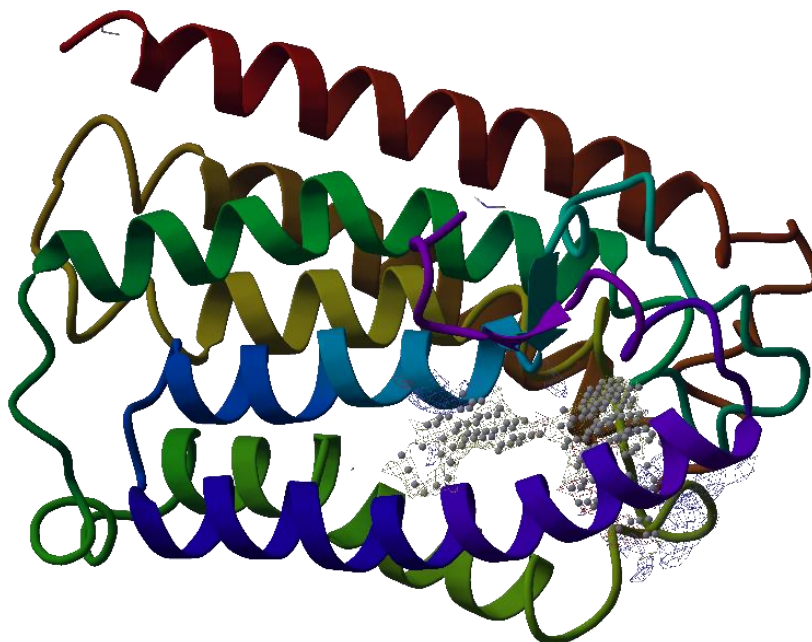


Figura 3-14. Determinación del sitio catalítico en el modelo tridimensional ITA3BUR para la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana. Sitio determinado por medio del programa SiteMap. En gris se observa la región identificada como adecuada para el acoplamiento de los sustratos de la 5 α R-II.

Para identificar si esta región catalítica determinada por el estudio de acoplamiento molecular amplio era la misma que la determinada por el estudio de acoplamiento fino, se llevó a cabo la sobre posición de los complejos del modelo ITA3BUR de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana acoplados con la testosterona y con sus inhibidores finasterida y dutasterida como se puede observar en la **Figura 3-15**. Se encontró que tanto la testosterona como los inhibidores se ubican en la misma región y optan por una orientación espacial muy similar (**Figura 3-15 A a C**). Cuando se comparan en conjunto sobre el modelo ITA3BUR (**Figura 3-15D**) también se aprecia que éstos se ubican en la misma región del modelo de la enzima, permitiendo así identificar que el sitio catalítico tanto para el andrógeno endógeno testosterona como para los inhibidores es el mismo. De manera adicional, el cálculo de energía libre de unión tanto para el acoplamiento molecular amplio como para el fino fue de alrededor -10 kcal/mol, mostrando que la unión por los dos métodos es igual de favorable (**Tabla 3-12**).

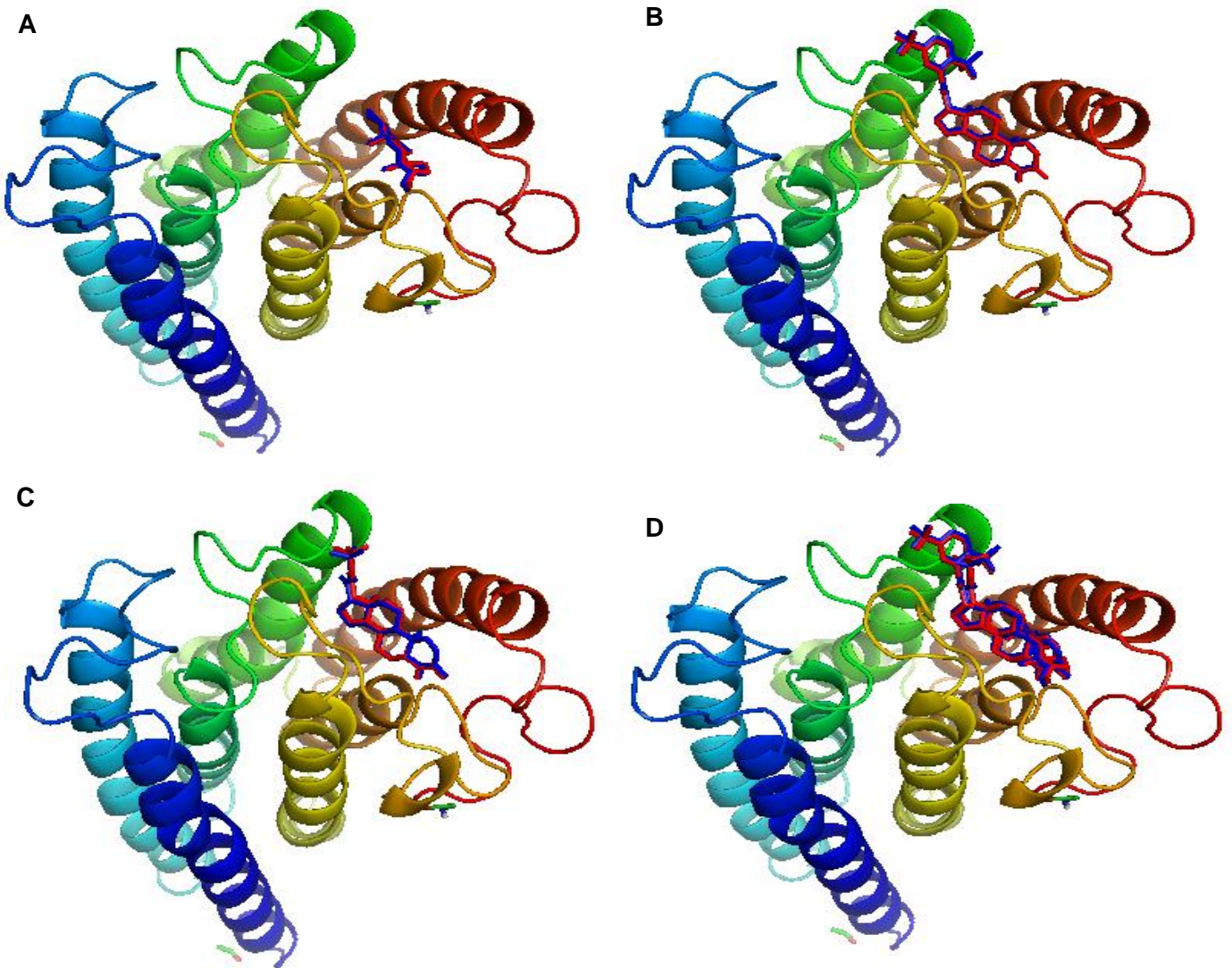


Figura 3-15. Sobre-posición de los complejos del modelo ITA3BUR de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana acoplados con la testosterona (A) y con sus inhibidores dutasterida (B) y finasterida (C) y los tres modelos sobre puestos (D). Las moléculas en color azul representan al sitio determinado mediante acoplamiento molecular amplio y en color rojo al obtenido por acoplamiento molecular fino.

Tabla 3-12. Energía libre de unión ($\Delta G_{\text{unión}}$) calculada durante el acoplamiento molecular amplio (blind *docking*) y fino entre el modelo tridimensional de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana ITA3BUR y su sustrato endógeno testosterona e inhibidores finasterida y dutasterida. Cm: número de conformaciones para el clúster que presentó con esa energía el mayor número de repeticiones.

Molécula/Tipo de acoplamiento molecular	Testosterona		Finasterida		Dutasterida	
	Fino	Amplio	Fino	Amplio	Fino	Amplio
$\Delta G_{\text{unión}}$ (Kcal/mol) (Cm)	-10.54(100)	-10.36(66)	-10.31(100)	-10.08(28)	-10.81(100)	-10.00(29)

El estudio de acoplamiento molecular amplio y fino permitió la obtención de las coordenadas tridimensionales para los sitios activos para los demás modelos obtenidos (**Tabla 3-13**), las cuales fueron utilizadas posteriormente para especificar la región donde se llevaría a cabo el estudio de acoplamiento molecular en modo más detallado.

Tabla 3-13. Centro de coordenadas para estudio de acoplamiento molecular determinadas por el programa SiteMap para los modelos construidos de la enzima 5- α -reductasa tipo 2 humana.

Modelo	Coordenada X	Coordenada Y	Coordenada Z
MOD1MG7	35.2543	24.3574	7.0098
MOD1J0A	50.0288	92.1053	19.6924
MOD1UTH	61.1231	5.9962	75.0454
MOD3BUR	16.727	-14.9611	-7.9776
MOD3BUV	10.087	-16.4433	1.5112
MOD4QUV	-7.557	-2.215	-16.227
ITA1MG7	-3.6921	0.9963	-2.4479
ITA1J0A	7.9536	0.0546	-4.2056
ITA1UTH	7.465	-2.665	-19.3775
ITA3BUR	-11.15	3.9271	8.5547
ITA3BUV	59.586	58.632	70.214
ITA4QUV	0.8633	-3.1711	2.15

3.7 Acoplamiento molecular de los modelos tridimensionales de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana con la testosterona, finasterida y dutasterida

El estudio de acoplamiento molecular de los doce modelos 3D de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana construidos en los diferentes programas (**Tabla 3-13**) con el sustrato endógeno testosterona e inhibidores finasterida y dutasterida se llevó a cabo en el programa AutoDock4 (Morris, et al., 2009) bajo los parámetros indicados en la parte metodológica (Apartado 2.2.9) tomando en cuenta las coordenadas de unión de la **Tabla 3-13** identificadas durante el estudio de *docking* ciego y amplio con el modelo ITA3BUR.

Los cien resultados de los modos de unión obtenidos para cada inhibidor se clasificaron en grupos (*clusters*) de acuerdo ya sea a su similitud en el modo de unión, el valor de energía de unión calculada expresada como energía libre de unión ($\Delta G_{\text{unión}}$, kcal/mol) y según el valor de RMSD. De acuerdo al valor RMSD la clasificación se realiza por comparación de la distancia entre coordenadas de una conformación o uno de los resultados (conformación 1) con otra (conformación 2), si dicho valor es menor a 0.5, esta conformación (conformación 2) es ubicada en el mismo clúster pero si es mayor, se genera un nuevo grupo y se procede a comparar otra de las conformaciones (conformación 3) con el primer clúster (Morris & Lim-Wilby, 2008). Si el valor RMSD de esta nueva comparación (conformación 3 vs conformación 1) es mayor a 0.5, se compara con el segundo clúster y así sucesivamente hasta ir organizando las corridas. Los clústeres del estudio de acoplamiento molecular se muestran como histogramas indicando el número de conformaciones según la energía de unión para cada conformación (Anexo F, G y H).

Los resultados del acoplamiento molecular entre la enzima la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana y su sustrato endógeno testosterona e inhibidores finasterida y dutasterida (**Tabla 3-14**) presentaron valores de $\Delta G_{\text{unión}}$ en un rango de -10.81 a -5.62 kcal/mol, que al ser negativos indican un acoplamiento energéticamente favorable entre ellos. Cabe mencionar un valor de energía libre de unión más negativo es indicativo de una unión más favorable entre el ligando y la diana biológica (Wang, Edupuganti, Tavares, Dalby, & Ren, 2015). En la **Tabla 3-14**, en paréntesis se muestra el número de conformaciones (Cm) para el clúster que presentó con esa energía el mayor número de repeticiones.

Tabla 3-14: Energía libre de unión ($\Delta G_{\text{unión}}$) calculada para el acoplamiento molecular entre los diferentes modelos tridimensionales construidos de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana y su sustrato endógeno testosterona e inhibidores finasterida y dutasterida.

Modelo	$\Delta G_{\text{unión}}$ (Kcal/mol)		
	Testosterona (%*Cm)	Finasterida (%*Cm)	Dutasterida (%*Cm)
ITA1J0A	-9.78 (100)	-8.08(70)	-6.19(46)
ITA1MG7	-9.46(100)	-10.17(100)	-5.62(57)
ITA1UTH	-8.73 (100)	-6.59(49)	-5.74(55)
ITA3BUR	-10.54(100)	-10.31(100)	-10.81(100)
ITA3BUV	-8.14(76)	-8.01(75)	-8.06(55)
ITA4QUV	-9.40(82)	-8.80(72)	-8.70(87)
MOD1J0A	-8.18(74)	-7.93(87)	-7.16(45)
MOD1MG7	-10.02(72)	-7.76(51)	-7.90(38)
MOD1UTH	-8.89(100)	-8.08(100)	-7.37(43)
MOD3BUR	-8.65(96)	-8.39(60)	-9.04(48)
MOD3BUV	-8.28(34)	-8.86(63)	-8.64(34)
MOD4QUV	-9.27(100)	-9.59(90)	-9.97(30)

*Cm: número de conformaciones para ese valor de energía libre.

En los primeros tres modelos de la **Tabla 3-14** (ITA1J0A, 1MG7 y 1UTH), obtenidos por el servidor I-TASSER empleando como plantilla las proteínas obtenidas por alineamiento con la plataforma BLAST, se observa un valor de energía libre de unión entre -8 y -9 Kcal/mol indicativa de una unión muy favorable entre la enzima 5 α R-II y la testosterona. Además se puede apreciar que para la testosterona las 100 conformaciones obtenidas se encuentran agrupadas en un solo clúster mostrando un valor de RMSD no mayor a 0.2 por lo que se agrupa en un histograma (Anexo Fa). Para el inhibidor finasterida, se presentan energías de unión de -6 a -8 kcal/mol, sin embargo los modelos ITA1J0A e ITA1UTH muestran pocas conformaciones en el clúster con mayor número de repeticiones (70 y 49, respectivamente) a diferencia del modelo ITA1MG7 que refleja un único clúster (Anexo F b). En el caso del inhibidor dutasterida los valores de energía de unión están entre -5 y -6 kcal/mol con distribución de conformaciones en varios *clúster*, donde el histograma con mayor número de conformaciones es de 57 lo que quiere decir que el sustrato inhibidor toma diferentes conformaciones en la rejilla de acoplamiento seleccionada dividiendo los cien resultados en varios *clúster* (grupos) (Anexo F c). Esto

indica que la dutasterida tiene más variabilidad en el sitio de unión con respecto a la testosterona, ya que la dutasterida cambia de posición y muestra más conformaciones de unión en el sitio catalítico.

Los dos modelos construidos con el servidor I-TASSER (ITA3BUR y ITA3BUV) tomando como proteína patrón a la 5 β -reductasa reflejan una unión muy favorable hacia el sustrato endógeno y los inhibidores estudiados dado que sus valores de energía de unión son negativos y están en el rango de -8 a -10 kcal/mol (**Tabla 3-14**). El modelo identificado como ITA3BUR, fue de todos los modelos evaluados el que presentó la energía de unión más negativa con promedio de -10 kcal/mol tanto para la testosterona como para los inhibidores, además de que en una sola conformación para cada molécula acoplada se observa un solo clúster para las cien corridas y un RMSD no mayor a 0.2 indicando que la unión es muy estable y específica. El modelo ITA3BUV refleja una energía promedio de -8 kcal/mol tanto para la testosterona como para los inhibidores con histogramas de 76, 75 y 55 repeticiones, respectivamente. El modelo ITA4QUV presenta energías de unión similares a las reflejadas por los modelos que utilizan como plantilla la 5 β .

Con relación a los modelos construidos en el programa MODELER, éstos muestran en general energías libres de unión adecuadas (**Tabla 3-14**). Dado que los modelos MOD1J0A, MOD1MG7 y MOD1UTH para la testosterona y la finasterida muestran pocos clústeres (Anexo Ga) se puede inferir que la mayoría de sus conformaciones tienen una energía de unión similar a diferencia de lo observado para la dutasterida donde el clúster muestra un histograma de pocas repeticiones indicando que múltiples conformaciones están distribuidas en los demás clústeres mostrando diferentes RMSD y energías de unión.

Para el modelo MOD3BUR se observa una energía libre de unión ($\Delta G_{\text{unión}}$ (Kcal/mol))= -8 para la finasterida e inhibidores y un solo clúster para la testosterona, en el caso de finasterida y dutasterida se observan varios clúster, sin embargo a diferencia de los modelos construidos en el programa MODELLER empleando como plantillas las obtenidas por alineamiento por BLAST (MOD1J0A, MOD1MG7 Y MOD1UTH), en la dutasterida se muestra un clúster con más repeticiones con la misma energía que las generadas con la finasterida, lo que nos muestra un sitio de unión más específico para los dos inhibidores en el modelo nombrado como ITA3BUR, ya que con los otros modelos se ve mayor variabilidad en los resultados mostrando diferentes conformaciones.

El modelo MOD3BUV muestra energías de unión de -8 kcal/mol (**Tabla 3-14**) pero con variedad de conformaciones para el estudio de acoplamiento con la testosterona e inhibidores. Dado que el clúster mayor posee 63 conformaciones para la finasterida, muestra que los otros 37 resultados se dividieron en otros modos de unión del inhibidor, mostrando variabilidad en el acoplamiento a la misma.

El modelo MOD4QUV presenta las mejores energías libres de unión = -9 kcal/mol para los modelos construidos con el programa MODELLER mostrando prácticamente un solo clúster tanto para la testosterona como para la finasterida (**Tabla 3-14**), sin embargo, para la dutasterida aunque se muestra un clúster de 30 repeticiones con una energía de unión de -9.97, las otras conformaciones se reparten en 8 clúster con energías entre -8 y -9 kcal/mol para este modelo (Anexo H).

En general todos los modelos mostraron unión favorable tanto a la testosterona como a los inhibidores seleccionados para el estudio, reflejado por su valor de energía libre de unión negativo ($-\Delta G_{\text{unión}}$), por lo tanto este criterio no fue determinante para discriminar al mejor modelo 3D de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana construido.

Según los resultados de la **Tabla 3-14** el modelo tridimensional de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana que posee la unión más favorable tanto para el sustrato endógeno testosterona como para sus inhibidores dutasterida y finasterida es el ITA3BUR, construido en la plataforma I-TASSER tomando como plantilla la proteína 3BUR. Adicionalmente, este modelo posee el mismo sitio catalítico predicho por el estudio de *docking* amplio y fino tanto para la testosterona como para la finasterida y dutasterida (**Figura 3-15**) mostrando un solo clúster para cada una de las cien conformaciones evaluadas (Anexo I).

3.7.1 Determinación de las interacciones moleculares entre el sitio catalítico del modelo tridimensional de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana y su sustrato endógeno e inhibidores

Debido a que la estructura tridimensional de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana no ha podido ser determinada de manera experimental, no se conoce con exactitud cuáles aminoácidos en su sitio catalítico le permiten establecer la unión con su sustrato endógeno testosterona e inhibidores dutasterida y finasterida. Los únicos acercamientos que a la fecha han permitido identificar dichas interacciones consisten en la realización de estudios

in vitro de mutagénesis donde se produce la mutación sobre pequeñas series de aminoácidos en la enzima aislada y luego se analiza la modificación de la afinidad de la enzima mutada por su sustrato endógeno y por sus inhibidores (Makridakis, di Salle, & Reichardt, 2000).

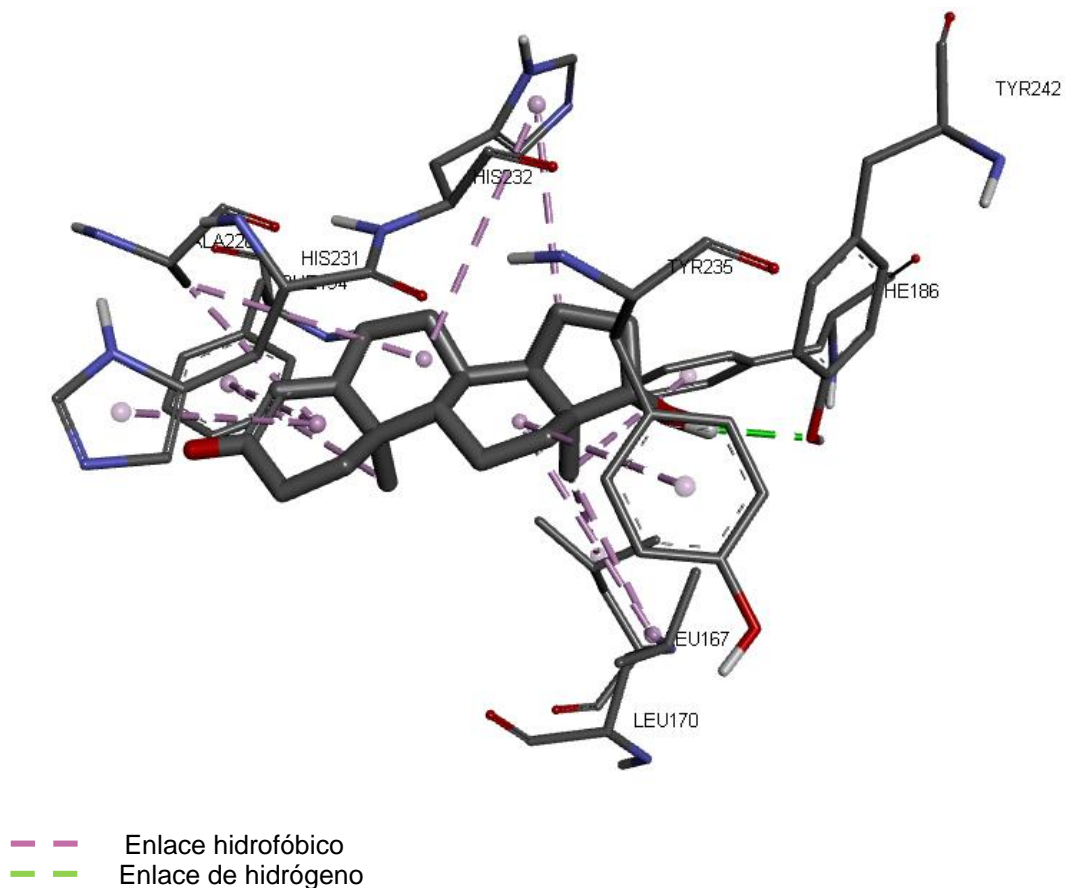
En este sentido, los estudios previos (Jin & Penning, 2001; Wigley et al., 1994) han permitido identificar que las mutaciones sobre los aminoácidos glicina 34 (Gly34) e histidina 231 (His231) afectan la afinidad de la enzima para la unión a la testosterona (Makridakis, et al., 2000). También se han podido determinar que los aminoácidos indispensables para la unión del cofactor NADPH son la arginina 145 (Arg145), arginina 171 (Arg171), prolina 181 (Pro181), glicina 183 (Gly183), asparagina 193 (Asn193), glicina 196 (Gly196) y arginina 246 (Arg246) (Wigley, et al., 1994). Wigley y colaboradores (1994) asegura que la región correspondiente a los aminoácidos 21 al 34 de la cadena peptídica de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana pueden disminuir la unión del andrógeno endógeno testosterona y de sus inhibidores a la enzima. También se ha determinado que al mutarse la región de los aminoácidos 230 a 232 de la cadena peptídica compuesta por aminoácidos histidinas, región que se encuentra conservada tanto en la enzima 5 α R-I como en la 5 α R-II tanto humana como de rata, se inactiva la acción catalítica de la enzima (Baxter, Trivic, & Lee, 2001; Wigley, et al., 1994). Algunos estudios de mutagénesis (Baxter, et al., 2001) determinan que la región importante para la unión de sustratos a la enzima es la comprendida entre los aminoácidos 15 al 20 para la 5 α R-II, mientras que otros (Makridakis, et al., 2000) muestran que las regiones para la unión de la testosterona y los inhibidores es la misma aunque hay zonas más amplias haciendo referencia a la región de los aminoácidos 5 al 89 y del 187 al 234, aunque no se indica si éstos son los aminoácidos indispensables o si son los mismos para la unión de los sustratos e inhibidores (Makridakis, et al., 2000). De manera adicional, se establece que el cofactor NADPH se une a la cadena peptídica de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana en la región comprendida por los aminoácidos 187 y 230 (Leme de Calais et al., 2011).

Como se desprende de lo anterior, a la fecha no se ha podido concretar cuáles aminoácidos en el sitio catalítico de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana le permiten establecer la unión con su sustrato endógeno testosterona e inhibidores dutasterida y finasterida pudiéndose solo reconocer algunas regiones de aminoácidos sobre la cadena peptídica (15 al 80 e histidinas 230 a 232) importantes para la actividad catalítica (Wigley, et al., 1994). Cabe mencionar que la región de los aminoácidos histidina por ser una región

conservada, mostró el mismo rol en todas las proteínas estudiadas incluso aisladas de organismos diferentes al humano (Bhattacharyya, Chavan, Haley, Taylor, & Collins, 1995; Wigley, et al., 1994)



Tomando como base el modelo 3D construido en el presente estudio para la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana ITA3BUR y su acoplamiento molecular con su sustrato endógeno testosterona (**Figura 3-15 A**) e inhibidores finasterida (**Figura 3-15 B**) y dutasterida (**Figura 3-15 C**), se analizaron las interacciones moleculares presentes entre ellos. Primeramente, se abordarán las interacciones encontradas durante el acoplamiento con la testosterona y posteriormente con los inhibidores.

El acoplamiento entre el modelo 3D ITA3BUR y la testosterona (**Figura 3-16**) mostró la presencia de interacciones hidrofóbicas entre los aminoácidos Leu167, Leu170, Phe186 Phe194, Ala228, His232 y Try235 del modelo 3D con el núcleo esteroidal de la testosterona. También se encontró que se forman interacciones tipo enlace de hidrógeno (**Figura 3-16**) con el grupo OH en C17 de la testosterona y la Tyr242. A diferencia de lo encontrado en los estudios de mutagénesis para el acoplamiento entre la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana y la testosterona, en el modelo ITA3BUR no se observó la interacción de la testosterona con el aminoácido Gly34 (Wigley, et al., 1994) ni con aminoácidos cerca a éste en el sitio catalítico. Cabe mencionar que en el modelo ITA3BUR la región donde se encuentra la Gly34 (aminoácidos 15 al 35) está muy distante de la secuencia de histidinas (aminoácidos 230 a 232) (**Figura 3-17**) importantes como se mencionó (Wigley, et al., 1994) para la unión del sustrato a la enzima, por lo tanto no se aprecia dicha interacción. De manera adicional, el hecho de que el modelo ITA3BUR cuente con la secuencia conservada de histidinas (aminoácidos 230 a 232) refuerza la validez del modelo y confirma que se trata de una aproximación acertada a la estructura 3D de la 5 α R-II.



LEU = leucina; TYR = trirosina; HIS= histidina; ALA= alanina; PHE= fenilalanina

Figura 3-16. Determinación de las interacciones moleculares entre testosterona y aminoácidos del sitio catalítico del modelo tridimensional ITA3BUR de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana.

-  **Azul:** región de los aminoácidos 15 a 35
-  **Rojo:** región de los aminoácidos 230 a 232

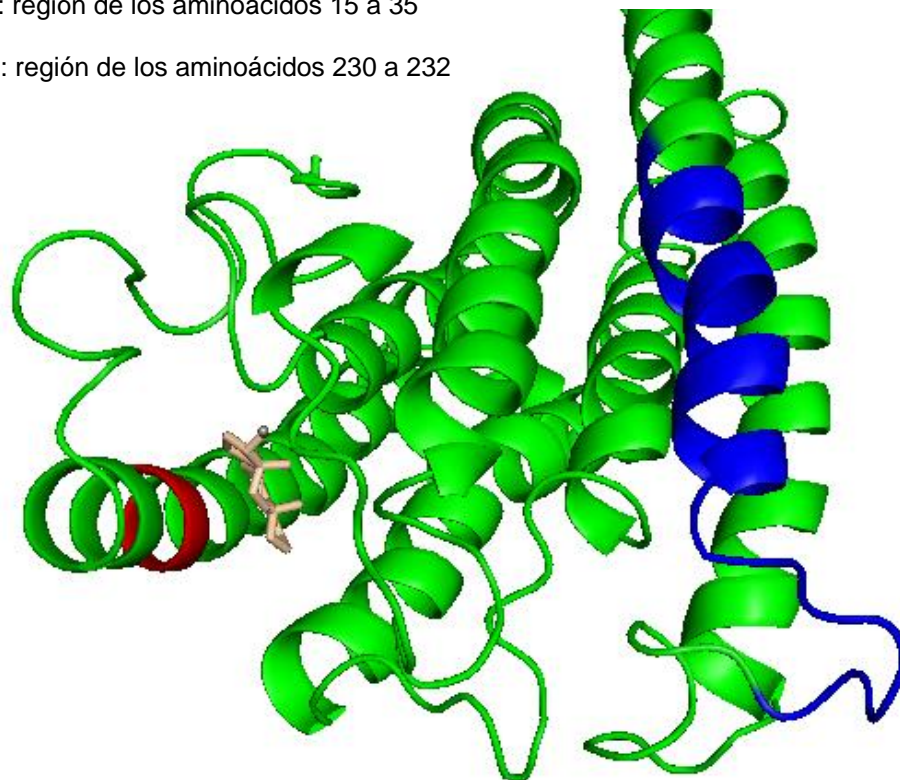
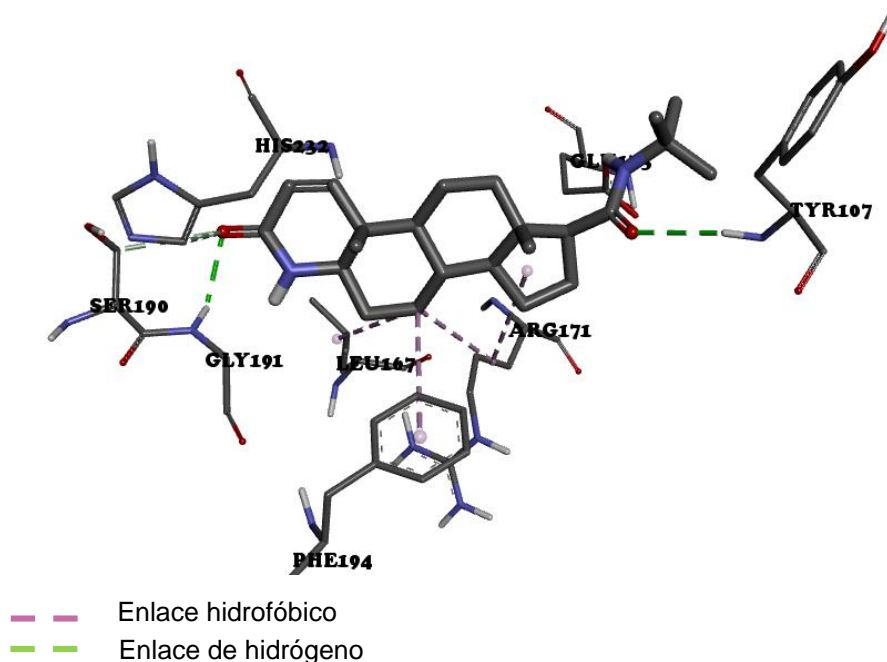


Figura 3-17. Representación en el modelo ITA3BUR de las regiones que según los estudios de mutagénesis son importantes para la unión de los sustratos a la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana.

Con relación al acoplamiento entre el modelo 3D para la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana ITA3BUR y la finasterida se determinó la presencia de interacciones de enlace de hidrógeno entre los aminoácidos His232, Gly191 y Ser190 y el grupo ceto de la finasterida (**Figura 3-18**), además de un enlace de hidrógeno entre la amida de la finasterida con el aminoácido Glu175 e interacciones hidrofóbicas entre el metilo C18 de la finasterida con Arg171 y Leu167. Este mismo metilo (C18) de la finasterida presenta interacción hidrofóbica con el anillo aromático de Phe194 (**Figura 3-18**). Cabe mencionar que este modelo conserva la cercanía de los aminoácidos histidina y se forma un enlace de hidrógeno entre el grupo ceto de la finasterida y la His232, deduciéndose que los inhibidores también poseen interacciones con la región de histidinas (aminoácidos 230 a 232) importantes para la unión del sustrato a la enzima. Sin embargo cabe mencionar que tampoco se observa unión entre los primeros aminoácidos (15 a 35) de la cadena proteica del modelo 3D como en el caso de la testosterona.



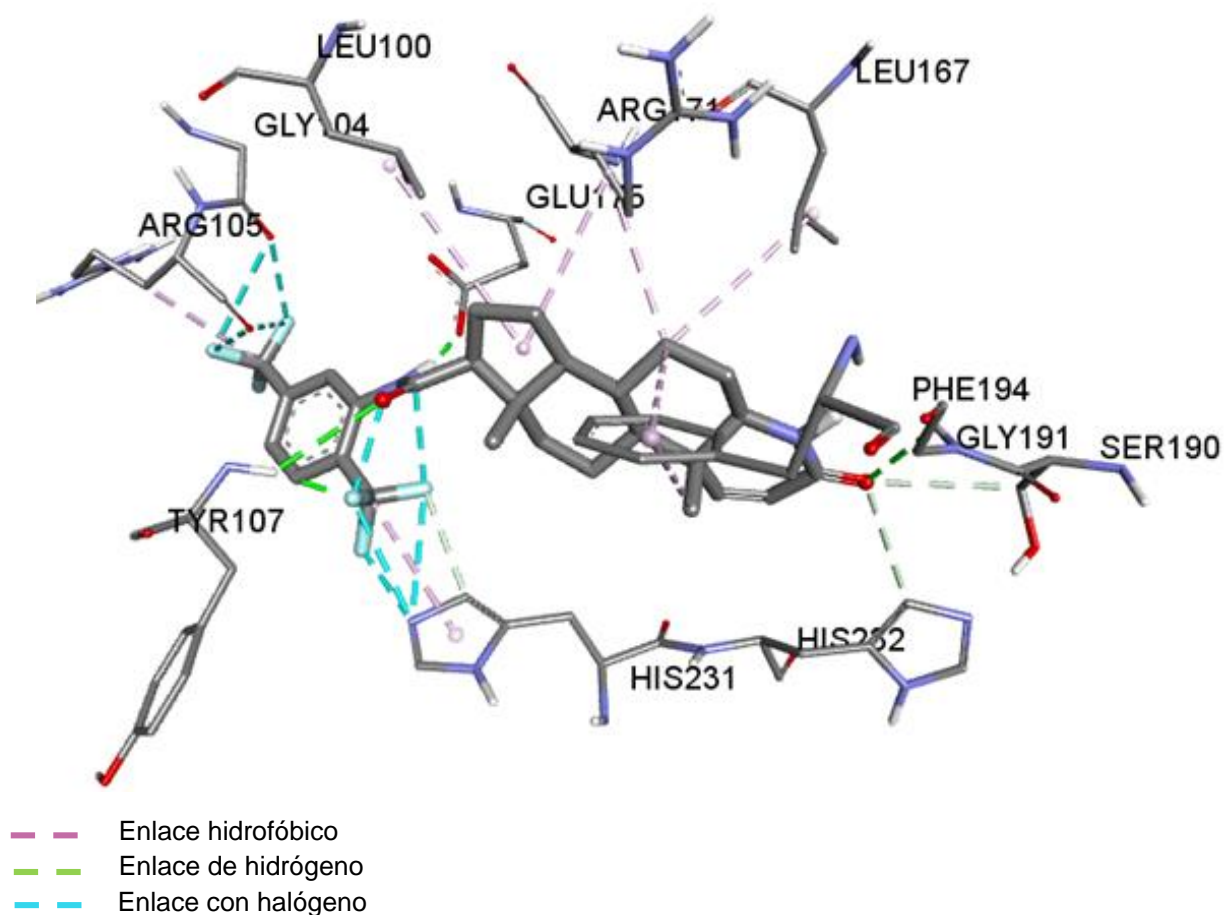
LEU = leucina; TYR = trirosina; HIS= histidina; ALA= alanina; PHE= fenilalanina; SER=serina

Figura 3-18. Determinación de las interacciones moleculares entre finasterida y aminoácidos del sitio catalítico del modelo tridimensional ITA3BUR de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana.

Para el acoplamiento molecular del modelo ITA3BUR con dutasterida (**Figura 3-19**) se observan interacciones hidrofóbicas entre la His232 y el trifluorometilo de la dutasterida; también se observan interacciones entre el trifluoro metilo de la dutasterida y el nitrógeno del imidazol de esta misma histidina. Por su parte, la His231 presenta interacción por enlace de hidrógeno con el grupo ceto de la dutasterida. Adicionalmente, el grupo trifluoro metilo que se encuentra en el grupo del C17 (2,5-Bis(trifluorometil)fenil) de la dutasterida muestra una interacción entre el flúor con la Gly104 y la Arg105.

Por otro lado, el grupo ácido carboxílico del ácido glutámico de la Glu175 forma un enlace de hidrógeno con el N-H de la amida de la dutasterida. También se presenta una interacción por enlace de hidrógeno entre Gly191 y el grupo ceto en C3 del anillo esteroidal. Cabe mencionar que el acoplamiento del modelo ITA3BUR con la dutasterida no se observó interacción con el aminoácido Gly34 ni con aminoácidos cerca a éste

(Figura 3-19), pero en el estudio de acoplamiento del modelo ITA3BUR con los inhibidores se observan mayores interacciones tanto hidrofóbicas como por enlace de hidrógeno que las observadas para la testosterona. Lo anterior permite explicar el por qué la dutasterida al ser un inhibidor reversible, tiene un proceso de disociación más lento de la enzima en relación a la testosterona mostrando una vida media de 3 a 5 semanas (De La Concepción, 1999).



LEU = leucina; TYR = trirosina; HIS= histidina; ARG= arginina; PHE= fenilalanina;
SER= serina

Figura 3-19. Determinación de las interacciones moleculares entre dutasterida y aminoácidos del sitio catalítico del modelo tridimensional ITA3BUR de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana.

Comparando el acoplamiento molecular de la testosterona, finasterida y dutasterida, se identificaron las interacciones con los aminoácidos Leu167, Phe194 y His232 como comunes para su interacción con la enzima. De manera adicional la finasterida y dutasterida poseen otras interacciones en común con los aminoácidos Arg171 y Ser190 las cuales son de tipo hidrofóbico y con los aminoácidos Pro106, Glu175, Gly191 tipo puente de hidrógeno, por lo tanto, los inhibidores se unen de manera diferente a la testosterona en el sitio catalítico lo cual podría explicar su efecto inhibitorio y la preferencia de la enzima a unirse a estas sustancias.

Con base en estos resultados se puede inferir que para las tres moléculas acopladas al modelo tridimensional de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana ITA3BUR, correspondientes tanto al sustrato endógeno testosterona como a sus inhibidores finasterida y dutasterida, se observaron interacciones hidrofóbicas entre los aminoácidos leucina 167, fenilalanina 194 e histidina 232 esta última la cual en estudios de mutagénesis mostro ser indispensable para la unión al sitio catalítico de la enzima. También se pudo identificar que en esta región de acoplamiento tanto la testosterona como los inhibidores presentan interacciones hidrofóbicas y por enlaces de hidrógeno. Cabe mencionar que en el presente trabajo de investigación ninguna de las tres moléculas mencionadas presentó interacción con la región correspondiente a los aminoácidos 15 al 34 de la cadena peptídica de la enzima, como lo reportan los estudios de mutagénesis previamente citados en la literatura (Makridakis, et al., 2000; Wigley, et al., 1994). Se piensa que esto básicamente puede suceder porque dicha región se encuentra muy distante a la región catalítica determinada en los modelos 3D construidos en el presente estudio. El hecho de que el sitio catalítico en el modelo tridimensional de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana ITA3BUR coincida con el determinado experimentalmente mediante los estudios de mutagénesis permite corroborar que el modelo construido en la presente investigación (ITA3BUR) constituye una aproximación teórica válida a la estructura tridimensional experimental de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana, convirtiéndolo en una alternativa de diana biológica para futuros estudios de acoplamiento molecular y de *screening* virtual con la finalidad de encontrar compuestos bioactivos para tratar enfermedades relacionadas con esta enzima, entre ellas la hiperplasia prostática benigna, el acné androgénico y la calvicie androgénica entre otras.

4. Conclusiones

Se construyeron doce modelos de la estructura tridimensional de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana mediante diversas herramientas computacionales empleando diversas plantillas proteicas y estrategias de modelado por homología y plegamiento (*threading*). De éstos, el modelo ITA3BUR construido mediante modelamiento por plegamiento en la plataforma computacional I-TASSER empleando como plantilla proteica a la enzima 5 β -reductasa (3BUR) de origen humano resultó un modelo válido que constituye una aproximación teórica a la estructura tridimensional experimental de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana.

Mediante acoplamiento molecular entre los diferentes modelos obtenidos con su sustrato endógeno testosterona e inhibidores finasterida y dutasterida se determinó que el modelo ITA3BUR presentó la unión energéticamente más favorable por dichas moléculas, adicionando elementos para constituir a este modelo en una aproximación teórica válida a la estructura tridimensional experimental de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana.

Mediante acoplamiento molecular entre los doce modelos obtenidos con la testosterona e inhibidores finasterida y dutasterida se pudo identificar que el sitio catalítico del modelo se encuentra en la región comprendida cerca de los aminoácidos 230 a 232 de la estructura proteica. Lo anterior concuerda con el sitio catalítico previamente establecido por mutagénesis de la enzima, confirmando a esta región como importante para la actividad catalítica. Cabe mencionar que con el presente estudio no se puede confirmar que la región de los aminoácidos 15 al 35, como también ha sido indicado por estudios de mutagénesis, sea importante en el sitio activo de la enzima dado que en los modelos obtenidos no se presenta interacción en esta región con el sustrato e inhibidores.

El modelo ITA3BUR constituye una alternativa viable de diana biológica en 3D para futuros estudios de acoplamiento molecular y de screening virtual que permitan llevar a cabo el diseño *in silico* de fármacos para tratar enfermedades donde esté involucrada la enzima 5 α -reductasa tipo 2 humana.

5. Perspectivas

Llevar a cabo estudios de *screening* virtual sobre el modelo ITA3BUR a fin de encontrar agentes terapéuticos novedosos para enfermedades donde esté involucrada esta diana biológica.

Realizar estudios de acoplamiento molecular entre el modelo ITA3BUR y el cofactor NADPH a fin de establecer su sitio de unión y el papel de este cofactor durante el proceso enzimático.

Estudiar la interacción en el sitio catalítico del modelo ITA3BUR con otras moléculas estudiadas como inhibidores de la 5 α -reductasa tipo 2 humana a fin de profundizar en los tipos de interacciones dentro del sitio catalítico.

6. Producción científica

- ✓ **Modelo de la estructura tridimensional de la enzima 5 α -reductasa tipo ii humana por el método threading.**

Camacho-Casas N.^{1*}, Valencia-Islas N.¹, López-Vallejo F.²

¹Departamento de Farmacia, ²Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, Bogotá, Colombia.

ndcamachoc@unal.edu.co

Trabajo presentado en forma de póster en **VI CONGRESO IBEROAMERICANO DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS: COIFFA 2015**



7. Referencias bibliográficas

- Abbaszadegan, M. R., Moghaddasian, M., Tavirani, M. R., Raeisossadati, R., Ebrahimi, M., Roozafzoon, R., et al. (2013). Structural Biology: Modeling applications and techniques at a glance. [Review Article]. *Journal of paramedical sciences*, 4(ISSN 2008-4978), 139-151.
- Aggarwal, S., Thareja, S., Bhardwaj, T. R., & Kumar, M. (2010a). 3D-QSAR studies on unsaturated 4-azasteroids as human 5alpha-reductase inhibitors: a self organizing molecular field analysis approach. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45(2), 476-481.
- Aggarwal, S., Thareja, S., Bhardwaj, T. R., & Kumar, M. (2010b). Self-organizing molecular field analysis on pregnane derivatives as human steroidal 5alpha-reductase inhibitors. *Steroids*, 75(6), 411-418.
- Aggarwal, S., Thareja, S., Verma, A., Bhardwaj, T. R., & Kumar, M. (2010). An overview on 5alpha-reductase inhibitors. *Steroids*, 75(2), 109-153.
- Alschibaja, M., May, F., Treiber, U., Paul, R., & Hartung, R. (2005). Transurethrale Resektion bei benigner Prostatahyperplasie. *Der Urologe*, 44(5), 499-504.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., et al. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25(17), 3389-3402.
- Amaral, T. M. S., Macedo, D., Fernandes, I., & Costa, L. (2011). Castration-Resistant Prostate Cancer: Mechanisms, Targets, and Treatment. *Prostate Cancer*, 2012, 11.
- Anderson, A. C. (2003). The Process of Structure-Based Drug Design. *Chemistry & Biology*, 10(9), 787-797.
- Andersson, S., Berman, D. M., Jenkins, E. P., & Russell, D. W. (1991). Deletion of steroid 5 alpha-reductase 2 gene in male pseudohermaphroditism. *Nature*, 354(6349), 159-161.
- Andriole, G. L., Bostwick, D. G., Brawley, O. W., Gomella, L. G., Marberger, M., Montorsi, F., et al. (2010). Effect of Dutasteride on the Risk of Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine*, 362(13), 1192-1202.
- Anfinsen, C. B. (1959). *The molecular basis of evolution*. New York: John Wiley and Sons.
- Arlandis, S., García, M. J., González, D., & Rebollo, P. (2009). Prevalencia de síntomas del tracto urinario inferior en pacientes con síndrome de vejiga hiperactiva: Manejo del paciente en la práctica clínica habitual. *Actas Urológicas Españolas*, 33, 902-908.
- Badenas, F. G. (1993). *Métodos computacionales de modelado molecular y diseño de fármacos*. Madrid: Universidad de Alcalá de Henares.
- Baker, D., & Sali, A. (2001). Protein Structure Prediction and Structural Genomics. *Science*, 294(5540), 93-96.
- Baxter, F. O., Trivic, S., & Lee, I. R. (2001). Structure-function studies of human 5-alpha reductase type 2 using site directed mutagenesis. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 77(2-3), 167-175.
- Bella, A. (2002). Resección transuretral de próstata. *Enfuro*, 84(ISSN 0210-9476), 5
- Benkert, P., Biasini, M., & Schwede, T. (2011). Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics*, 27(3), 343-350.
- Benkert, P., Künzli, M., & Schwede, T. (2009). QMEAN server for protein model quality estimation. *Nucleic Acids Research*, 37(suppl 2), 510-514.

- Benkert, P., Tosatto, S. C. E., & Schomburg, D. (2008). QMEAN: A comprehensive scoring function for model quality assessment. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 71(1), 261-277.
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., et al. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 235-242.
- Bhattacharyya, A. K., Chavan, A. J., Haley, B. E., Taylor, M. F., & Collins, D. C. (1995). Identification of the NADP(H) binding site of rat liver microsomal 5.alpha.-Reductase (Isoenzyme-1): Purification of a photolabeled peptide corresponding to the adenine binding domain. *Biochemistry*, 34(11), 3663-3669.
- Biovia, D. S. (2014). *Discovery Studio* (Version 4.0). San Diego.
- Bohacek, R. S., & McMartin, C. (1994). Multiple highly diverse structures complementary to enzyme binding sites: results of extensive application of a de novo design method incorporating combinatorial growth. *Journal of the American Chemical Society*, 116(13), 5560-5571.
- Bohm, H. J. (1992). The computer program LUDI: a new method for the de novo design of enzyme inhibitors. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 6(1), 61-78.
- Bort, J. M., Herrero, J. M., Rodríguez, F., Lorenzo, R., & Munar, J. (2001). *Química teórica y computacional* (Vol. 1): Universitat Jaume I.
- Bratoeff, E., Cabeza, M., Pérez-Ornelas, V., Recillas, S., & Heuze, I. (2008). In vivo and in vitro effect of novel 4,16-pregnadiene-6,20-dione derivatives, as 5 α -reductase inhibitors. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 111(3-5), 275-281.
- Bratoeff, E., Flores, G., Ramirez, E., & Valencia, N. (1997). The pharmacology of the antiandrogens. *Chemistry Today*, 15(8).
- Buchan, D. W., Minnici, F., Nugent, T. C., Bryson, K., & Jones, D. T. (2013). Scalable web services for the PSIPRED Protein Analysis Workbench. *Nucleic Acids Research*, 41(Web Server issue), W349-357.
- Cataño, J. G., & Morales, C. E. (2009). Evaluación de la calidad de vida asociada a la salud en los pacientes sometidos a prostatectomía radical abierta por carcinoma de próstata clínicamente localizado. *Revista Urología Colombiana*, XVIII, 17
- ChemAxon. (2013). MarvinSketch (Version 6.1.3).
- Chothia, C. (1992). Proteins. One thousand families for the molecular biologist. *Nature*, 357(6379), 543-544.
- Chothia, C., & Lesk, A. M. (1986). The relation between the divergence of sequence and structure in proteins. *Embo journal*, 5(4), 823-826.
- Chung, D. E., & Kaplan, S. A. (2010). Papel actual de la terapia combinada en los Síntomas del Tracto Urinario Inferior (STUI) masculino. *Archivos Españoles de Urología (Ed. impresa)*, 63, 323-332.
- Chung, S., & Subbiah, S. (1996). A structural explanation for the twilight zone of protein sequence homology. *Structure*, 4(10), 1123-1127.
- Cole, C., Barber, J. D., & Barton, G. J. (2008). The Jpred 3 secondary structure prediction server. *Nucleic Acids Research*, 36(suppl 2), 197-201.
- Consejo_de_Salubridad_General. (2009). Diagnóstico y Tratamiento de la Hiperplasia Prostatica Benigna. In C. d. S. general (Eds.), *Guías de Práctica Clínica* Available from http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/176_GPC_HIP_ERPLASIA_PROSTATICA/Grr_hipertrofia_prostatica.pdf
- Cooper, J. (1995). Ramachandran Plot. 2015, from http://www.cryst.bbk.ac.uk/PPS95/course/3_geometry/rama.html#top
- Cristobal, S., Zemla, A., Fischer, D., Rychlewski, L., & Elofsson, A. (2001). A study of quality measures for protein threading models. *BMC Bioinformatics*, 2, 5-5.

- De La Concepción, O. M. (1999, 1999-02-11). Dutasteride (Avodart). from <http://www.sld.cu/sitios/urologia/temas.php?idv=10725>
- Deters, L. A., & Raymond, J. L. (2014). Benign Prostatic Hypertrophy. from <http://emedicine.medscape.com/article/437359-overview#a0104>
- Di Costanzo, L., Drury, J. E., Christianson, D. W., & Penning, T. M. (2009). Structure and catalytic mechanism of human steroid 5beta-reductase (AKR1D1) *Molecular and Cellular Endocrinology* (Vol. 301, pp. 191-198). Ireland.
- Di Costanzo, L., Drury, J. E., Penning, T. M., & Christianson, D. W. (2008). Crystal structure of human liver Delta4-3-ketosteroid 5beta-reductase (AKR1D1) and implications for substrate binding and catalysis *The Journal of Biological Chemistry* (Vol. 283, pp. 16830-16839). United States.
- Dorn, M., Silva, M. B., Buriol, L. S., & Lamb, L. C. (2014). Three-dimensional protein structure prediction: Methods and computational strategies. *Computational Biology and Chemistry*, 53, Part B(0), 251-276.
- Ekins, S., & Obach, R. S. (2000). Three-dimensional quantitative structure activity relationship computational approaches for prediction of human in vitro intrinsic clearance. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 295(2), 463-473.
- Escalona, J. C., Carrasco, R., & Padrón, J. A. (2005). Introducción al diseño de Fármacos. Retrieved from <http://www.fq.uh.cu/investig/lqct/imagenes2/disenio.pdf>
- Eswar, N., Webb, B., Marti-Renom, M. A., Madhusudhan, M. S., Eramian, D., Shen, M. Y., et al. (2006). Comparative protein structure modeling using Modeller. *Current Protocols Bioinformatics*, Chapter 5, Unit 5 6.
- Ewing, T. A., Makino, S., Skillman, A. G., & Kuntz, I. (2001). DOCK 4.0: Search strategies for automated molecular docking of flexible molecule databases. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 15(5), 411-428.
- Faragalla, J., Bremner, J., Brown, D., Griffith, R., & Heaton, A. (2003). Comparative pharmacophore development for inhibitors of human and rat 5- α -reductase. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 22(1), 83-92.
- Fine, S. R., & Ginsberg, P. (2008). Alpha-Adrenergic Receptor Antagonists in Older Patients With Benign Prostatic Hyperplasia: Issues and Potential Complications. *The Journal of the American Osteopathic Association*, 108(7), 333-337.
- Fiser, A., & Šali, A. (2003). Modeller: Generation and refinement of homology-based protein structure models *Methods in Enzymology* (Vol. Volume 374, pp. 461-491): Academic Press.
- Fitzpatrick, J. M., & Artibani, W. (2006). Therapeutic Strategies for Managing BPH Progression. *European Urology Supplements*, 5(20), 997-1003.
- Fuchs, A., & Frishman, D. (2010). Structural comparison and classification of alpha-helical transmembrane domains based on helix interaction patterns. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 78(12), 2587-2599.
- Fujino, A., Ose, T., Yao, M., Tokiwano, T., Honma, M., Watanabe, N., et al. (2004). Structural and enzymatic properties of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase homologue from *Pyrococcus horikoshii* *Journal of Molecular Biology* (Vol. 341, pp. 999-1013). England: 2004 Elsevier Ltd.
- González, E. C., Roza, M. L. E., Castro, M. J. C., & Reyes, C. J. A. (2007). Estudio de Farmacovigilancia en pacientes con Hiperplasia Prostática Benigna (HPB) sintomática tratados con Tamsulosina 0.4 mg en 8 ciudades de Colombia. *Sistema de Información Científica Redalyc*, XVI, 107-117. Retrieved from <http://www.redalyc.org/pdf/1491/149120468014.pdf>

- Goodford, P. J. (1985). A computational procedure for determining energetically favorable binding sites on biologically important macromolecules. *Journal of Medicinal Chemistry*, 28(7), 849-857.
- Gómez, P., Valero, F., Guzmán, C., & Cagua, E. (2000). Guía de práctica clínica hiperplasia prostática benigna diagnóstico y tratamiento (pp. 35). Colombia: Sociedad colombiana de urología.
- Haafiring, A. (2015). Localizacion de la prostata. National center institute.
- Haendler, B., & Cleve, A. (2012). Recent developments in antiandrogens and selective androgen receptor modulators. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 352(1–2), 79-91.
- Halgren, T. (2007). New method for fast and accurate binding-site identification and analysis *Chem Biol Drug Des* (Vol. 69, pp. 146-148). England.
- Hanwell, M., Curtis, D., Lonie, D., Vandermeersch, T., Zurek, E., & Hutchison, G. (2012). Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *Journal of Cheminformatics*, 4(1), 1-17.
- Harris, W. P., Mostaghel, E. A., Nelson, P. S., & Montgomery, B. (2009). Androgen deprivation therapy: progress in understanding mechanisms of resistance and optimizing androgen depletion. *Nature clinical practice. Urology*, 6(2), 76-85.
- Harvard experts discuss surgical options for benign prostatic hyperplasia - Harvard Prostate Knowledge. (2007). from <http://www.harvardprostateknowledge.org/harvard-experts-discuss-surgical-options-for-benign-prostatic-hyperplasia>
- Heinlein, C. A., & Chang, C. (2002). Androgen receptor (AR) coregulators: an overview. *Endocrine Reviews*, 23(2), 175-200.
- Hellstrom, W. J. G., & Sikka, S. C. (2006). Effects of Acute Treatment With Tamsulosin Versus Alfuzosin on Ejaculatory Function in Normal Volunteers. *The Journal of Urology*, 176(4), 1529-1533.
- Hetényi, C., & Van der Spoel, D. (2002). Efficient docking of peptides to proteins without prior knowledge of the binding site. *Protein Science*, 11(7), 1729-1737.
- Imperato-McGinley, J., & Zhu, Y. S. (2002). Androgens and male physiology the syndrome of 5alpha-reductase-2 deficiency *Molecular and Cellular Endocrinology* (Vol. 198, pp. 51-59). Ireland: Elsevier Science Ireland Ltd.
- Jin, Y., & Penning, T. M. (2001). Steroid 5α-reductases and 3α-hydroxysteroid dehydrogenases: key enzymes in androgen metabolism. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 15(1), 79-94.
- Jones, P. (1999). Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *Journal of Molecular Biology*, 292(2), 195-202.
- Jones, P., Binns, D., Chang, H.-Y., Fraser, M., Li, W., McAnulla, C., et al. (2014). InterProScan 5: genome-scale protein function classification. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 30(9), 1236-1240.
- Jones, P., Taylor, W. R., & Thornton, J. M. (1994). A model recognition approach to the prediction of all-helical membrane protein structure and topology. *Biochemistry*, 33(10), 3038-3049.
- Jorgensen, W. L. (2004). The Many Roles of Computation in Drug Discovery. *Science*, 303(5665), 1813-1818.
- Kalyanamoorthy, S., & Chen, Y.-P. P. (2013). Modelling and enhanced molecular dynamics to steer structure-based drug discovery. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 114(3), 123-136.
- Kang, D., Andriole, G., Van De Vooren, R., Crawford, D., Chia, D., Urban, D., et al. (2004). Risk behaviours and benign prostatic hyperplasia. *BJU International*, 93(9), 1241-1245.

- Kang, H. J., Imperato-McGinley, Zhu, & Rosenwaks. (2013). The effect of 5 α -reductase-2 deficiency on human fertility. *Fertility and Sterility*, 101(2), 310-316.
- Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N., & Sternberg, M. J. E. (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. [Protocol]. *Nat. Protocols*, 10(6), 845-858.
- Kelley, L. A., & Sternberg, M. J. E. (2009). Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. [10.1038/nprot.2009.2]. *Nat. Protocols*, 4(3), 363-371.
- Koliński, A., & Bujnicki, J. M. (2005). Generalized protein structure prediction based on combination of fold-recognition with de novo folding and evaluation of models. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 61(S7), 84-90.
- Kontoyianni, M., McClellan, L. M., & Sokol, G. S. (2003). Evaluation of docking performance: comparative data on docking algorithms. *Journal of Medicinal Chemistry*, 47(3), 558-565.
- Kramer, B., Rarey, M., & Lengauer, T. (1999). Evaluation of the FLEXX incremental construction algorithm for protein–ligand docking. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 37(2), 228-241.
- Krieger, E., Nabuurs, S. B., & Vriend, G. (2003). Homology Modeling *Structural Bioinformatics* (pp. 509-523): John Wiley & Sons, Inc.
- Kurup, A., Garg, R., & Hansch, C. (2000). Comparative QSAR Analysis of 5 α -Reductase Inhibitors. *Chemical Reviews*, 100(3), 909-924.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., et al. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23(21), 2947-2948.
- Leach, A. R. (2001). *Molecular Modelling: Principles and Applications* (Vol. 1). Singapore: Prentice Hall.
- Leme de Calais, F. L., Soardi, F. C., Petrolí, R. J., Lusa, A. L., de Paiva, E. S. R. B., Maciel-Guerra, A. T., et al. (2011). Molecular diagnosis of 5 α -reductase type II deficiency in Brazilian siblings with 46,XY disorder of sex development *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 12, pp. 9471-9480). Switzerland.
- Li, X., Roberti, R., & Blobel, G. (2015). Structure of an integral membrane sterol reductase from *Methylomicrobium alcaliphilum* *Nature* (Vol. 517, pp. 104-107). England.
- Lin, H.-N., Chang, J.-M., Wu, K.-P., Sung, T.-Y., & Hsu, W.-L. (2005). HYPROSP II-A knowledge-based hybrid method for protein secondary structure prediction based on local prediction confidence. *Bioinformatics*, 21(15), 3227-3233.
- Liu, M., & Wang, S. (1999). MCDOCK: A Monte Carlo simulation approach to the molecular docking problem. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 13(5), 435-451.
- Lozano-Aponte, J., & Scior, T. (2012). ¿Qué sabe Ud. acerca de QSAR? *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, 43, 3
- Luz, J. G., Hassig, C. A., Pickle, C., Godzik, A., Meyer, B. J., & Wilson, I. A. (2003). XOL-1, primary determinant of sexual fate in *C. elegans*, is a GHMP kinase family member and a structural prototype for a class of developmental regulators. 17(8), 977-990. doi:10.1101/gad.1082303
- Makridakis, N. M., di Salle, E., & Reichardt, J. K. (2000). Biochemical and pharmacogenetic dissection of human steroid 5 α -reductase type II. *Pharmacogenetics*, 10(5), 407-413.
- Manzarbeitia, F., Vela-Navarrete, R., & Fernández-Aceñero, M. J. (2010). Aspectos histopatológicos iniciales de la hiperplasia benigna de próstata: nódulos mixo-inflamatorios. *Actas Urológicas Españolas*, 34, 549-554.
- Marassi, F. M., & Opella, S. J. (1998). NMR structural studies of membrane proteins. *Current Opinion in Structural Biology*, 8(5), 640-648.

- Marchler-Bauer, A., Lu, S., Anderson, J. B., Chitsaz, F., Derbyshire, M. K., DeWeese-Scott, C., et al. (2011). CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. *Nucleic Acids Research*, 39(suppl 1), D225-D229.
- McConnell, J. D., Barry, M. J., & Bruskewitz, R. C. (1994). Benign prostatic hyperplasia: diagnosis and treatment. Agency for Health Care Policy and Research. *Clinical Practice Guidelines*(8), 1-17.
- McVary, K., & Roehrborn, C. (2010). Management of Benign Prostatic Hyperplasia (BPH). *American Urological Association Guideline*. Retrieved from <http://www.auanet.org/common/pdf/education/clinical-guidance/Benign-Prostatic-Hyperplasia.pdf>
- McVary, K., Roehrborn, C. G., Avins Andrew, L., Barry Michael, J., Bruskewitz, R. C., Donnell, R. F., et al. (2011). *Update on AUA Guideline on the Management of Benign Prostatic Hyperplasia* (Vol. 185).
- Medina, J. L., López, F., & Castillo, R. (2006). Diseño de fármacos asistido por computadora. *Educación Química*, 452-457
- Medina-Franco, J. L., Fernández-de Gortari, E., & Naveja, J. J. (2015). Avances en el diseño de fármacos asistido por computadora. *Educación Química*, 26(3), 180-186.
- Meng, X.-Y., Zhang, H.-X., Mezei, M., & Cui, M. (2011). Molecular Docking: A powerful approach for structure-based drug discovery. *Current computer-aided drug design*, 7(2), 146-157.
- Miller, S. (2014). Enlarged prostate: MedlinePlus Medical Encyclopedia. from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>
- Miranker, A., & Karplus, M. (1995). An automated method for dynamic ligand design. *Proteins*, 23(4), 472-490.
- Morris, G. M., Goodsell, D. S., Halliday, R. S., Huey, R., Hart, W. E., Belew, R. K., et al. (1998). Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *Journal of Computational Chemistry*, 19(14), 1639-1662.
- Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., et al. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, 30(16), 2785-2791.
- Morris, G. M., & Lim-Wilby, M. (2008). Molecular Docking. In A. Kukol (Ed.), *Molecular Modeling of Proteins* (Vol. 443, pp. 365-382): Humana Press.
- Morris, L. A., MacArthur, M. W., Hutchinson, E. G., & Thornton, J. M. (1992). Stereochemical quality of protein structure coordinates. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 12(4), 345-364.
- Nadendla, R. (2004). Molecular modeling: A powerful tool for drug design and molecular docking. *Resonance*, 9(5), 51-60.
- National Center for Biotechnology Information. (2004, May 21, 2004.). from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/About/glance/ourmission.html>
- Nickel, J. C. (2004). Comparison of Clinical Trials With Finasteride and Dutasteride. *Reviews in Urology*, 6(Suppl 9), S31-S39.
- Nickel, J. C., Gilling, P., Tammela, T. L., Morrill, B., Wilson, T. H., & Rittmaster, R. S. (2011). Comparison of dutasteride and finasteride for treating benign prostatic hyperplasia: the Enlarged Prostate International Comparator Study (EPICS). *BJU International*, 108(3), 388-394.
- Nugent, T., & Jones, D. T. (2009). Transmembrane protein topology prediction using support vector machines *BMC Bioinformatics* (Vol. 10, pp. 159). England.
- Oprea, T. I., & Tropsha, A. (2006). Target, chemical and bioactivity databases – integration is key. *Drug Discovery Today: Technologies*, 3(4), 357-365.

- Panel, B. P. H. G. (1994). Benign Prostatic Hyperplasia: Diagnosis and Treatment. *Journal of the American Academy of Nurse Practitioners*, 6(4), 167-174.
- Paul, S. M., Mytelka, D. S., Dunwiddie, C. T., Persinger, C. C., Munos, B. H., Lindborg, S. R., et al. (2010). How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge. [10.1038/nrd3078]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 9(3), 203-214.
- Pitman, M. R., & Menz, R. I. (2006). Methods for protein homology modelling *Applied Mycology and Biotechnology* (Vol. Volume 6, pp. 37-59): Elsevier.
- Poirier, D. (2008). New cancer drugs targeting the biosynthesis of estrogens and androgens. *Drug Development Research*, 69(6), 304-318.
- Puzyn, T., Leszczynski, J., & Cronin, M. T. (2010). *Recent Advances in QSAR Studies: Methods and Applications*: Springer Netherlands.
- Pérez, Y., Molina, V., Oyarzábal, A., & Mas-Ferreiro, R. (2011). Tratamiento farmacológico en la hiperplasia prostática benigna. *Revista Cubana de Farmacia*, 45, 109-126.
- Pérez-Ornelas, V., Cabeza, M., Bratoeff, E., Heuze, I., Sánchez, M., Ramírez, E., et al. (2005). New 5 α -reductase inhibitors: In vitro and in vivo effects. *Steroids*, 70(3), 217-224.
- Rangwala, H. (2010). A Survey of Remote Homology Detection and Fold Recognition Methods *Introduction to Protein Structure Prediction* (pp. 165-194): John Wiley & Sons, Inc.
- Rittmaster, R. S. (2008). 5 α -reductase inhibitors in benign prostatic hyperplasia and prostate cancer risk reduction. *Best Practice & Research: Clinical Endocrinology & Metabolism*, 22(2), 389-402.
- Robertson, S. (2010, Oct 8, 2014). ¿Cuál es Finasteride? , from [http://www.news-medical.net/health/What-is-Finasteride-\(Spanish\).aspx](http://www.news-medical.net/health/What-is-Finasteride-(Spanish).aspx)
- Rodríguez-Sotres, Samantha, Gaytán-Mondragón, Hernández-Domínguez, & Valencia. (2011). Estructuras tridimensionales in silico, a partir de la secuencia de aminoácidos de una proteína ¿Cómo saber que el modelo es realista? *Mensaje Bioquímico*, 35, 143-156.
- Rohl, C. A., & Baker, D. (2002). De Novo Determination of Protein Backbone Structure from Residual Dipolar Couplings Using Rosetta. *Journal of the American Chemical Society*, 124(11), 2723-2729.
- Rotstein, S., & Murcko, M. (1993). GenStar: A method for de novo drug design. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 7(1), 23-43.
- Roy, A., Kucukural, A., & Zhang, Y. (2010). I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. [10.1038/nprot.2010.5]. *Nature Protocols*, 5(4), 725-738.
- Russell, D. W., & Wilson, J. D. (1994). Steroid 5 alpha-reductase: two genes/two enzymes. *Annual Review of Biochemistry*, 63, 25-61.
- Salvador, J. A. R., Pinto, R. M. A., & Silvestre, S. M. (2013). Steroidal 5 α -reductase and 17 α -hydroxylase/17,20-lyase (CYP17) inhibitors useful in the treatment of prostatic diseases. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 137(0), 199-222.
- Santos, F., Andrade, O., & Alencastro, R. (2003). Modelagem de proteínas por homologia. *Química Nova*, 26, 253-259.
- Sarma, A. V., & Wei, J. T. (2012). Benign Prostatic Hyperplasia and Lower Urinary Tract Symptoms. *New England Journal of Medicine*, 367(3), 248-257.
- Schmidt, L. J., & Tindall, D. J. (2011). Steroid 5 α -reductase inhibitors targeting BPH and prostate cancer. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 125(1-2), 32-38.

- Schnecke, V., Swanson, C. A., Getzoff, E. D., Tainer, J. A., & Kuhn, L. A. (1998). Screening a peptidyl database for potential ligands to proteins with side-chain flexibility. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 33(1), 74-87.
- Schrodinger. (2011a). Maestro (Version 3.1). New York.
- Schrodinger. (2011b). Prime (Version 3.0). New York.
- Schrodinger. (2011c). Protein preparation wizard. New York.
- Schrodinger. (2011d). SiteMap (Version 2.5). New York.
- Schrödinger, L. (2013). The PyMOL (Version 1.7.4).
- Seetharaman, J., & Swaminathan, S. (2005). Crystal Structure of a Putative Malic Enzyme ((s)- Malate:nad⁺ Oxidoreductase (Decarboxylating)).
- Seftel, A. D., Rosen, R. C., Rosenberg, M. T., & Sadovsky, R. (2008). Benign prostatic hyperplasia evaluation, treatment and association with sexual dysfunction: practice patterns according to physician specialty. *International Journal of Clinical Practice*, 62(4), 614-622.
- Selvaraj, S. (2014). Approaches to Protein Structure Prediction and Their Applications. from <http://www.bicpu.edu.in/seminar/05/pdf/sel.pdf>
- Shenoy, N. K., & Prabhakar, S. M. (2010). Finasteride and male breast cancer: Does the MHRA report show a link? *Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery*, 3(2), 102-105.
- Smirnova, I. A., Dian, C., Leonard, G. A., McSweeney, S., Birse, D., & Brzezinski, P. (2004). Development of a bacterial biosensor for nitrotoluenes: the crystal structure of the transcriptional regulator DntR. *Journal of Molecular Biology* (Vol. 340, pp. 405-418). England: 2004 Elsevier Ltd.
- Steers, W. D. (2001). 5 α -reductase activity in the prostate. *Urology*, 58(6, Supplement 1), 17-24.
- Stortz, C. A., Johnson, G. P., French, A. D., & Csonka, G. I. (2009). Comparison of different force fields for the study of disaccharides. *Carbohydrate Research*, 344(16), 2217-2228.
- Tastan, A. O., De Beer, T. A. P., & Joubert, F. (2008). Protein homology modelling and its use in South Africa. *South African Journal of Science* 104(1 & 2), 2-6. Retrieved from http://reference.sabinet.co.za/webx/access/electronic_journals/sajsci/sajsci_v104_n1_2_a1.pdf
- The Boston Group, U. C. F. (2015). Urology Care Foundation - Urology A-Z - BPH: Surgical Management (Benign Prostatic Hyperplasia/Enlarged Prostate). from <http://www.urologyhealth.org/urology/index.cfm?article=31>
- Thompson, I. M., Goodman, P. J., Tangen, C. M., Lucia, M. S., Miller, G. J., Ford, L. G., et al. (2003). The Influence of Finasteride on the Development of Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine*, 349(3), 215-224.
- Torres, J. M., & Ortega, E. (2003). Differential regulation of steroid 5 α -reductase isozymes expression by androgens in the adult rat brain. *The FASEB Journal*, 17(11), 1428-1433.
- Tropsha, A., & Abraham, D. J. (2003). Recent Advances in Development, Validation, and Exploitation of QSAR Models. *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*: John Wiley & Sons, Inc.
- Uemura, M., Tamura, K., Chung, S., Honma, S., Okuyama, A., Nakamura, Y., et al. (2007). Novel 5 α -steroid reductase (SRD5A3, type-3) is overexpressed in hormone-refractory prostate cancer. *Japanese Cancer Association*, 99, 81-86.
- Urología Multidisciplinaria: Hiperplasia prostática benigna. (2015). from <http://www.urologia-md.com.mx/enfermedades/hiperplasia-prostatica-benigna.php>
- Usuga, X., & Rugeles, M. T. (2006). Ribonucleasas: su potencial terapéutico en infecciones virales. *Acta Biológica Colombiana*, 11, 31-44.

- Vela-Navarrete, R., García Cardoso, J., López Farre, A., Barat, A., Manzarbeitia, F., Ramírez, M., et al. (2002). Hiperplasia prostática benigna: significado biológico de la infiltración celular linfocitaria del adenoma. *Actas Urológicas Españolas*, 26(3), 163-173.
- Vyas, V. K., Ukawala, R. D., Ghate, M., & Chintha, C. (2012). Homology modeling a fast tool for drug discovery: current perspectives. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 74(1), 1-17.
- Wallner, B., & Elofsson, A. (2003). Can correct protein models be identified? *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 12(5), 1073-1086.
- Wang, J.-L., Liu, H.-L., Zhou, Z.-L., Chen, W.-H., & Ho, Y. (2014). Discovery of novel 5 α -reductase type II inhibitors by pharmacophore modelling, virtual screening, molecular docking and molecular dynamics simulations. *Molecular Simulation*, 41(4), 287-297.
- Wang, Q., Edupuganti, R., Tavares, C. D. J., Dalby, K. N., & Ren, P. (2015). Using docking and alchemical free energy approach to determine the binding mechanism of eEF2K inhibitors and prioritizing the compound synthesis. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2, 9.
- Wigley, W. C., Prihoda, J. S., Mowszowicz, I., Mendonca, B. B., New, M. I., Wilson, J. D., et al. (1994). Natural Mutagenesis Study of the Human Steroid 5.alpha.-Reductase 2 Isoenzyme. *Biochemistry*, 33(5), 1265-1270.
- Zhang, Y. (2008). I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics*, 9(1), 1-8.
- Zhang, Y., & Skolnick, J. (2004). Scoring function for automated assessment of protein structure template quality. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 57(4), 702-710.
- Zhu, Y. S., & Imperato-McGinley, J. L. (2009). 5alpha-reductase isozymes and androgen actions in the prostate *Annals of the New York Academy of Sciences* (Vol. 1155, pp. 43-56). United States.

8. Anexos

Anexo A. Programas computacionales para acoplamiento molecular (*docking*) de pequeñas moléculas o fragmentos

Modalidad del diseño de fármacos	Programa	Presencia de flexibilidad		Descripción	Referencia
		Proteína	Ligando		
Cribado virtual	DOCK	No	Si	Acoplamiento molecular de pequeñas moléculas o fragmentos en el sitio activo de la diana.	(Ewing, Makino, Skillman, & Kuntz, 2001)
	FlexX	No	Si	Dock automatizado de proteínas flexibles	(Kramer, Rarey, & Lengauer, 1999)
	SLIDE	Si	Si	Sirve para realizar un cribado virtual de posibles ligandos de la proteína en estudio	(Schnecke, Swanson, Getzoff, Tainer, & Kuhn, 1998)
	AUTODOCK	Si	Si	utiliza la red de energía de interacción promediado para dar cuenta de las conformaciones del receptor y del ligando	(Morris, et al., 1998)
	MCDOCK	No	Si	Utiliza simulaciones de Montecarlo en el <i>docking</i> para fijar los ligandos	(Liu & Wang, 1999)

Programas computacionales para acoplamiento molecular (*docking*) de pequeñas moléculas o fragmentos (continuación)

Modalidad del diseño de fármacos	Programa	Presencia de flexibilidad		Descripción	Referencia
		Proteína	Ligando		
Diseño de <i>novo</i>	LUDI	No	Si	Dock y puntuaciones de fragmentos construidos de novo	(Bohm, 1992)
	GRID	No	Si	calcula energías de enlace para los grupos funcionales determinando el sitio para el <i>docking</i>	(Goodford, 1985)
	DLD	No	Si	Permite predecir sitio de unión de ácidos grasos saturados con sp 3 carbonos, más tarde vinculado	(Miranker & Karplus, 1995)
	GrowMol	No	Si	Construye ligandos a partir de una biblioteca de átomos	(Bohacek & McMartin, 1994)
	GenStar	No	Si	construye ligandos con carbonos sp3	(Rotstein & Murcko, 1993)

Anexo B. Resultados primarios de los modelos construidos con MODELLER y validación propia del programa.

Modelo: MOD1MG7

>> Summary of successfully produced models:

Filename	molpdf	DOPE score	GA341 score
5ARII.B99990001.pdb	1914.85791	-24289.20703	0.17246
5ARII.B99990002.pdb	1965.72205	-24968.00195	0.16533
5ARII.B99990003.pdb	1949.89478	-25395.16992	0.14346
5ARII.B99990004.pdb	2111.27344	-25293.31641	0.18459
5ARII.B99990005.pdb	1984.89380	-26296.62109	0.14104

Modelo: MOD1UTH

>> Summary of successfully produced models:

Filename	molpdf	DOPE score	GA341 score
5ARII.B99990001.pdb	1617.75623	-26667.18555	0.08514
5ARII.B99990002.pdb	1627.10828	-25813.47656	0.07634
5ARII.B99990003.pdb	1610.37622	-25892.67578	0.06309
5ARII.B99990004.pdb	1588.09216	-26690.70898	0.17747
5ARII.B99990005.pdb	1633.25415	-26158.25781	0.09772

Modelo: MOD2HEA

>> Summary of successfully produced models:

Filename	molpdf	DOPE score	GA341 score
5ARII.B99990001.pdb	1996.14465	-25561.32422	0.11055
5ARII.B99990002.pdb	1847.91895	-25223.23633	0.06847
5ARII.B99990003.pdb	1825.65247	-25181.63867	0.08065
5ARII.B99990004.pdb	1748.85925	-25042.92578	0.07743
5ARII.B99990005.pdb	1880.20105	-25516.10547	0.06203

Modelo: MOD1J0A

>> Summary of successfully produced models:

Filename	molpdf	DOPE score	GA341 score
5ARII.B99990001.pdb	1871.16956	-26405.29297	0.08239
5ARII.B99990002.pdb	2079.84619	-27401.61328	0.10422
5ARII.B99990003.pdb	1891.50159	-26930.50195	0.08241
5ARII.B99990004.pdb	1931.49377	-27438.68359	0.09282
5ARII.B99990005.pdb	1863.86560	-26709.66992	0.11543

Modelo: MOD4QUB

>> Summary of successfully produced models:

Filename	molpdf	DOPE score	GA341 score
5ARII.B99990001.pdb	1710.85010	-22418.31641	0.08109
5ARII.B99990002.pdb	1651.14978	-23096.30078	0.06318
5ARII.B99990003.pdb	1573.24182	-23093.46680	0.05049
5ARII.B99990004.pdb	1653.82275	-22365.92969	0.07489
5ARII.B99990005.pdb	1535.51990	-22915.46875	0.05918

Modelo: MOD3BUR

>> Summary of successfully produced models:

Filename	molpdf	DOPE score	GA341 score
5ARII.B99990001.pdb	1675.57776	-26646.24609	0.13000
5ARII.B99990002.pdb	1654.75293	-26561.03516	0.26528
5ARII.B99990003.pdb	1532.96875	-26883.12305	0.18944
5ARII.B99990004.pdb	1710.99182	-26068.69141	0.11068
5ARII.B99990005.pdb	1725.79358	-26223.01562	0.14269

Anexo C. Resultados primarios de los modelos construidos con I-TASSER y validación propia de la plataforma.

Modelo: ITA1J0A

Name	C-score	Exp.TM-Score	Exp.RMSD	No.of decoys	Cluster density
Model1:	-0.95	0.59+-0.14	7.9+-4.4	3659	0.1261
Model2:	-2.49			1143	0.0270
Model3:	-3.20			390	0.0132
Model4:	-2.66			807	0.0227
Model5:	-2.91			603	0.0177

Modelo: ITA1MG7

Name	C-score	Exp.TM-Score	Exp.RMSD	No.of decoys	Cluster density
Model1:	0.06	0.72+-0.11	5.7+-3.6	4514	0.3439
Model2:	-2.28			1391	0.0333
Model3:	-2.35			1100	0.0311
Model4:	-3.57			274	0.0092
Model5:	-4.13			191	0.0052

Modelo: ITA1UTH

Name	C-score	Exp.TM-Score	Exp.RMSD	No.of decoys	Cluster density
Model1:	-1.30	0.55+-0.15	8.7+-4.6	2953	0.0891
Model2:	-2.69			855	0.0221
Model3:	-3.13			562	0.0142
Model4:	-3.31			440	0.0119
Model5:	-3.62			309	0.0087

Modelo: ITA3BUR

Name	C-score	Exp.TM-Score	Exp.RMSD	No.of decoys	Cluster density
Model1:	-0.36	0.67+-0.13	6.6+-4.0	6970	0.2712
Model2:	-0.49			5160	0.2375
Model3:	-2.43			904	0.0341
Model4:	-1.74			1453	0.0682
Model5:	-4.03			135	0.0069

Modelo: ITA3BUV

Name	C-score	Exp.TM-Score	Exp.RMSD	No.of decoys	Cluster density
Model1:	-0.40	0.66+-0.13	6.7+-4.0	6795	0.2592
Model2:	-0.64			4509	0.2047
Model3:	-2.25			981	0.0408
Model4:	-1.23			2575	0.1127
Model5:	-1.58			1771	0.0796

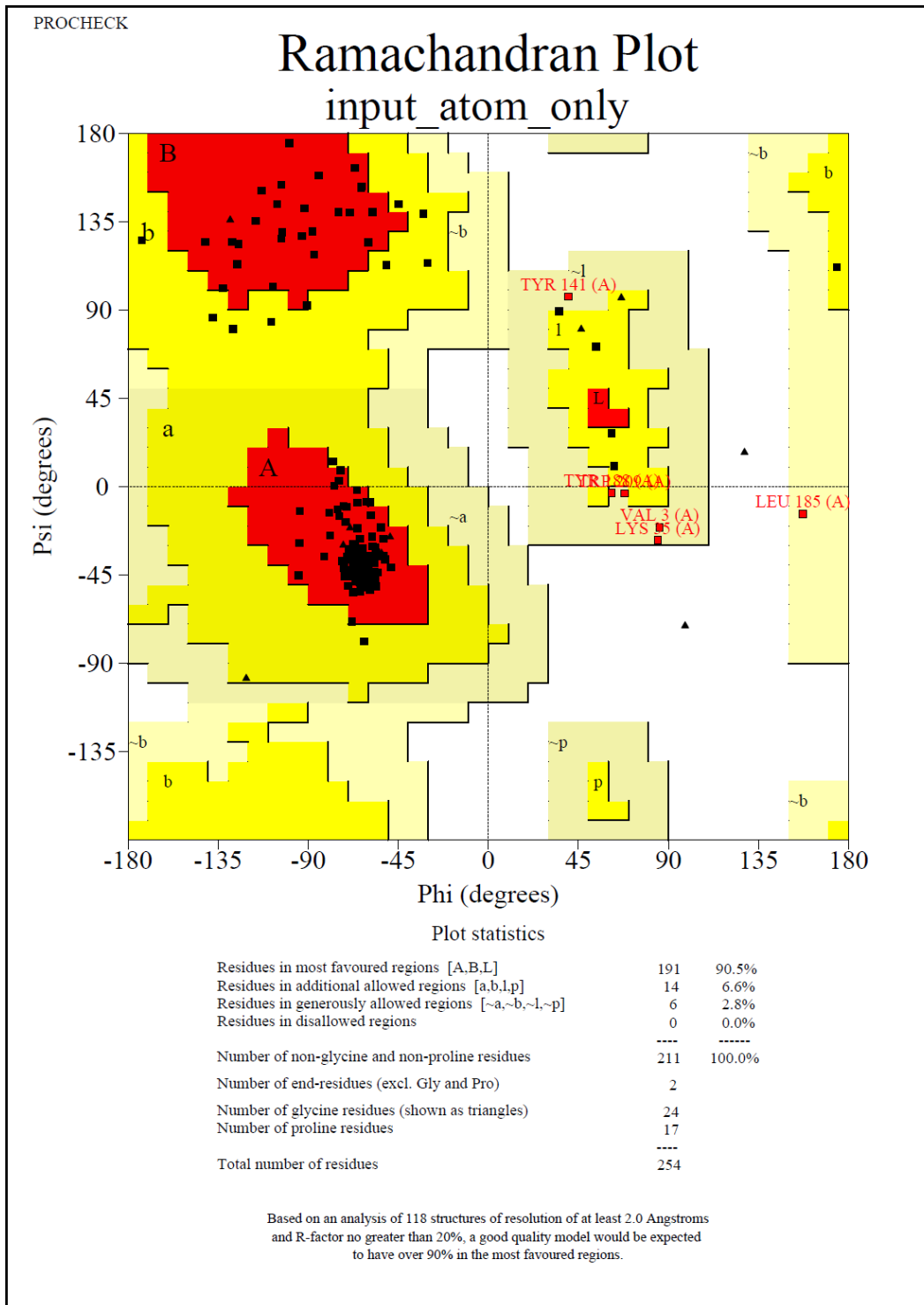
Modelo: ITA4QUV

Name	C-score	Exp.TM-Score	Exp.RMSD	No.of decoys	Cluster density
Model1:	0.65	0.80+-0.09	4.5+-3.0	7493	0.6244
Model2:	-1.26			1207	0.0920

Anexo D. Resultados primarios estructura secundaria del modelo de la 5αR-II construido con PHYRE2



Anexo E: Gráfico de Ramachandran para el modelo ITA3BUR



Anexo F: Resultados de acoplamiento molecular para los modelos construidos con la plataforma I-TASSER y las plantillas 1J0A, 1MG7, 1UTH con testosterona finasterida y dutasterida

a) Modelo: ITA1J0A Testosterona

CLUSTERING HISTOGRAM

Clus	Lowest	Run	Mean	Num	Histogram						
-ter	Binding		Binding	in							
Rank	Energy		Energy	Clus	5	10	15	20	25	30	35
1	-9.78	81	-9.78	100	:	:	:	:	:	:	:

#####

Number of multi-member conformational clusters found = 1, out of 100 runs.

Modelo: ITA1MG7 Testosterona

CLUSTERING HISTOGRAM

Clus	Lowest	Run	Mean	Num	Histogram						
-ter	Binding		Binding	in							
Rank	Energy		Energy	Clus	5	10	15	20	25	30	35
1	-9.47	7	-9.46	100	:	:	:	:	:	:	:

#####

Number of multi-member conformational clusters found = 1, out of 100 runs.

Modelo: ITA1UTH Testosterona

CLUSTERING HISTOGRAM

Clus	Lowest	Run	Mean	Num	Histogram						
-ter	Binding		Binding	in							
Rank	Energy		Energy	Clus	5	10	15	20	25	30	35
1	-8.73	5	-8.73	100	:	:	:	:	:	:	:

#####

Number of multi-member conformational clusters found = 1, out of 100 runs.

b) Modelo: ITA1J0A Finasterida

CLUSTERING HISTOGRAM

Clus-ter Rank	Lowest Binding Energy	Run	Mean Binding Energy	Num in Clus	Histogram
1	-8.33	68	-8.08	70	#####
2	-8.23	100	-8.16	27	#####
3	-7.56	25	-7.52	3	###

Number of multi-member conformational clusters found = 3, out of 100 runs.

Modelo: ITA1MG7 Finasterida

CLUSTERING HISTOGRAM

Clus-ter Rank	Lowest Binding Energy	Run	Mean Binding Energy	Num in Clus	Histogram
1	-10.25	17	-10.17	100	#####

Number of multi-member conformational clusters found = 1, out of 100 runs.

Modelo: ITA1UTH Finasterida

CLUSTERING HISTOGRAM

Clus-ter Rank	Lowest Binding Energy	Run	Mean Binding Energy	Num in Clus	Histogram
1	-7.04	88	-6.88	43	#####
2	-6.67	44	-6.64	8	#####
3	-6.59	57	-6.59	49	#####

Number of multi-member conformational clusters found = 3, out of 100 runs.

c) Modelo: ITA1J0A Dutasterida

CLUSTERING HISTOGRAM

Clus-ter Rank	Lowest Binding Energy	Run	Mean Binding Energy	Num in Clus	Histogram
					5 10 15 20 25 30 35
					: : : : : :
1	-7.07	23	-6.19	46	#####
2	-6.56	57	-6.29	28	#####
3	-5.76	64	-5.68	20	#####
4	-3.04	94	-3.01	6	#####

Number of multi-member conformational clusters found = 4, out of 100 runs.

Modelo: ITA1MG7 Dutasterida

CLUSTERING HISTOGRAM

Clus-ter Rank	Lowest Binding Energy	Run	Mean Binding Energy	Num in Clus	Histogram
					5 10 15 20 25 30 35
					: : : : : :
1	-6.62	8	-5.68	4	####
2	-6.32	13	-5.60	8	#####
3	-5.94	78	-5.44	9	#####
4	-5.87	3	-5.62	57	#####
5	-5.34	86	-5.34	1	#
6	-5.21	58	-4.92	7	#####
7	-5.20	60	-4.72	2	##
8	-5.07	45	-5.07	1	#
9	-4.99	47	-4.65	5	####
10	-4.57	17	-4.57	1	#
11	-4.24	51	-4.24	1	#
12	-3.40	31	-3.40	1	#
13	+0.38	50	+0.38	1	#
14	+1.60	6	+1.60	1	#
15	+5.82	95	+5.82	1	#

Number of multi-member conformational clusters found = 7, out of 100 runs.

Modelo: ITA1UTH Dutasterida

CLUSTERING HISTOGRAM

Clus-ter Rank	Lowest Binding Energy	Run	Mean Binding Energy	Num in Clus	Histogram
					5 10 15 20 25 30 35
					: : : : : :
1	-6.10	22	-6.04	7	#####
2	-5.81	10	-5.74	55	#####
3	-5.42	98	-5.38	30	#####
4	-5.04	76	-4.91	5	#####
5	-4.98	48	-4.97	2	##
6	-4.35	33	-4.35	1	#

Number of multi-member conformational clusters found = 5, out of 100 runs.

Anexo G: Resultados de acoplamiento molecular para los modelos construidos con MODELLER y las plantillas 1J0A, 1MG7, 1UTH con Testosterona y Dutasterida

Modelo: MOD1J0A Testosterona

CLUSTERING HISTOGRAM

Clus	Lowest	Run	Mean	Num	Histogram						
-ter	Binding		Binding	in							
Rank	Energy		Energy	Clus	5	10	15	20	25	30	35
1	-8.18	21	-8.18	74	:	:	:	:	:	:	:
2	-8.18	2	-8.17	26	:	:	:	:	:	:	:

Number of multi-member conformational clusters found = 2, out of 100 runs.

Modelo: MOD1MG7 Testosterona

CLUSTERING HISTOGRAM

Clus	Lowest	Run	Mean	Num	Histogram						
-ter	Binding		Binding	in							
Rank	Energy		Energy	Clus	5	10	15	20	25	30	35
1	-10.18	44	-10.02	72	:	:	:	:	:	:	:
2	-9.81	80	-9.79	26	:	:	:	:	:	:	:
3	-8.06	46	-8.06	2	:	:	:	:	:	:	:

Number of multi-member conformational clusters found = 3, out of 100 runs.

Modelo: MOD1UTH Testosterona

CLUSTERING HISTOGRAM

Clus	Lowest	Run	Mean	Num	Histogram						
-ter	Binding		Binding	in							
Rank	Energy		Energy	Clus	5	10	15	20	25	30	35
1	-8.90	53	-8.89	100	:	:	:	:	:	:	:

Number of multi-member conformational clusters found = 1, out of 100 runs.

Modelo: MOD1J0A Dutasterida

CLUSTERING HISTOGRAM

Clus-ter Rank	Lowest Binding Energy	Run	Mean Binding Energy	Num in Clus	Histogram
					5 10 15 20 25 30 35
					: : : : : : :
1	-7.56	34	-7.23	21	#####
2	-7.54	18	-7.43	9	#####
3	-7.49	70	-7.08	10	#####
4	-7.34	97	-7.16	45	#####
5	-7.23	75	-7.10	2	##
6	-7.14	10	-7.10	3	###
7	-7.10	49	-7.08	2	##
8	-6.94	22	-6.92	5	#####
9	-6.84	65	-6.84	1	#
10	-6.81	13	-6.76	2	##

Number of multi-member conformational clusters found = 9, out of 100 runs.

Modelo: MOD1MG7 Dutasterida

CLUSTERING HISTOGRAM

Clus-ter Rank	Lowest Binding Energy	Run	Mean Binding Energy	Num in Clus	Histogram
					5 10 15 20 25 30 35
					: : : : : : :
1	-9.35	63	-8.88	34	#####
2	-8.06	60	-7.90	38	#####
3	-7.81	43	-7.81	1	#
4	-7.79	13	-7.69	15	#####
5	-7.46	3	-7.46	1	#
6	-7.23	14	-7.21	11	#####

Number of multi-member conformational clusters found = 4, out of 100 runs.

Modelo: MOD1UTH Dutasterida

CLUSTERING HISTOGRAM

Clus-ter Rank	Lowest Binding Energy	Run	Mean Binding Energy	Num in Clus	Histogram
					5 10 15 20 25 30 35
					: : : : : : :
1	-7.46	73	-7.40	21	#####
2	-7.46	67	-7.37	43	#####
3	-7.19	75	-7.09	26	#####
4	-7.18	52	-7.13	10	#####

Number of multi-member conformational clusters found = 4, out of 100 runs.

Anexo H: Resultados de acoplamiento molecular para el modelo MOD4QUV con Dutasterida

Modelo: MOD4QUV Dutasterida

CLUSTERING HISTOGRAM

Clus- -ter Rank	Lowest Binding Energy	Run	Mean Binding Energy	Num in Clus	Histogram 5 10 15 20 25 30 : : : : : : : : : : : :
1	-10.05	89	-9.97	30	#####
2	-9.66	23	-9.66	1	#
3	-9.50	47	-9.28	29	#####
4	-9.49	27	-9.46	18	#####
5	-9.47	8	-9.45	4	####
6	-9.24	38	-9.22	4	####
7	-9.08	18	-9.01	6	#####
8	-9.08	51	-9.03	3	###
9	-8.87	3	-8.84	2	##
10	-8.80	87	-8.78	3	###

Number of multi-member conformational clusters found = 9, out of 100 runs.

Anexo I: Resultados de acoplamiento molecular para el modelo ITA3BUR con Testosterona, Finasterida y Dutasterida

Modelo: ITA3BUR Testosterona

CLUSTERING HISTOGRAM

Clus	Lowest	Run	Mean	Num	Histogram						
-ter	Binding		Binding	in							
Rank	Energy		Energy	Clus	5	10	15	20	25	30	35
1	-10.54	51	-10.54	100	:	:	:	:	:	:	:

#####

Number of multi-member conformational clusters found = 1, out of 100 runs.

Modelo: ITA3BUR Finasterida

CLUSTERING HISTOGRAM

Clus	Lowest	Run	Mean	Num	Histogram						
-ter	Binding		Binding	in							
Rank	Energy		Energy	Clus	5	10	15	20	25	30	35
1	-10.35	61	-10.31	100	:	:	:	:	:	:	:

#####

Number of multi-member conformational clusters found = 1, out of 100 runs.

Modelo: ITA3BUR Dutasterida

CLUSTERING HISTOGRAM

Clus	Lowest	Run	Mean	Num	Histogram						
-ter	Binding		Binding	in							
Rank	Energy		Energy	Clus	5	10	15	20	25	30	35
1	-10.95	1	-10.81	100	:	:	:	:	:	:	:

#####

Number of multi-member conformational clusters found = 1, out of 100 runs.