

DISEÑO RACIONAL DE INHIBIDORES DE LA ENZIMA 5 α -REDUCTASA I

TRABAJO DE GRADO

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

QUÍMICO

PRESENTA

EDWIN LEONEL BONILLA ROZO

DIRECTORES:

**Dr. ELKIN EDUARDO SANABRIA CHANAGA
Dra. DIANA ALEXANDRA TORRES SÁNCHEZ**

PAMPLONA, 2022

Contenido

RESUMEN	4
DEDICATORIA	5
AGRADECIMIENTOS	6
LISTA DE ABREVIATURAS	7
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE ESQUEMAS	9
LISTA DE TABLAS	10
1. INTRODUCCIÓN	11
1.1. <i>Hiperplasia prostática benigna y cáncer de próstata</i>	14
1.2. <i>Andrógenos</i>	17
1.3. <i>Enzima 5αR</i>	21
1.4. <i>Inhibidores de la 5αR</i>	26
1.5. <i>Desarrollo de fármacos</i>	29
1.5.1. <i>Modelado de proteínas</i>	33
1.5.2. <i>Propiedades ADME-T</i>	36
1.6. <i>Acoplamiento molecular</i>	37
1.7. <i>Dinámica molecular</i>	40
2. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	41
3. OBJETIVOS	43
3.1. <i>Objetivo general</i>	43
3.2. <i>Objetivos específicos</i>	43
4. METODOLOGÍA	44

	3
4.1. Diseño y preparación de los ligandos	45
4.2. Preparación de la proteína	46
4.3. Evaluación in silico de las propiedades ADME-T	46
4.4. Acoplamiento molecular	46
4.5. Dinámica molecular	47
5. RESULTADOS Y ANÁLISIS	48
5.1. Modelado de homología	48
5.1.1. Validación de la estructura tridimensional de la 5αR-1 a través de estudios de acoplamiento y dinámica molecular.	57
5.2. Diseño bio-isostérico de ligandos	66
5.3. Propiedades ADME-T	68
5.4. Acoplamiento Molecular	70
5.5. Dinámica Molecular	76
6. CONCLUSIONES	80
7. PERSPECTIVAS	81
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
9. ANEXOS	88

Resumen

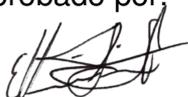
Resumen del trabajo de grado que presenta Edwin Leonel Bonilla Rozo como requisito parcial para obtener el grado de Químico.

DISEÑO RACIONAL DE INHIBIDORES DE LA ENZIMA 5 α -REDUCTASA I

En el presente trabajo se propuso un set de 48 compuestos inspirados en el ácido androsta-3,5-dieno-3 carboxílico 17-arilcarbamoil sustituido, del cual se encontraron 4 ligandos con perfiles prometedores como inhibidores de la enzima 5 α R1. Para esto, se modeló la estructura 3D de la isoforma 1 a través del método de homología de proteínas, asimismo, se optimizó y se validó la estructura 3D de la enzima 5 alfa reductasa tipo 1 con algunos ligandos con actividad inhibitoria reportada. Una vez optimizada y validada la enzima, se realizó el diseño del set de ligandos empleando el método de reemplazo bio-isostérico, en el anillo A y anillo aromático de la estructura base. Una vez construidos, los ligandos fueron sometidos a un filtro de tres pasos: análisis de propiedades ADME-T, acoplamiento y dinámica molecular. La información obtenida en el presente trabajo de investigación puede servir de base para el desarrollo de compuestos bioactivos contra la enzima 5 α R1 y a su vez, contra la hiperplasia prostática benigna y el cáncer de próstata

Palabras clave: *homología de proteínas, bioisosteres, hiperplasia prostática benigna, cáncer de próstata, 5 α -reductasa, acoplamiento molecular.*

Resumen aprobado por:



Dr. Elkin Eduardo Sanabria Chanaga
Director de trabajo de grado



Dra. Diana Alexandra Torres Sánchez
Codirectora de trabajo de grado

Dedicatoria

A mis padres, Gustavo Bonilla y Lizandra Rozo,

A mis hermanos, Gustavo y Tatiana,

A mis sobrinas y mi sobrino, Ariadna, Valentina y Ángel,

A mis mascotas Pirry y Atenea.

Agradecimientos

Al profesor Elkin Sanabria, por la orientación y dedicación en este trabajo. Por ser más que mi tutor, un amigo. Por el apoyo e inculcarme el deseo de aprender sobre esta ciencia. Gracias, por confiar en mí y ver el potencial que tal vez ni yo mismo percibía.

A la Universidad de Pamplona, y al programa de Química por permitir mi formación como Químico.

A mi codirectora, Dra. Alexandra Torres Sánchez, por permitirme estar en su semillero de investigación, asimismo, gracias por apoyarnos y confiar en este proyecto.

Al comité evaluador, por el tiempo empleado y por las observaciones y sugerencias dadas del proyecto.

A mis amigos, Kerly, Melissa, Yeison, por haberme apoyado, y escuchado en momentos incondicionales. A los demás, se les agradece por compartir parte de la vida conmigo.

A la vida, por haberme permitido disfrutar, conocer y vivir nuevas experiencias y personas, no me olvido de cada uno.

A mi familia, en especial mi papá, Don Gustavo, sé qué desde lejos ha estado apoyándome y dándome fuerzas para culminar esta etapa. A la señora Sandra, gracias por todo y por nada. A mis sobrinos, por ser esa luz y amor inigualable en el camino.

Lista de Abreviaturas

PAcP: fosfatasa ácida prostática

PSA: antígeno prostático específico

CaP: cáncer de próstata

HPB: hiperplasia prostática benigna

AR: receptores de andrógeno

DHT: dihidrotestosterona

ERA: elementos de respuesta a andrógenos

LHRH: hormona liberadora de la hormona luteinizante

AUA: Asociación Americana de Urología

STUI: síntomas del tracto urinario inferior

T: testosterona

GnRH: eje hipotálamo-hipófisis-gonadal

LH: hormona luteinizante

3 β HSD: enzima 3 β -hidroxiesteroide hidrogenasa

17 β HSD: enzima 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa

DHEA: dehidroepiandrosterona

5 α R: 5-alfa reductasa

NADPH: La nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

5 α R1: 5-alfa reductasa tipo 1

5 α R2: 5-alfa reductasa tipo 2

5 α R3: 5-alfa reductasa tipo 3

PIN: neoplasia intraepitelial prostática

DHF: dihidrofinasterida

DiFAC: diseño de fármacos asistido por computadoras

ARN: ácido ribonucleico

MD o DM: dinàmica molecular

Lista de Figuras

Figura 1. Anatomía del aparato reproductor masculino. Tomado de unCOMO.	11
Figura 2. Comparación en el tamaño de una próstata normal vs una con hiperplasia prostática benigna.....	15
Figura 3. Incidencia de cáncer en hombres y mujeres en Colombia en el año 2020 (Globocan, 2021a)	16
Figura 4. Representación esquemática del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas. Tomado de Bellido, 1999.....	18
Figura 5. Conversión de testosterona a dihidrotestosterona por medio de la 5 α R.....	22
Figura 6. Estructura química de los inhibidores más comunes de la enzima 5 alfa reductasa.	27
Figura 7. Herramientas y técnicas modernas en el desarrollo computacional de fármacos.	32
Figura 8. Pasos del proceso de modelado de proteínas. Tomado de Chandramore 2017	35
Figura 9. Modelo de llave-cerradura propuesto por Fischer. Tomado de: TimVickers, vectorized by Fvasconcellos.....	38
Figura 10. Proceso común de anclaje de proteína-ligando en un acoplamiento molecular. Tomado de (Brás et al. 2014).....	39
Figura 11. Evaluación y comparación de la secuencia aminoacídica 5R1 con su molde base. Obtenido por el programa SwissModel).....	50
Figura 12. Predicción de la estructura secundaria de la enzima 5 α -reductasa tipo 1 humana. Obtenida con el programa PSIPRED.....	52
Figura 13. Predicción de la estructura terciaria de la enzima 5 α -reductasa tipo 1 humana. Obtenida con el programa SwissModel.	53
Figura 14. ^a Diagrama de Ramachandran del modelo 3D de la 5 α R1, diseñado por SwissModel. ^b Diagrama de Ramachandran del modelo 3D de la 5 α R1, diseñado por AlphaFold. Obtenidos de UCLA.....	54
Figura 15. Diagrama de Ramachandran del modelo minimizado 3D de la 5 α R1, diseñado por SwissModel. Obtenidos de UCLA.	55
Figura 16. Superposición de estructuras terciarias de la enzima 5 α -reductasa tipo 1 humana. Modelo de color amarillo obtenido con el programa SwissModel y Modelo de color azul obtenido con el programa AlphaFold.....	56
Figura 17. Ligandos derivados del ácido androsta-3,5-dieno-3 carboxílico con actividad inhibitoria en la isoenzima 5-alfa reductasa tipo 1.....	57
Figura 18. ^A . Mejor pose del ligando 16A ^B . Mejor pose del ligando 16H ^C . Menor pose del ligando 16I ^D . Mejor pose del ligando 16J ^E . Mejor pose del ligando D ^F . Mejor pose del ligando F	59
Figura 19. Diferentes posiciones espaciales del complejo NADPH-5 α R1. Cada hélice está ennumeradas por color: roja: 1 hélice, verde: 2, azul: 3, amarillo:4, violeta:5 naranja:6 y celeste:7.	60
Figura 20. RMSD de los ligandos acoplados a la enzima 5alfa-reductasa tipo 1.....	62
Figura 21. Estructuras de resonancia de los ligandos derivados del ácido androsta-3,5-dieno-3 carboxílico.	62
Figura 22. Set de moléculas análogas al ácido androsta-3,5-dieno-3 carboxílico.....	67
Figura 23. ^A . Mejor pose del ligando 1 c , ^B . Mejor pose del ligando 6 b y ^C . Mejor pose del ligando 8 b	72
Figura 24. ^A . Mejor pose del ligando 10 c , ^B . Mejor pose del ligando 4 c y ^C . Mejor pose del ligando 11 c	73
Figura 25. ^A . Mejor pose del ligando 8 d y ^B . Mejor pose del ligando 9 d	74
Figura 26. ^A . Mejor pose del ligando 1 b , y ^B . Mejor pose del ligando 2 b	78
y ^B . Mejor pose del ligando 5 b	78
Figura 27. Poses conformacionales de los ligandos de interés con respecto al RMSD.....	79

Lista de Esquemas

Esquema 1. <i>Ruta metabólica esteroidogénesis</i>	19
Esquema 2. <i>Mecanismo de inhibición de la finasterida</i>	28
Esquema 3. <i>Ventajas en relación tiempo del uso de herramientas computacionales en el desarrollo de un medicamento</i>	31

Lista de Tablas

Tabla 1. Propiedades de las principales isoformas de la enzima 5 α -reductasa.	24
Tabla 2. Secuencia de aminoácidos de la enzima 5 α -reductasa tipo 1 humana “3-oxo-5-alpha-steroid 4-dehydrogenase 1”	48
Tabla 3. Resultados del alineamiento aminoacídico de la enzima 5 α R1.	49
Tabla 4. Representación de cada letra obtenida de la predicción estructural proteica de segundo nivel de la 5 α R1.	51
Tabla 5. Energía de acoplamiento molecular de los ligandos evaluados.	58
Tabla 6. Distancia media entre el sistema alfa, beta insaturado del ligando con su cofactor (NADPH)	63
Tabla 7. Energía de libre de unión calculados por el método MMPBSA y concentración inhibitoria de los ligandos 16.....	63
Tabla 8. Distancia media entre el sistema alfa, beta insaturado de los ligandos comerciales con su cofactor (NADPH) y energía libre de unión a través del método MMPBSA.	65
Tabla 8. Energía de libre de unión calculados por el método MMPBSA.	76
Tabla 9. Distancia media entre los ligandos estudiados y la dihidropiridina del cofactor de la enzima 5 α R1.	77
Tabla a. Resultados de interacción aminoacídica de los ligandos comerciales y los ligandos 16. ...	89
Tabla b. Resultados importantes de las propiedades ADME-T de cada ligando diseñado.....	89
Tabla c. Resultados de energía de acoplamiento molecular y distancias entre el complejo ligando-cofactor.....	91

1. Introducción

La próstata es una glándula masculina, de tamaño similar al de una nuez. Este órgano está situado en la parte inferior de la vejiga, el cual atraviesa la uretra (uretra prostática) y los conductos eyaculadores (**Figura 1**). La función de la próstata depende de la composición del tejido glandular y fibromuscular. El tejido fibromuscular es el encargado de separar los fluidos durante la micción y eyaculación. El tejido glandular contribuye a la función reproductiva por medio de su actividad secretora capaz de producir el fluido seminal, incluyendo iones (principalmente zinc y citrato) y proteínas, como fosfatasa ácida prostática (PACP), β -microseminoproteína e antígeno prostático específico (PSA) (Leach et al. 2015; Lilja and Abrahamsson 1988).

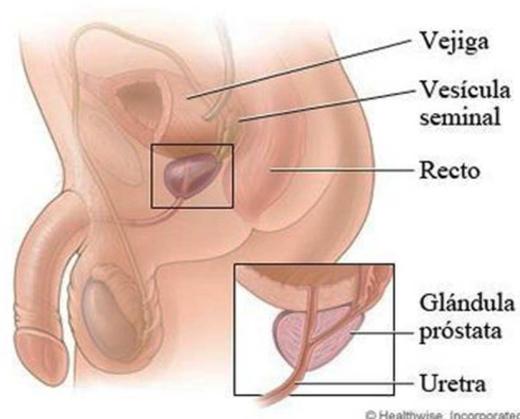


Figura 1. Anatomía del aparato reproductor masculino. Tomado de unCOMO.

Después de entrar a la edad adulta, la próstata crece lentamente y desacelera la formación de nuevas células, sin embargo, se ha demostrado que, al pasar de los años, el volumen de la próstata puede comenzar a aumentar en algunos hombres. Muchos estudios han confirmado que los andrógenos, en especial la testosterona y la dihidrotestosterona, pueden afectar de manera directa al tejido prostático y,

asimismo, participan en el desarrollo de enfermedades como la (HPB) y cáncer de próstata (CaP) (Dehm y Tindall 2007; Gelmann 2002; Tong y Zhou 2020; Whitacre et al. 2002; M.-L. Zhu y Kyprianou 2008).

Esta glándula es atractiva desde el punto de vista médico, debido al gran riesgo que padecen los hombres mayores de contraer cáncer de próstata (CaP) e hiperplasia prostática benigna (HPB). Se estima que, a partir de los 60 años, el hombre promedio presenta un 50-60% de probabilidad de padecer de CaP, así mismo, se ha confirmado que a medida que se incrementa la edad en la población masculina, aumenta de manera lineal la probabilidad de padecer tanto cáncer de próstata como hiperplasia prostática benigna (Berry et al. 1984).

La hiperplasia prostática benigna (HPB), se diferencia del CaP, debido al aumento de células benignas (En y En, 2006), caso contrario, el cáncer de próstata induce a un crecimiento anormal de células cancerígenas. Ahora, es importante aclarar que la prevalencia histológica de la hiperplasia prostática benigna es tan alta, casi del 50-60%, en hombres de 60 años y un 80-90% en hombres mayores de 70 años (Roehrborn 2005).

Los receptores de andrógeno (RA) y los metabolitos androgénicos, juegan un papel importante en el desarrollo del tejido prostático. El efecto de los andrógenos comienza con el transporte de la testosterona desde la circulación hacia la glándula. Por ejemplo, Fausto Rojas Duran y colaboradores mencionan que: *“La testosterona es reducida a dihidrotestosterona (DHT) en el estroma, por la acción de la enzima 5 α -reductasa, y transportada por difusión pasiva al citoplasma de la célula epitelial. Cuando la DHT, o la testosterona, se unen al RA este sufre un cambio*

conformacional, las chaperonas se disocian y el RA es fosforilado, sólo así se transloca al núcleo. En el núcleo, el RA se dimeriza y se une a secuencias específicas del ADN conocidas como elementos de respuesta a andrógenos (ERA) para llevar a cabo la transcripción y posterior síntesis de las proteínas” (Dehm y Tindall 2007; Grossmann, Huang, y Tindall 2001; Suzuki et al. 2003; Weigel y Moore 2007)

El crecimiento celular del CaP e HPB es considerado como un crecimiento dependiente de hormonas (especialmente los andrógenos), de ahí el uso común de tratamientos clásicos los cuales se encargan de bloquear la acción de las hormonas hacia este blanco molecular de interés. Dentro de las terapias para inhibir la acción de los andrógenos y disminuir los niveles de estos, se encuentran la orquiectomía y la inyección de análogos de la LHRH. Otra opción alternativa, es bloquear la unión de los andrógenos a los RA por medio de fármacos anti androgénicos, como la flutamida o la bicalutamida. Sin embargo, la mayoría de pacientes que padecen de CaP y reciben este tipo de tratamiento presentan un alivio temporal pero no eficaz. Es importante tener en cuenta que el cáncer de próstata, es un es una patología hormo-dependiente de andrógenos, sin embargo, poco después se convierte una enfermedad independiente de los andrógenos. (Dehm y Tindall 2007; Grossmann, Huang, y Tindall 2001; G. Han et al. 2005; Hara et al. 2008; Heinlein y Chang 2004; Henshall et al. 2001; So, Hurtado-Coll, y Gleave 2003; Suzuki et al. 2003; Whitacre et al. 2002)

Es posible considerar buenos fármacos, aquellos inhibidores que sean capaces de interrumpir los procesos enzimáticos presentes en las vías de síntesis de hormonas

esteroidales y antagonistas de los receptores de andrógeno (RA), y además que sean selectivos con las dianas terapéuticas de interés (Silva-Ortiz et al. 2015).

Con base en la información se puede postular que estas dos patologías están relacionadas en un órgano en interés, la próstata. En consecuencia, es posible suponer que el desarrollo de la glándula prostática está regulado por la actividad androgénica, a través de los receptores androgénicos (RA) y a partir de eso, es posible conjeturar que el crecimiento hiperplásico y la progresión del CaP depende de los andrógenos (Huggins y Hodges 1972). Asimismo, se puede asumir que, al ser patologías hormono-dependientes, una de las principales terapias para tratar el crecimiento hiperplásico y disminuir el desarrollo de cáncer de próstata metastásico, es el uso de bloqueadores androgénicos.

1.1. Hiperplasia prostática benigna y cáncer de próstata

La hiperplasia prostática benigna (HPB) es el término usado a la proliferación de células epiteliales y músculo liso dentro de la zona de transición media. Según la Asociación Americana de Urología, (AUA), la hiperplasia prostática benigna se convirtió en la patología más relacionada con el envejecimiento masculino. Se ha demostrado que el 30 a 40% de los hombres sufren de esta patología, además, la prevalencia aumenta significativamente, aproximadamente del 70 al 80%, en hombres mayores de 80 años (Madersbacher, Sampson, y Culig 2019).

La etiología de la hiperplasia prostática benigna es multifactorial, sin embargo, se considera que la edad y el estado hormonal son factores que se relacionan directamente con el desarrollo de la enfermedad (Ng M, Baradhi KM 2022). Además, el término de HPB no debe ser confundido o usado para describir los síntomas que

son atribuibles a la hiperplasia prostática benigna (HPB), Por ejemplo, los síntomas del tracto urinario inferior STUI o LUTS, sus siglas en inglés, no se pueden confundir con HPB. Es claro que el aumento prostático no siempre está acompañado por las expresiones claras de STUI, ya que estos síntomas no necesariamente están relacionados con el aumento prostático (**Figura 2**).

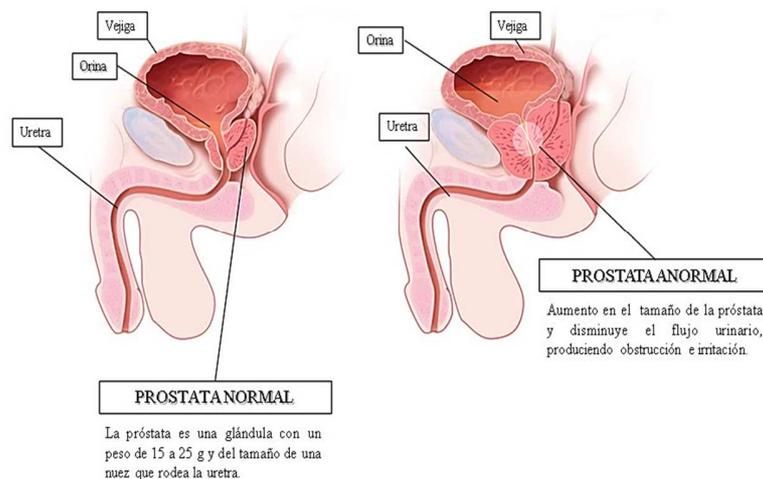


Figura 2. Comparación en el tamaño de una próstata normal vs una con hiperplasia prostática benigna.

Por otro lado, el cáncer de próstata es un tumor maligno que se desarrolla en la glándula prostática, y que al comienzo de sus etapas no presenta síntomas específicos. Según las estadísticas, más del 65% de todos los cánceres de próstata que se diagnostican en hombres, son pacientes mayores, o igual, de 65 años (Alberto Arcediano 2007). Además, se considera como el segundo cáncer con más incidencias en el mundo después del cáncer de pulmón. Se han estimado más de un 30% por 100,000 casos y una mortalidad menor del 10%(Sung et al. 2021a). En Colombia, el cáncer de próstata es el segundo cáncer más común en la población, y el primero en la población masculina. Entre enero del 2019 y enero del 2020, se diagnosticaron 44.500 casos prevalentes de cáncer de próstata, de los cuales

40.169 casos prevalentes, 3.708 diagnosticados nuevos reportados y 328 fallecidos
(Fondo Colombiano de Enfermedades de Alto Costo, 2020)

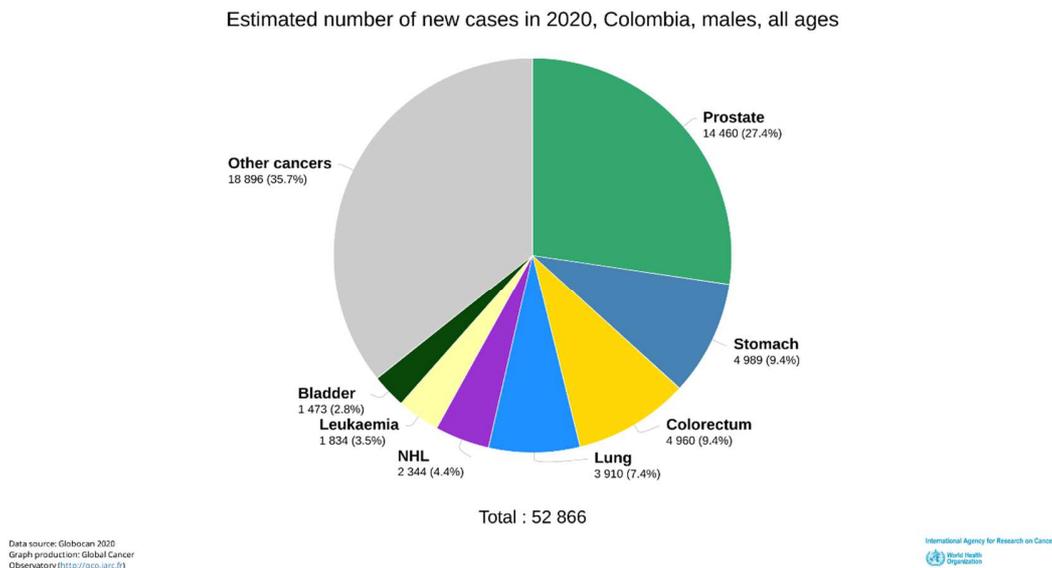


Figura 3. Incidencia de cáncer en hombres y mujeres en Colombia en el año 2020 (Globocan, 2021a)

Cabe señalar que las hormonas y los factores de crecimiento estimulan la proliferación celular y han sido asociados a otros tipos de cáncer, como el cáncer de mama (BN J, 2019). Por ejemplo, Huggins y Hodges, en 1941, demostraron que el cáncer de próstata es una patología hormono-dependiente, a partir de los niveles bajos de fosfatasa ácida, producto de la castración masculina. Otros estudios han demostrado una relación entre el crecimiento prostático con los andrógenos masculinos, como la dihidrotestosterona, y además han identificado algunas dianas terapéuticas de interés, por ejemplo, la enzima 5 α -reductasa y los receptores de andrógeno(Charles Huggins and Hodges 1941).

Con base en lo anterior, es posible considerar que los esteroides (hormonas esteroideas), y, asimismo, las proteínas protagonistas de la síntesis de estos

mismos, promueven la proliferación celular y desarrollan el aumento del volumen prostático.

1.2. Andrógenos

La próstata es un órgano completamente dependiente de la actividad biológica de los andrógenos testiculares, tanto así que su desarrollo, como el mantenimiento de la integridad estructural y funcional del mismo (Šimková et al. 2021). La testosterona (T), en conjunto con su potente metabolito reducido: la dihidrotestosterona (DHT), son los principales andrógenos en la circulación hormonal masculina. La mayor parte de T, aproximadamente 95%, es producida en los testículos (células de Leydig) y una pequeña cantidad (5%) es producida por la glándula suprarrenal (Labrie 2004).

Está claro que la producción de andrógenos está regulada por el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal (GnRH). El GnRH es secretado por el hipotálamo en pulsos, estimulando la secreción de la hormona luteinizante (LHRH), liberada del hipotálamo, que estimula la secreción de la hormona luteinizante (LH) en la adenohipófisis, la cual posteriormente incita sobre las células de Leydig, en los testículos, para iniciar la producción de andrógenos (Shacham et al. 2001). En los hombres, el principal andrógeno circulante es la testosterona (Debes y Tindall 2002), y la síntesis de testosterona está regulada por una retroalimentación negativa para prevenir la liberación de la LHRH y, en consecuencia, provocar el decrecimiento de la sensibilidad de la adenohipófisis a la LHRH (**Figura 4**).

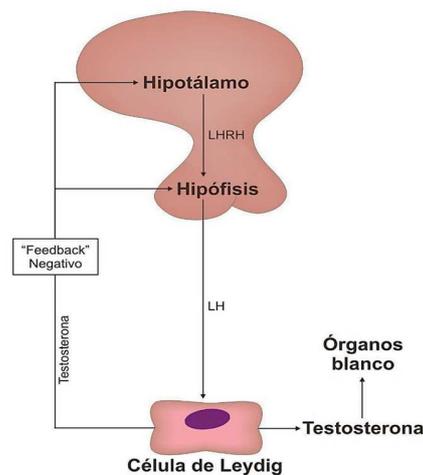
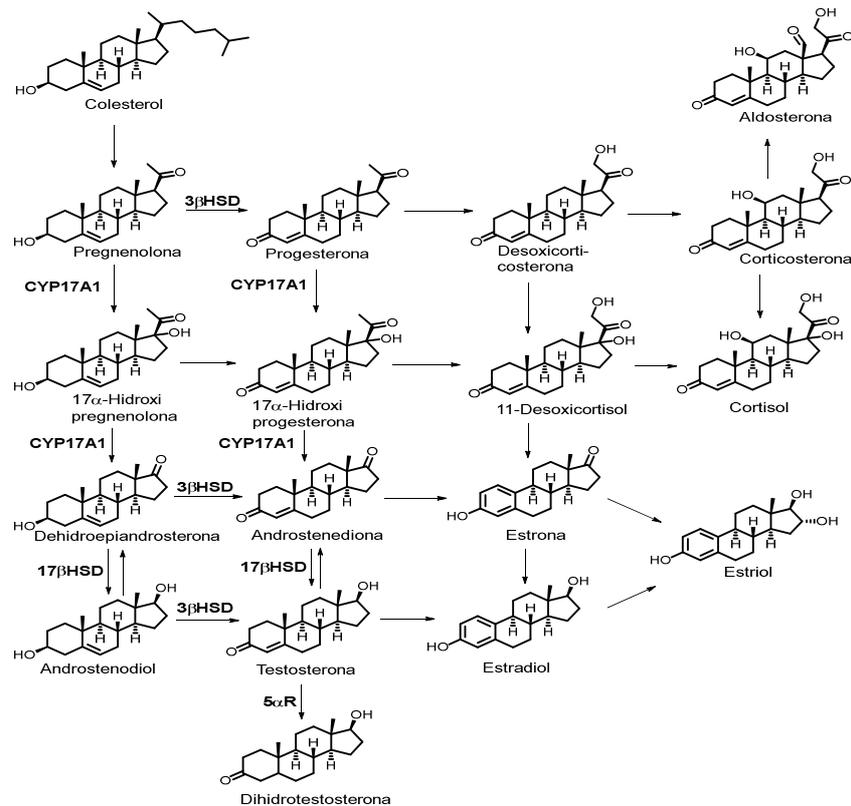


Figura 4. Representación esquemática del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas. Tomado de Bellido, 1999

Los andrógenos, así como otros derivados esteroidales, se obtienen a partir de la esteroidogénesis (**Esquema 1**). Esta biosíntesis comienza con la escisión irreversible de una cadena de 6 carbonos a partir del colesterol, produciendo la pregnenolona por acción del citocromo P450_{scc} (enzima de escisión de cadena lateral, CYP11A1), luego, la pregnenolona puede ser convertida en testosterona a través de dos vías llamadas delta 4 (Δ^4) y delta 5 (Δ^5) (Conley y Bird 1997). La vía delta 4 compromete la conversión de pregnenolona en progesterona por la acción de la enzima 3 β -hidroxiesteroide hidrogenasa (3 β HSD) (Sèdes et al. 2018). La progesterona es metabolizada por el citocromo P450 por la enzima, 17 α -hidroxilase (CYP17A1), en androstenediona, sustrato de la enzima 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 β HSD), para la síntesis de testosterona. Por otro lado, la vía delta 5, inicia por la enzima CYP17A1, y permite la conversión de pregnenolona en dehidroepiandrosterona (DHEA). Enseguida, las enzimas 17 β HSD y la 3 β HSD provocan la conversión a androstenediol o androstenediona y testosterona.



Esquema 1. Ruta metabólica esteroidogénica.

Con base en la literatura, se ha identificado que la principal fuente de andrógenos masculina es la testosterona, que es sintetizada por las células de Leyding que se encuentran ubicadas en los testículos. Varios autores reportan que tan pronto, la testosterona pasa a través del tejido prostático, alguna de las tres isoenzimas de la 5 alfa reductasa, la convierte en un andrógeno natural más potente, la dihidrotestosterona (DHT). Además, se ha demostrado que este metabolito presenta mayor afinidad a los receptores de andrógeno que el propio precursor, la T(Y.-S. Zhu y Sun 2005). Se ha evidenciado que tanto la testosterona como la DHT pueden unirse a los receptores androgénicos, sin embargo, el metabolito reducido, la DHT, es de dos a cinco veces más afín al receptor de andrógenos que su propio

metabolito principal, además, aumenta 10 veces más la señalización de los RA en comparación de la testosterona(Askew et al. 2007; Kemppainen et al. 1992).

Los receptores de andrógenos y los andrógenos, hacen en conjunto un factor esencial en el desarrollo de la próstata y otros órganos reproductivos masculinos (COOKE, YOUNG, y CUNHA 1991). Está claro que el aumento del volumen y masa prostática está en un constante equilibrio entre la proliferación/muerte celular y, al mismo tiempo, es controlada por la señalización de los receptores de andrógenos (RA) en el estroma y en el epitelio.

Los RA están ubicados predominantemente en células afín a los andrógenos, independientemente de si está o no en complejo con su ligando. Al contrario de otros receptores de esteroides, los RA son frecuentemente distribuidos entre el citoplasma y el núcleo cuando no están ligados a sus ligandos conatos. Los receptores de andrógeno actúan como receptores nucleares intracelulares de mayor afinidad a la DHT en comparación con la T. Se cree que los RA están inactivos cuando estos no están anclados a un ligando (Carson y Rittmaster 2003). Asimismo, se ha podido evidenciar que los RA se activan cuando estos están anclados a un ligando afín, como T o DHT, ya que induce a la activación de la actividad biológica (ANDRIOLE et al. 2004)

En resumidas palabras, los receptores de andrógeno son necesarios para la diferenciación sexual masculina y madurez sexual que conlleva al desarrollo de un testículo maduro capaz de apoyar la espermatogénesis y la producción de testosterona que derivan la fertilidad masculina. Los RA son un miembro clásico de la gran super familia de receptores nucleares (QUIGLEY et al. 1995)que incluyen

receptores para los 5 esteroides de mamíferos (andrógenos, estrógenos, progesterona, glucocorticoide, mineralocorticoide), también, como para hormonas tiroideas, ácido retinoico y vitamina D (SHI 2007)

El complejo entre DHT y RA provoca una transposición del citoplasma al núcleo, donde se interactúan a los genes principales (elementos de respuesta androgénica). Este complejo es considerado multiprotéico, además, su rol está relacionado directamente con factores transcripcionales y de la maquinaria constitucional de transcripción para la regulación de la transcripción génica(Chatterjee 2003; Mirone et al. 2006).

1.3. Enzima 5 α R

Las enzimas que pertenece a la familia de las 5 alfa reductasas, fueron identificadas, purificadas y caracterizadas en homogenatos de hígado de ratón (Forchielli y Dorfman 1956; Okuda y Okuda 1984; Samuels et al. 1950). Las isoenzimas 5 α R son proteínas microsomales, ligadas a membrana, que reducen irreversiblemente la insaturación de la posición 4-5C de varios esqueletos esteroidales del tipo C₁₉ y C₂₁, como la testosterona (T). Por ejemplo, la acción de esta enzima no es limitada a progesterona o testosterona, también puede convertir deoxicorticosterona en dihidrodesoxicorticosterona, corticosterona en dihidrocorticosterona, cortisol en dihidrocortisol y aldosterona en dihidroxialdosterona.

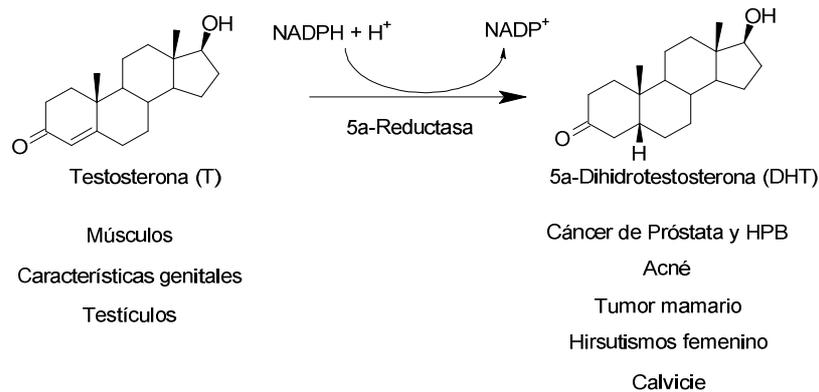


Figura 5. Conversión de testosterona a dihidrotestosterona por medio de la 5αR.

El mecanismo de la enzima 5αR es complejo, pero involucra la interacción del NADPH a la enzima seguida por el sustrato, ya que son dependiente de cofactor. El enlace $\Delta^{4,5}$ es quebrado por la transferencia de un hidruro del NADPH al carbono C-5 del anillo A, provocando la formación de un complejo ligando-NADP, el cual posteriormente, induce la salida del NADP⁺ para así realizar otros ciclos de catálisis. Con base en esto, el mecanismo de inhibición de las isoenzimas 5αR está dividido en tres tipos (Aggarwal et al. 2010a; Chen, Zouboulis, y Orfanos 1996; Occhiato et al. 2004):

- a. Competitivo con el cofactor (NADPH) y el sustrato (inhibidores bi-sustrato): el inhibidor se liga a la enzima libre, por ejemplo, OMO-3805;
- b. Competitivo con el sustrato: el inhibidor se une al complejo enzima-NADPH, por ejemplo, 4-, 6- y 10- azasteroides;
- c. No competitivos con el complejo enzima-NADP: el inhibidor se liga al complejo enzima-NADP⁺ después de la salida del producto, por ejemplo, epristerida;

Anteriormente, los estudios de la actividad biológica de las enzimas 5αR eran limitados por la insolubilidad de la proteína, sin embargo, esta barrera fue superada

a mediados de 1989. Con ayuda de la técnica de clonación de expresión, en *Oocitos de Xenopus*, fue posible aislar un cDNA de hígado que codificaba a la enzima 5 α R, que, asimismo, se empleó la misma metodología para aislar un 5 α R humano por hibridación cruzada con una biblioteca de cDNA de la próstata (KONDO et al. 1994). Se observó que las dos proteínas de estudio presentaban diferentes propiedades biológicas frente a la finasterida. A partir de esto, fue posible postular que existe la presencia de dos isoenzimas 5 α R que posteriormente, fueron confirmadas por estudios hechos en pacientes con deficiencia de las 5 α R.

El primer cDNA, aislado de hígado de ratón, fue denominado gen 5 α R-1 (SRD5A1) y el segundo CDNA, aislado de próstata humana y encontrado defectuoso en pacientes con deficiencia de 5 α R, fue denominado 5 α R-2 (SRD5A2) (Russell y Wilson 1994a). De igual manera, con el desarrollo reciente de los análisis del perfil de expresión génica en todo el genoma, se ha identificado un tercer gen 5 α R-3 (SRD5A3) (Uemura et al. 2007)

Las isoenzimas 5 α R1 y 5 α R2 son enzimas asociadas a membrana, compuestas por 259 y 254 aminoácidos, respectivamente. Estas dos estructuras catalizan la misma reacción, asimismo, a nivel bioquímico comparten un nivel favorable de similitud aminoacídica. No obstante, es importante tener en cuenta, que estas isoformas se encuentran ubicadas en cromosomas diferentes, lo cual, a nivel bioquímico, pueden desempeñar roles distintos y expresarse en diferentes tejidos (Andersson y Russell 1990a; WILSON, GRIFFIN, y RUSSELL 1993)

La 5 α R1 y la 5 α R2 son codificadas por los genes SRD5A1 y SRD5A2, respectivamente. Aproximadamente, entre la misma especie comparten un 60% de

identidad en la secuencia aminoacídica, lo que es posible pensar que en algún momento las dos estuvieron ligadas a un precursor común durante su evolución. El gen SRD5A1 está localizado en el cromosoma 5p15 y codifica una proteína de 259 aminoácidos, asimismo, el gen SRD5A2 está localizado en el cromosoma 2p23 y codifica una proteína de 254 aminoácidos (Imperato-McGinley y Zhu 2002; Russell y Wilson 1994b). De igual manera, con los avances en el desarrollo en los análisis de perfil de expresión génica en todo el genoma, ha sido posible identificar un tercer gen, 5 α R3 (SRD5A3), localizado en 4q12. En este genoma se ha identificado una proteína de 318 aminoácidos, que posee un 19% de similitud con la 5 α R1 y un 20% de homología con la 5 α R2.

Tabla 1. Propiedades de las principales isoformas de la enzima 5 α -reductasa.

Propiedades	5αR-1	5αR-2
<i>Tamaño (aminoácidos)</i>	259	254
<i>Peso molecular (kDa)</i>	29.5	28.4
<i>pH ideal</i>	6-8.5	5-5.5
<i>Naturaleza bioquímica</i>	Hidrofóbico	Hidrofóbico
<i>Distribución tisular</i>	Hígado, piel, cerebro, ovarios, próstata, testículos	Próstata, vesícula seminal, piel genital, útero, mama, folículo piloso, placenta y testículos
<i>Expresión en próstata</i>	Normal en pacientes sin patología, alto en HBP y cáncer	Normal en pacientes sin patologías, alto en HBP y bajo en cáncer
<i>Nombre del gen</i>	SRD5A1	SRD5A2
<i>Ubicación del cromosoma</i>	5p15	2p23

Los datos tabulados fueron obtenidos de (Aggarwal et al. 2010b; Frye et al. n.d.)

Tanto la 5 α R1 y la 5 α R2 están expresadas a lo largo de la vida humana (Azzouni et al. 2012; Imperato-McGinley y Zhu 2002). La 5 α R1 es detectada en niveles bastantes bajos en cuero cabelludo fetal y en la piel no genital. En el caso de la 5 α R2 es expresada en la piel genital externa en el inicio de la gestación. Sin embargo, a medida que el individuo crece y llega a su etapa adulta, la ubicación y la concentración de estas dos isoformas cambia (Andersson y Russell 1990a; Kolesinska et al. 2014; Sinnecker et al. 1996). En adultos, se puede detectar la 5 α R1 en piel no genital, hígado, ciertas regiones del cerebro, también en niveles más bajos en la próstata, piel genital, vesículas seminales, testículos, glándula adrenal, riñón, y epidídimo (Batista y Mendonca 2020).

De igual manera, para entender por completo la importancia de la 5 α R y de su producto de reacción, y el rol que desempeña en el desarrollo de estas patologías, es necesario estudiar desde la deficiencia o mutación de ella misma. Thiele y colaboradores relataron que la deficiencia de la enzima 5 α R1 desempeña un papel crítico en la masculinización de hombres con carencia de 5 α R2 (Thiele et al. 2005).

A nivel específico, se ha detectado, a través de reacción inversa con cadena de polimerasa e hibridación *in situ*, mRNA de 5 α R1 y 5 α R2 en áreas glandulares de hiperplasia prostática benigna (Habib et al. 1998). También, se ha identificado que la isoenzima 5 α R1 se expresa predominantemente en células epiteliales, en cuanto, la 5 α R2 se expresa tanto en células epiteliales y estromales (Shirakawa et al. 2004). Igualmente, otros estudios han determinado la prevalencia de la 5 α R1 en pacientes con CaP, asimismo, han encontrado que los niveles de expresión de la 5 α R2 son

menores en CaP y neoplasia intraepitelial prostática (PIN) que en HPB (Thomas et al. 2005).

1.4. Inhibidores de la 5 α R

A nivel general, las alternativas que existen hoy en día para el tratamiento de la hiperplasia prostática benigna y el cáncer de próstata, van desde el uso de bloqueadores α , bloqueadores de la enzima 5 α -Reductasa, radioterapia, hasta cirugía, considerándose como última opción (McNaughton Collins 1997). Es importante aclarar que la selección del tratamiento se basa en: el tipo de patología, la severidad de los síntomas, tamaño y forma de la próstata y, por último, si existen antecedentes familiares. Se conoce que el objetivo de los inhibidores de 5 α R es bloquear la conversión de T a DHT (andrógeno más potente), provocando, una mayor concentración de testosterona en plasma (Upreti et al. 2014).

Los inhibidores de cadena esteroidal son frecuentemente usados para el tratamiento clínico de la hiperplasia prostática benigna, síntomas del tracto urinario inferior (STUI), además, han sido analizados en ensayos clínicos para la prevención, y tratamiento del cáncer de próstata. Por ejemplo, los azasteroides son esteroides químicamente alterados, productos de un cambio de un átomo de nitrógeno por uno de carbono en diferentes posiciones del anillo, capaces de inhibir la actividad de la 5 α R. Por ejemplo, la finasterida y la dutasterida, son compuestos activos que pertenecen al grupo 17 β -substituidos-4-azasteroides, unos de los más estudiados en la inhibición de las isoenzimas 5 α R (Aggarwal et al. 2010c) (**Figura 6**).

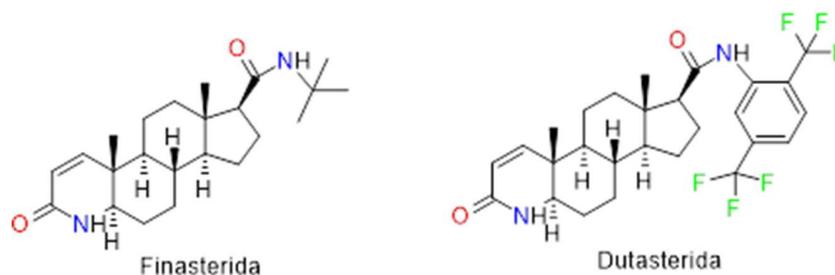
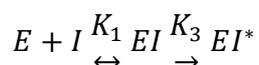


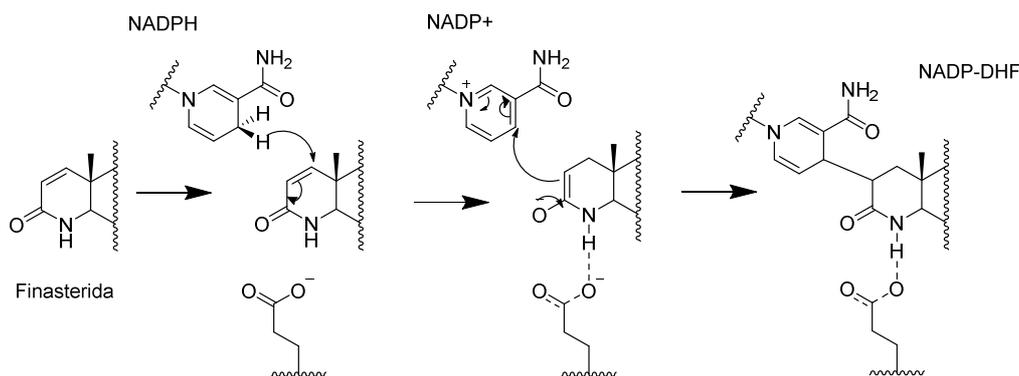
Figura 6. Estructura química de los inhibidores más comunes de la enzima 5 α reductasa.

Ambas drogas presentan características de inhibidores competitivos en experimentos cinéticos de corto plazo, sin embargo, en el análisis de reacciones de largo plazo exhiben características de inhibidores irreversibles debido a la formación de un intermediario muy estable. Las interacciones entre las isoenzimas 5 α R con los 4-azaesteróides se pueden describir en dos etapas, como se observa en el siguiente mecanismo



Siendo K_1 , la constante de inhibición para el equilibrio del primer paso (alcanzado rápidamente), y K_3 , la constante de velocidad para el segundo paso dependiente del tiempo (alcanzado lentamente) (Bull et al. 1996; Frye et al. n.d.)

Por ejemplo, se considera que la finasterida es un inhibidor competitivo irreversible de la 5 α R2, y todo se explica a través de mecanismo de inhibición enzimática. Antes que nada, se ha demostrado que el mecanismo de reacción de la T y de la finasterida son semejantes, excepto en dos reacciones que divergen en la etapa final, en la cual la finasterida evita la transferencia de protones (Bull et al. 1996). Se ha reportado el posible mecanismo de inhibición en la 5 α R2, el cual, se puede dividir en 3 pasos cruciales (**Esquema 2**):



Esquema 2. Mecanismo de inhibición de la finasterida.

En la primera etapa, el cofactor NADPH transfiere un hidruro al doble enlace delta 1, 2-eno presente en el anillo A de la finasterida, seguidamente el producto intermediario enolato (NADP-dihidrofinasterida (NADP-DHF)) se tautomeriza en el sitio activa de la enzima e induce a un producto más estable. Posteriormente, como último paso, se obtiene un substrato alternativo, NADP-DHF. Además, se puede evidenciar que la finasterida interacciona con el carboxilato del ácido glutámico (E57), beneficiando la interacción NADPH-finasterida (Xiao et al. 2020a).

La finasterida también es activa en la enzima 5 α R1, sin embargo, en una tasa menor en comparación de la 5 α R2 (Bull et al. 1996). Esto se entiende a partir de los resultados de la velocidad enzimática, la constante de Michaelis (K_m). Se ha analizado que la finasterida es menor que la testosterona, variando de 3 a 26 K_m y 10 a 30 K_m , respectivamente (Drury et al. 2009; Faller, Farley, y Nick 1993b).

De la misma manera, la dutasterida es un inhibidor dual de las dos principales isoformas de la enzima 5 α R (5 α R-1 y 5 α R-2). También, se considera parte del grupo de inhibidores competitivos irreversibles, por el complejo estable con ambas isoenzimas y la tasa baja de disociación (Bakshi et al. 1995; Roehrborn et al. 2002; Schmidt y Tindall 2011; Tindall y Rittmaster 2008).

No obstante, se ha confirmado la persistencia de algunos efectos adversos, de naturaleza sexual, provocadas por el uso de inhibidores de 5 α R, por ejemplo: disfunción eréctil y disminución de la lívido sexual, mismo después de la discontinuación de los inhibidores tradicionalmente de la 5 α R, por ejemplo, la finasterida (Corona et al. 2012; Gur, Kadowitz, y Hellstrom 2013; Traish et al. 2011) . Igualmente, dos estudios recientes han alertado a los médicos para qué informen a sus pacientes sobre los efectos adversos de esta terapia, a parte de los anteriormente mencionados arriba, como ginecomastia y ansiedad (Corona et al. 2017; Trost, Saitz, y Hellstrom 2013).

Con base en lo anteriormente mencionado, es necesario proponer nuevos compuestos activos, que disminuyan los efectos adversos causados por los medicamentos convencionales, que sean más selectivos, además, que presenten mayor actividad inhibitoria, en comparación de los reportados. Para esto, es necesario emplear nuevas metodologías en el desarrollo de fármacos, e incluir, estudios computacionales para así disminuir tiempo y costos en los ensayos de miles compuestos.

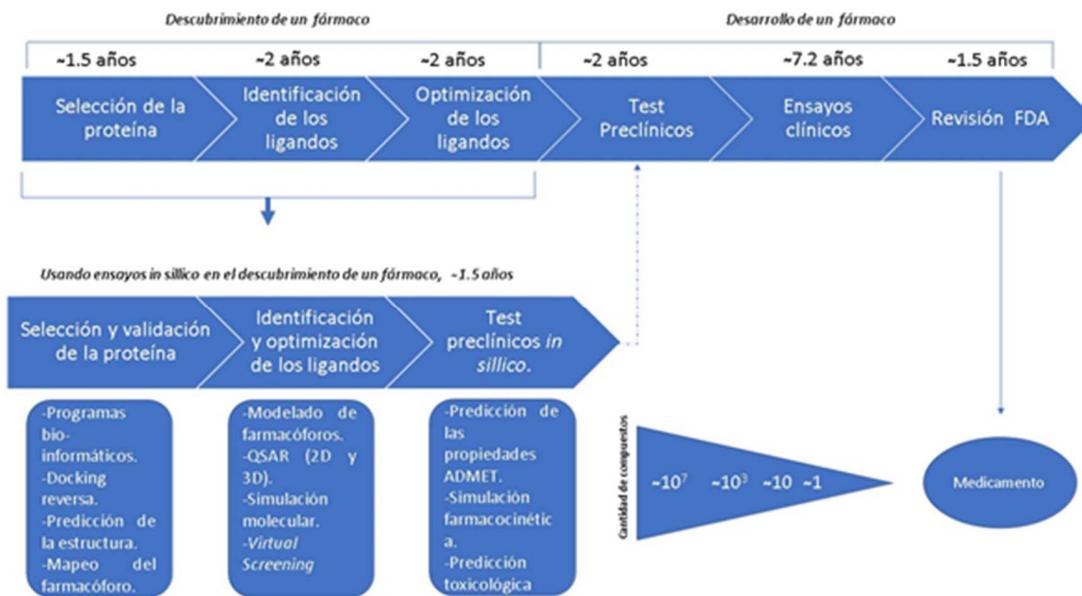
1.5. Desarrollo de fármacos

Se considera que el descubrimiento y desarrollo de fármacos convencionales es un proceso arriesgado, complejo y demorado, que aproximadamente dura entre 12-15 años. Esta metodología incluye desde la identificación y validación de la diana terapéutica, la optimización del compuesto principal y, por último, los test pre-clinico y clínicos (Tang et al. 2006)

De igual manera, proponer un nuevo fármaco e introducirlo al mercado, conlleva gastos exorbitantes y riesgos significativos, por ejemplo, en las dos últimas décadas, se estimó un gasto promedio de \$1.8 billones de dólares para el desarrollo de un medicamento (Myers y Baker 2001). Debido a eso, se ha incrementado el interés en el uso de computadoras para el desarrollo de nuevos ligandos, ya que, disminuye factores cruciales en el proceso del diseño racional de un fármaco.

El uso de métodos computacionales en el diseño de nuevos compuestos para un determinado blanco molecular se denomina comúnmente diseño de fármacos asistido por computadoras. La genómica, proteómica y bioinformática están descubriendo nuevos blancos terapéuticos, y contribuyendo cada vez en el descubrimiento de nuevos compuestos con mayor actividad (Drews 2000)

Asimismo, el diseño de fármacos asistido por computadoras (DiFAC), es una técnica atractiva y de interés por parte de las farmacéuticas, ya que, ayuda a mitigar los problemas de escala, tiempo y costos provocados por los métodos convencionales, tal como lo describe el esquema (**Esquema 3**).



Esquema 3. Ventajas en relación tiempo del uso de herramientas computacionales en el desarrollo de un medicamento.

Cabe resaltar, que antes de descubrir un nuevo fármaco es importante estudiar y entender las patologías bajo ciertas consideraciones, asimismo, se deben de esclarecer las posibles causas de la enfermedad e identificar los posibles bancos moleculares de interés. Por ejemplo, se debe de tener cuál tipo de diana terapéutica es, ya que, puede intervenir varias estructuras, como: receptores, proteínas, enzimas hasta cadenas de ácido ribonucleico (ARN).

El DiFAC, está compuesto por diferentes pasos de refinación, que van desde, la identificación computacional de potenciales dianas terapéuticas, *virtual screening*, optimización de los candidatos, evaluación de las propiedades ADME-T a través de métodos computacionales, acoplamiento molecular y simulaciones moleculares (**Figura 7**). Todo con el fin de reducir el número de compuestos candidatos a ser examinados experimentalmente.

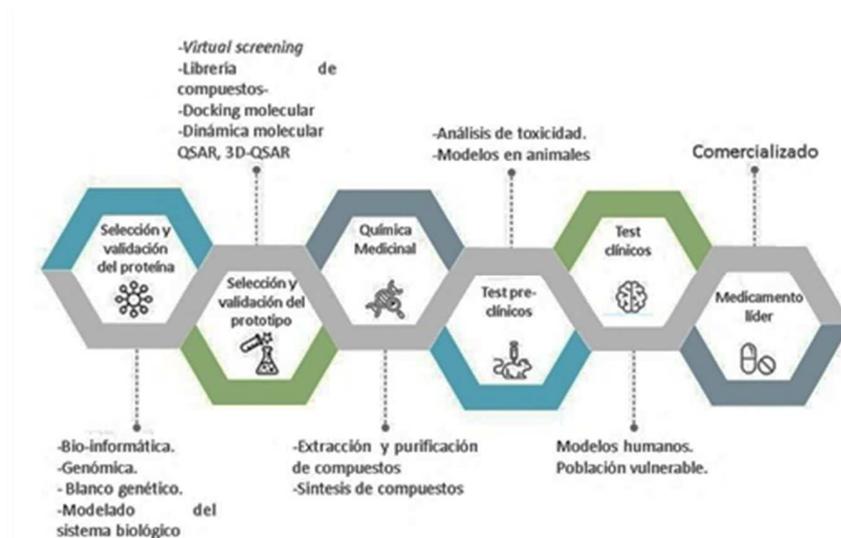


Figura 7. Herramientas y técnicas modernas en el desarrollo computacional de fármacos.

El objetivo general del diseño computacional de fármacos, es aprovechar las diferentes fuentes de información para facilitar el desarrollo de nuevos compuestos capaces de modelar el comportamiento de diferentes dianas terapéuticas. Los abordajes computacionales se clasifican, generalmente, en dos familias; métodos basados en ligandos y métodos basados en estructura (Prada-Gracia, Huerta-Yépez, y Moreno-Vargas 2016).

Ahora, en todos los métodos, es necesario hacer un pre-filtrado de los compuestos líderes basándonos en los resultados de sus propiedades físicas y farmacocinéticas. Por ejemplo, los métodos basados en ligandos, usan la información de la actividad biológica de compuestos ya reportados, para así, proponer nuevas moléculas químicas con un comportamiento similar. En otras palabras, se realiza una búsqueda y se comparan las actividades biológicas de los ligandos, con base en la relación estructura-actividad (Mishra y Siva Prasad 2011).

Los métodos basados en estructura dependen de relación de la información estructural reportada, ya que usan la estructura del receptor para explorar el espacio

y ambiente químico de la estructura y así, identificar ligandos capaces de unirse al sitio de unión de dicho receptor (Kuntz 1992; Sperandio et al. 2006)

Actualmente, la combinación de métodos basados en ligandos y estructura, se ha convertido en una metodología común en el *virtual screening*. Por ejemplo, una aproximación de esta dualidad de estos métodos, es el acoplamiento molecular del modo de unión al receptor. Otra aproximación, es la construcción de modelos farmacofóricos, teniendo presente tanto las características de compuestos con actividad biológica reportada como del sitio activo, especialmente si existe un complejo proteína-ligando cristalizado.

1.5.1. Modelado de proteínas

Cuando se llevan a cabo estudios de DiFAC, basados en una diana terapéutica, es indispensable poseer un receptor caracterizado y validado estructuralmente, independientemente de ensayos experimentales o mediante el uso de herramientas computacionales o *in silico*.

Una de las limitantes en el diseño de un fármaco basado en la diana terapéutica, es la ausencia de algunas estructuras 3D. Sin embargo, gracias al surgimiento, de los programas de cómputo desarrollados en modelado molecular, y los avances en la investigación del genoma humano, ha sido posible identificar receptores de interés, lo que ha conllevado a conocer, identificar y asignar un gran número de blancos moleculares para el descubrimiento y desarrollo de fármacos (Escalona et al. 2005).

Como es bien sabido, la función de una proteína está determinada por su estructura tridimensional, sin embargo, conocer su conformación tridimensional es un proceso

que requieren de mucho tiempo y dinero. El proceso va desde el desarrollo de expresiones protéicas, purificación, cristalización y, por último, determinación de la estructura (Pitman y Menz 2006).

La elucidación estructural de una proteína se puede agrupar en dos grandes clases:

- a. Predicción de la estructura secundaria,
- b. Predicción de la estructura terciaria.

La predicción de la estructura secundaria pretende localizar e idealizar plegamientos α -hélice o de hoja β -plegada, a partir de segmentos aminoacídicos de interés (Leach, 2001). Ahora, la predicción de la estructura terciaria intenta modelar una estructura con actividad biológica (Cao et al. 2015).

Como el objetivo del presente trabajo es modelar la estructura tridimensional de la 5 α R-1, es necesario explicar en qué consiste esta última predicción. Por ende, en la predicción de la estructura nativa de la proteína, se emplean tres técnicas principales:

- a. Modelado por homología u homología de proteínas,
- b. *Threading* o plegamiento,
- c. Predicción estructural *de novo*,

Sin embargo, en este apartado se dará una breve explicación del modelado por homología, ya que nuestro interés de estudio está inclinado en esta metodología

Como anteriormente se mencionó, la estructura tridimensional de una proteína dependerá de su secuencia aminoacídica, siendo así el primer paso para la predicción estructural, tal como se observa en la siguiente figura.

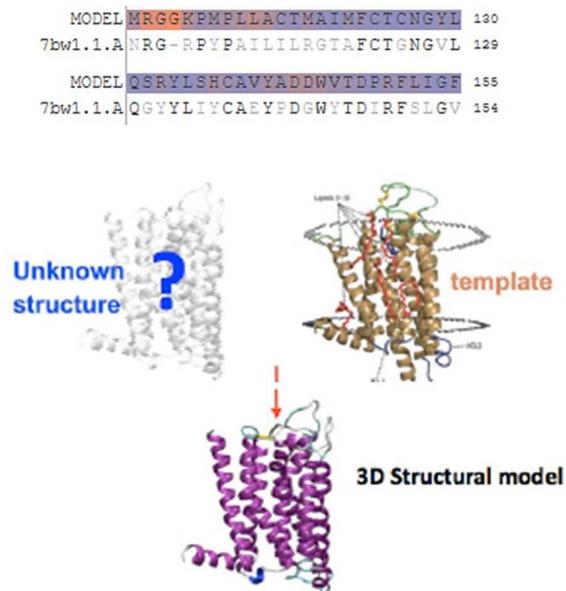


Figura 8. Pasos del proceso de modelado de proteínas. Tomado de Chandramore 2017

El modelado por homología consiste en la modelación de un molde de una proteína, de la cual no se conoce su estructura 3D, a partir de su secuencia aminoacídica (estructura primaria) y una estructura tridimensional de una proteína homóloga (*template*). Este modelado se basa en qué proteínas relacionadas evolutivamente tienen secuencias similares y estructuralmente son similares (Pitman y Menz 2006). Por consiguiente, sus estructuras tridimensionales son similares, puesto que, secuencias de aminoácidos similares se pliegan de forma similar (Krieger, Nabuurs, y Vriend 2003).

Durante el modelado de homología, existen cuatro etapas importantes; la primera, se concentran en la secuencia aminoacídica; identificación y obtención de esta misma. En la segunda etapa, la secuencia conocida se alinea con sus homólogos, para observar la similitud de las mismas. En la tercera, se generan coordenadas 3D del modelo tridimensional, empleando la plantilla de la estructura depositada en la

base de datos. Por último, el modelo se optimiza utilizando técnicas de dinámica molecular.

Normalmente, este proceso se repite tantas veces sea necesario con fin de obtener una estructura tridimensional adecuada (Pitman y Menz 2006). Además, es posible validar el molde del blanco molecular con base en resultados experimentales observados.

Cabe resaltar que este método es posible usarlo, cuando la proteína desconocida y el *template* de la proteína empleada comparten más del 30% de identidad en su secuencia o estructura primaria (Abbaszadegan et al. 2013). Cuando no, se recurre a emplear los otros métodos de modelado anteriormente mencionado, *threading* y *de novo* (Kalyaanamoorthy y Chen 2014)

1.5.2. Propiedades ADME-T

El efecto terapéutico de un medicamento exitoso no depende apenas de la actividad biológica, también depende de un óptimo perfil en referencia a sus propiedades ADME-T. Las sigas ADME-T, hacen referencia a cada una de las iniciales de cada parámetro, farmacocinético y farmacodinámico, medible: Absorción, Digestión, Metabolismo, Excreción y Toxicidad.

Hoy en día no se requiere realizar ensayos *in vitro* e *in vivo* de la actividad biológica de ciertos compuestos químicos, todo gracias al desarrollo de algoritmos capaces de predecir las propiedades medibles en estos ensayos preclínicos y clínicos. Los ensayos *in silico* de las propiedades ADME-T son capaces de dictar el éxito clínico de los fármacos en los ensayos clínicos (Adelusi et al. 2022a).

Varios programas de software han sido desarrollados para predecir las propiedades ADME-T de candidatos a medicamentos. Un ejemplo de estos es el programa QUIKprop que está diseñado para predecir propiedades como solubilidad, membrana, coeficientes de partición, interacción a proteínas plasmáticas, formación de metabolitos y penetración a la barrera hematoencefálica (BHE) (Mandal, Moudgil, y Mandal 2009). De igual manera, existen otros programas predictores de estas propiedades, tales como OSIRIS (Cruciani et al. 2005), SwissADME (Daina, Michielin, y Zoete 2017), ADMETlab (Dong et al. 2018).

Los parámetros toxicológicos son principalmente en términos de carcinogenicidad, mutagenicidad, efectos reproductivos y acidez en el sistema gastrointestinal. En la actualidad, es posible usar bases de datos y algoritmos capaces de predecir el potencial toxicológico de nuevas moléculas en el DiFAC (Contrera et al. 2005)

1.6. Acoplamiento molecular

La bioinformática es una rama de la biología y de las ciencias computacionales que se dedican a adquirir, almacenar, analizar y divulgar la información de interés biológico, frecuentemente en tópicos de secuencias de ADN y aminoácidos.

Los primeros métodos de acoplamiento molecular se basan en la suposición del modelo llave-cerradura, propuesta por Fischer, tal como se observa en la figura 9.

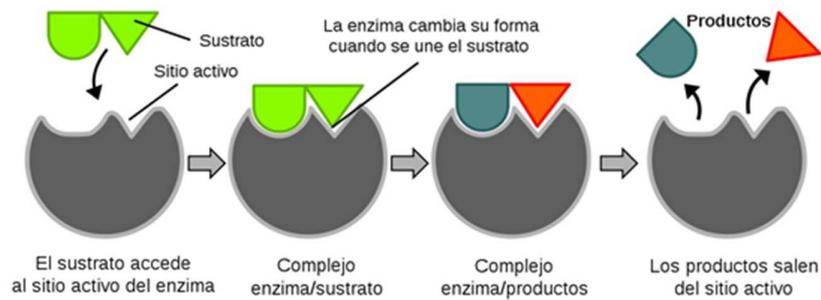


Figura 9. Modelo de llave-cerradura propuesto por Fischer. Tomado de: TimVickers, vectorized by Fvasconcellos.

Este modelo postula, o indica, que tanto el ligando como el receptor pueden ser manipulados como cuerpos rígidos, y la afinidad que presentaban, eran directamente proporcional a un ajuste geométrico entre sus formas (Mezei 2003). Sin embargo, este postulado fue desmentido por Koshland y colaboradores, quienes sugirieron que: “*el ligando y el receptor deben de ser considerados como cuerpos flexibles durante el acoplamiento*” (Hammes 2002; Koshland 1963).

Hoy en día, el acoplamiento molecular o “*docking molecular*”, es una técnica que predice un complejo dado entre dos o varias moléculas, cuyo fin es encontrar la mejor pose del ligando, dentro de un complejo, de mínima energía global o de acoplamiento (**Figura 10**). Este tipo de técnica requiere de dos componentes principales: la búsqueda y la evaluación de las especies.



Figura 10. *Proceso común de anclaje de proteína-ligando en un acoplamiento molecular.* Tomado de (Brás et al. 2014)

El término búsqueda se refiere a la exploración del espacio configuracionales accesible para el ligando dentro del receptor, y el objetivo de ella, es predecir un sitio de mayor afinidad entre el receptor, es decir la el blanco molecular, y el ligando. Ahora, en la etapa de evaluación, se refiere a la asignación de un valor numérico a cada una de las configuraciones generadas durante la etapa de búsqueda, un “*scoring*” basado en algoritmos (Gill et al. 2016)

El acoplamiento molecular de ligandos ha sido empleado en el desarrollo de medicamentos en los últimos años (Bottegoni 2011), ya que se pueden realizar cálculos rápidos y obtener información de la predicción de la interacción del ligando con algún tipo de blanco molecular relacionado a una enfermedad. En la actualidad hay más de 60 herramientas y programas de encaje diferentes, que han sido desarrollados para uso académico y comercial, como LigandFit (Venkatachalam et al. 2003), AutoDock (Österberg et al. 2002), FlexX (Rarey et al. 1996), Surflex (Jain 2003), GOLD (Jones et al. 1997). Entre los programas mencionados, AutoDock Vina, Gold, MOE-Dock y AutoDock, han mostrado mejores resultados y puntuaciones más acordes (Pagadala, Syed, y Tuszynski 2017).

1.7. Dinámica molecular

La dinámica molecular (DM) son aproximaciones basadas en mecánica molecular, que consiguen resolver la ecuación de movimiento de Isaac Newton, teniendo en cuenta expresiones matemáticas que representan las fuerzas intramoleculares y las interacciones intermoleculares. A nivel general y biológico, se considera un método físico que estudia la interacción y movimiento de sistemas moleculares en función del tiempo, considerando todas las variables en el modelado biológico, desde el ligando hasta la presencia de iones salinos o moléculas de agua. Las simulaciones de dinámica molecular son capaces de enfrentar el desafío existente en el acoplamiento molecular. Por ejemplo, la DM actúa como un microscopio molecular que puede ser usado para inspeccionar la estabilidad de los ligandos en el sitio catalítico de la proteína, lo que es crucial para validar y fundamentar los resultados previstos en el acoplamiento molecular (Adelusi et al. 2022b).

El objetivo de las simulaciones de DM es la recreación del comportamiento de moléculas de naturaleza biológica y química en su entorno fisiológico teórico. Bajo este tipo de modelo es posible analizar los cambios conformacionales de las proteínas, los perfiles de interacción entre receptor-ligando y una valoración mejor de la energía libre del sistema (Adcock y McCammon 2006). Además, los métodos de DM pueden revelar cambios en las características estructurales de sistemas receptor-ligando que no son observables en modelos estáticos (Sippl 2000). Con base en esto, se ha convertido en una técnica madura con el beneficio de permitir comprender las relaciones estructura-función. En la actualidad las simulaciones se acercan a tiempos biológicamente relevantes.

2. Justificación y planteamiento del problema

El cáncer de próstata (CaP) es el segundo tipo de cáncer más común en la población mundial, aproximadamente, se han reportado 1.414.259 nuevos casos en hombres estadounidenses en el 2020 (Sung et al. 2021b) y se estima que para el 2022 se reporten cerca de 268.490 nuevos casos y 34.500 muertes (*American Cancer Society*), en personas adultas, ya que, la incidencia de esta patología aumenta con el incremento de la edad en los hombres. Adicionalmente a estas estadísticas, en Colombia se han estimado que 47 de cada 100.000 habitantes masculinos padecen de cáncer de próstata, siendo así, la neoplasia con mayor incidencia en la población masculina colombiana (Ministerio de Salud-Colombia, 2021). Igualmente, la hiperplasia prostática benigna (HPB) es una patología que afecta directamente a la próstata, y también aumenta con relación al incremento de la edad masculina (Michael Ng et al., 2021). No obstante, una diferencia notoria entre estas dos enfermedades, es crecimiento del tejido testicular. Sin embargo, son consideradas enfermedades hormono-dependientes, lo cual, hace posible controlarlas y tratarlas con diferentes tratamientos duales.

Dentro de las opciones de tratamiento desarrolladas para disminuir el crecimiento anormal de la próstata, se resaltan los bloqueadores de la enzima 5 α -reductasa, gracias a su baja agresividad. Sin embargo, los bloqueadores reportados de esta enzima, por ejemplo: la finasterida, la Dutasterida, Tamsulosina, conllevan efectos secundarios perjudiciales al estilo de vida de un hombre adulto, como: calvicie, pérdida del apetito sexual, y disfunción eréctil, además, no son totalmente selectivos

y son relativamente costosos, lo cual perjudica directamente el estilo y calidad de vida del paciente.

Con base en lo expresado anteriormente, no cabe duda de que: en la actualidad es necesario proponer un nuevo set de posibles fármacos; con mayor selectividad, y menores efectos secundarios, y que adicionalmente, sean económicos para su respectiva comercialización y distribución. Por lo tanto, en este proyecto de investigación se realizó un estudio racional de inhibidores de la enzima 5 α -reductasa tipo 1, en el cual se harán uso de herramientas computacionales, puesto que, este tipo de metodología ha sido implementada por su gran potencial para acelerar el descubrimiento de fármacos en términos de tiempo, mano de obra y costos.

3. Objetivos

3.1. *Objetivo general*

- Proponer un nuevo grupo de inhibidores de la proteína 5 α -reductasa I utilizando el enfoque de diseño basado en el receptor a través de un modelo por homología.

3.2. *Objetivos específicos*

- Construir y validar la estructura tridimensional de la 5 α R1, utilizando las estrategias de diseño por homología, acoplamiento molecular y dinámica molecular.
- Construir un set de compuestos esteroidales para ser estudiados a través de acoplamientos y dinámicas moleculares.
- Identificar las características estructurales que favorecen la inhibición de la enzima 5 α R1.

4. Metodología

Es importante mencionar que, al día de hoy, no ha sido posible determinar la estructura tridimensional de la proteína 5 α R1. Por ende, para llevar a cabo cualquier estudio bioinformático con esta diana terapéutica, es necesario, construir y validar su estructura 3D, a través del modelado de proteínas por homología.

En primer lugar, se identificó la secuencia aminoacídica (BLAST) de la proteína 5 α R1 humana, la cual se encuentra depositada en el sitio web UNIPROT con código P18405 (<https://www.uniprot.org/uniprot/P18405>). Seguidamente, para la obtención de la estructura tridimensional de la 5 α R1 humana, se usó el servidor de SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>), donde se depositó la secuencia aminoacídica y se realizó la búsqueda de los diferentes moldes. La elección del modelo y el diseño tridimensional con base en la estructura tridimensional la isoforma 2, la cual está depositada en la *Protein Data Bank*, con código 7bw1 (<https://www.rcsb.org/>), adicionalmente se empleó el servidor de PSIREN para comparar los posibles plegamientos estructurales.

Seguidamente, se analizó y se comparó la estructura 3D modelada con una diseñada por inteligencia artificial, a través de gráficos de Ramachandran. Posteriormente, se realizó una minimización de energía de la proteína modelada, empleando el algoritmo (*steepestdescent*). El sistema se equilibró por 200 ns de dinámica molecular utilizando el protocolo de NVT y NPT, implementando el termostato *Berendsen* y el barostato *Parrinello-Rahman*, respectivamente. Finalmente, el archivo de salida "output", se analizó, nuevamente, por diagrama de Ramachandran.

Conviene destacar que se empleó el paquete de GROMACS y campo de fuerza AMBER99SB-ILDN y modelo de agua TIP3-P proporcionado por el servidor gratuito NMRBox (<https://nmrbox.org/>), para realizar las respectivas dinámicas moleculares.

Finalmente, la estructura 3D se sometió a ensayos de acoplamiento molecular y dinámica molecular con ligandos con actividad inhibitoria reportada, con el fin, de validar la estructura diseñada.

4.1. Diseño y preparación de los ligandos

A partir del ácido androsta-3,5-dieno-3 carboxílico se diseñó un grupo de 48 ligandos de interés, realizando cambios racionales en el anillo A y anillo D del esqueleto esteroideal. En el diseño de cada uno de ellos, se empleó un método moderno llamado reemplazo bioisostérico, en el cual fue realizado del servidor gratuito SwissBioisoster (<http://www.swissbioisostere.ch/>) (Cuozzo et al. 2022; Wirth et al. 2013).

Las estructuras tridimensionales de cada ligando fueron construidas y convertidas en formato .pdb, a través de las herramientas del software ChemSketch, teniendo en cuenta el estado de protonación que presenta cada una a un pH fisiológico (pH=7). Seguidamente, se optimizaron las estructuras empleando los programas de ChemSketch y Chimera.

Posteriormente, se empleó el software MGLTools 1.5.4 para detectar de manera automática los centros de torsión, enlaces rotables de cada uno de los ligandos

Las estructuras preparadas fueron extraídas y guardadas en formato PDBQT.

4.2. Preparación de la proteína

En este apartado, se usó el receptor construido y validado en el apartado superior. Seguidamente, se empleó la misma interfaz de MGLTools para la realización de la preparación de la diana terapéutica previamente al acoplamiento molecular. Además, se asignaron las cargas atómicas de *Gasteiger-Marsili*, fusionando los hidrógenos no polares en los carbonos adyacentes y se empleó el tipo de átomo A4D.

4.3. Evaluación *in silico* de las propiedades ADME-T

A través del software gratuito de SWISS-ADME (<http://www.swissadme.ch/>), se evaluaron las propiedades farmacocinéticas, tales como la absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME) de cada uno de los ligandos de interés (Daina, Michielin, y Zoete 2017b). Por ejemplo, se estimaron los perfiles de; absorción gastrointestinal, inhibición en diferentes citocromos, tales como CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, permeabilidad de la barrera hematoencefálica, y algunas reglas de semejanza de fármacos como; la regla de Lipinski, Eggen y entre otras.

Además, se establecieron parámetros fisicoquímicos de interés, tales como; peso molecular (MW), área superficial accesible al solvente, área de superficie polar total (PSA), número de enlaces de hidrógeno (#H-Bonds), predicciones de coeficientes de reparto octano/agua (Log Po/w), solubilidad y entre otros.

4.4. Acoplamiento molecular

Con el objetivo de evaluar los modos de unión de los compuestos seleccionados en el sitio catalítico de la proteína 5 α R1 se empleó el programa AutoDock4.2 (Morris,

G. M et al. 2009). Las preparaciones de los archivos de entrada para ejecutar el acoplamiento molecular se llevaron a cabo en el programa de AutoDockTools.

En primer lugar, se generó el correspondiente *grid* con unas dimensiones de 60x60x60 puntos (X, Y, Z), con un espacio de punto de 0.375Å. Además, se mapearon todos los aminoácidos y se adicionó cada uno de los heteroátomos, como Bromo (Br), Flúor (F), Azufre (S), Cloro (Cl), en el archivo de salida del respectivo *grid*.

Posteriormente, se empleó el algoritmo genético Lamarckiano (LGA), estableciendo 20 corridas, 2.5×10^7 evaluaciones y 2.7×10^4 generaciones, para realizar en cada uno de los acoplamientos moleculares.

Por último, se extrajeron las poses que presentaron los valores más favorables de acoplamiento y a su vez, la menor distancia entre el sistema alfa, beta insaturado del ligando con el cofactor, NADPH. Cada una de las estructuras fue visualizada y convertida en formato .pdb a través del servidor de Pymol (Schrödinger, LLC).

4.5. Dinámica molecular

Las dinámicas moleculares de los complejos proteína-cofactor-ligando fueron realizadas en el servidor gratuito de NMRBox, que ofrece diferentes herramientas de química computacional, como dinámica molecular y entre otras.

La preparación y parametrización de cada uno de los ligandos, previo a la dinámica molecular, se llevó a cabo usando el servidor gratuito de Bio2Byte (Win Vranken), en el cual se empleó el método semi-empírico SQM de ACPYPE, para cada molécula de interés.

Posteriormente, se realizaron dinámicas moleculares de 100.000 ps, de los complejos proteína-cofactor-ligando, usando el paquete de GROMACS y campo de fuerza del tipo (AMBER-99SB-ILDN), con un modelo de agua de tres puntos TIP3-P e iones de Sodio (Na^+) y Cloro (Cl^-) para la respectiva neutralización del sistema. Además, se empleó un ensamble canónico y condiciones de frontera periódicas.

Una vez fueron concluidas las simulaciones, se extrajeron los RMSD (*root-mean-square-deviation*) de cada dinámica molecular, aparte, se calculó la energía libre de interacción de los últimos 20000 ps de cada dinámica molecular, utilizando en método MMPBSA (Genheden and Ryde 2015).

Se debe aclarar qué: en la modelación del sistema biológico se tuvieron en cuenta los siguientes parámetros; pH fisiológico, concentración salina (0.15M), condiciones de presión y temperatura estándar (1 bar y 300 K) entre otras.

5. Resultados y análisis

5.1. Modelado de homología

Se extrajo la secuencia de aminoácidos (**Tabla 2**) de la base de datos UniProt (Bateman et al. 2021) para la construcción del modelo tridimensional de la enzima 5 α -reductasa tipo 1 (5 α R-1). Esta fue identificada como “3-oxo-5- α -steroid-4-dehydrogenase 1” (Andersson y Russell 1990b) con código P18405 UniProtKB. Cabe mencionar que esta secuencia aminoacídica pertenece a la especie *Homo Sapiens* y consta de 259 aminoácidos.

Tabla 2. Secuencia de aminoácidos de la enzima 5 α -reductasa tipo 1 humana “3-oxo-5- α -steroid 4-dehydrogenase 1”

Formato de archivo **Secuencia de aminoácidos de la enzima 5a-reductasa tipo 1**

Fasta	<pre>>sp P18405 S5A1_HUMAN 3-oxo-5-alpha-steroid 4-dehydrogenase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SRD5A1 PE=1 SV=1 MATATGVAEERLLAALAYLQCAVGC AVFARNRQTNSVYGRHALPSHRLRVPARA AWWVQEL PSLALPLYQYASESAPRLRSAPNCILLAMFLVHYGHRCL IYPFLMRGGKPMPL LACTMAIMFCT CNGYLQSRYL SHCAVYADDWVTDPRFLIGFGLWLTGMLINI HSDHILRNLRKPGD TGKIPRG GLFEYVTAANYFGEIM EWCGYALASWSVQGA AFAFFTCFLSGRAKEHHEWYLRKFEEY PKF RKIIIPFLF</pre>
-------	--

Al tener identificada la secuencia aminoacídica de la isoenzima 5αR-1, se procedió a alinear la secuencia en la base de datos del programa de *SwissModel* (Waterhouse et al. 2018). El cual identificó 4 posibles modelos de la estructura tridimensional, dos modelos similares pero basados en dos diferentes métodos de búsqueda. Los resultados se observan en la siguiente tabla

Tabla 3. Resultados del alineamiento aminoacídico de la enzima 5αR1.

Molde o plantilla	Identidad aminoacídica	Métodos de búsqueda	Método	Resolución	Calidad del molde	Referencia
7bw1	48.80	HHblits	Rayos X	2.80Å	0.97	3-oxo-5-alpha-steroid 4-dehydrogenase 2
7c83	41.04	HHblits	Rayos X	2.80Å	0.97	3-oxo-5-alpha-steroid 4-dehydrogenase
7bw1	54.05	BLAST	Rayos X	2.80Å	0.86	3-oxo-5-alpha-steroid 4-dehydrogenase 2
7c83	45.53	BLAST	Rayos X	2.80Å	0.91	3-oxo-5-alpha-steroid 4-dehydrogenase

Como se observa en la tabla 3, tanto la secuencia aminoacídica de la isoforma 5αR-2 y 5αR, propuesta por los métodos de búsqueda *HHblits* (Steinegger et al. 2019) y *BLAST* (Camacho et al. 2009), son similares a la secuencia de aminoácidos de interés, sin embargo, es importante tener en cuenta que el modelo 7c83 es una estructura cristalina de un organismo no humano (Y. Han et al. 2021).

A pesar de identificar varios modelos, se seleccionó el molde 7bw1 obtenido de la base de datos de *HHblits*, como plantilla base, y esto se debe a los resultados relacionados a similitud aminoacídica y a la calidad del molde.

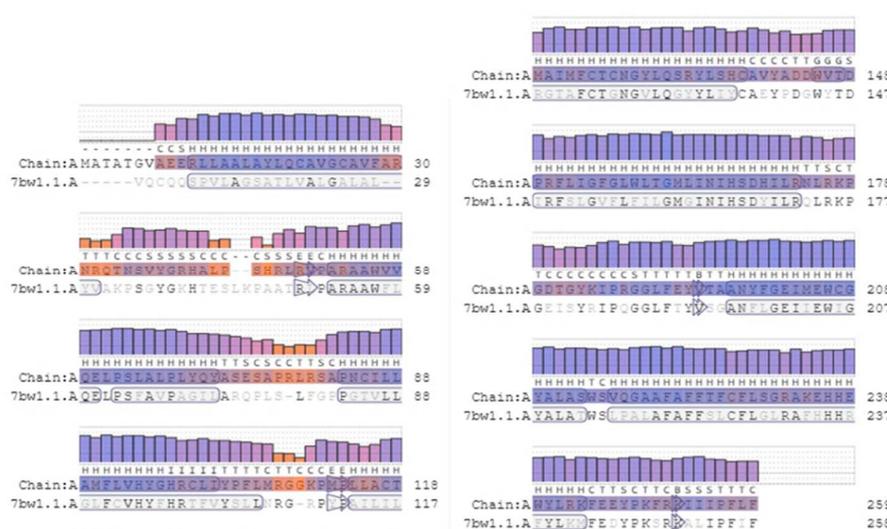


Figura 11. Evaluación y comparación de la secuencia aminoacídica 5R1 con su molde base. Obtenido por el programa *SwissModel*)

Como se observa en la figura 11, el método de búsqueda *HHblits* identificó que el inicio de las secuencias aminoacídicas no era similar, sin embargo, se aprecia que después del aminoácido 31N, existe una gran similitud y repetición de algunos aminoácidos entre las dos cadenas, un claro ejemplo de la semejanza proteica de las isoformas. Por otro lado, las barras observadas son índices de confianza, siendo los colores naranja-rosados un resultado de confianza bajo y los colores azules-

morados un dato de gran confiabilidad. Se identificó que la mayoría, casi un 79%, de los residuos mostraban una confiabilidad de datos en el modelo diseñado.

Además, fue posible extraer el posible plegamiento de su estructura secundaria con base en los resultados observados en la misma figura 11. Se identificó que las letras que están entre el medio del diagrama de barras y la cadena A (secuencia aminoacídica de la 5aR1) representan el tipo de plegamiento que sufre cada cadena aminoacídica en la estructura tridimensional.

Tabla 4. Representación de cada letra obtenida de la predicción estructural proteica de segundo nivel de la 5aR1.

Letra	Plegamiento
<i>B</i>	Residuo en el puente β aislado
<i>C</i>	Loop o irregular
<i>E</i>	Posible plegamiento β
<i>G</i>	3-hélice
<i>H</i>	Alfa-hélice
<i>I</i>	5-hélice
<i>T</i>	Espiral ligada a hidrógeno
<i>S</i>	Curva

Con base en la información de tabla 4 y la figura 11, se identificó que la mayoría de aminoácidos están plegados de manera alfa-hélice y de igual forma, existe la probabilidad de tener hojas beta-plegadas, indicándonos una posible estructura tridimensional tradicional. Sin embargo, no es posible asegurar este tipo de plegamiento basándonos en un único resultado, por ende, de manera adicional, se

identificó otro el posible plegamiento a través de un programa bio-informático alternativo, PSIPRED (Buchan y Jones 2019).

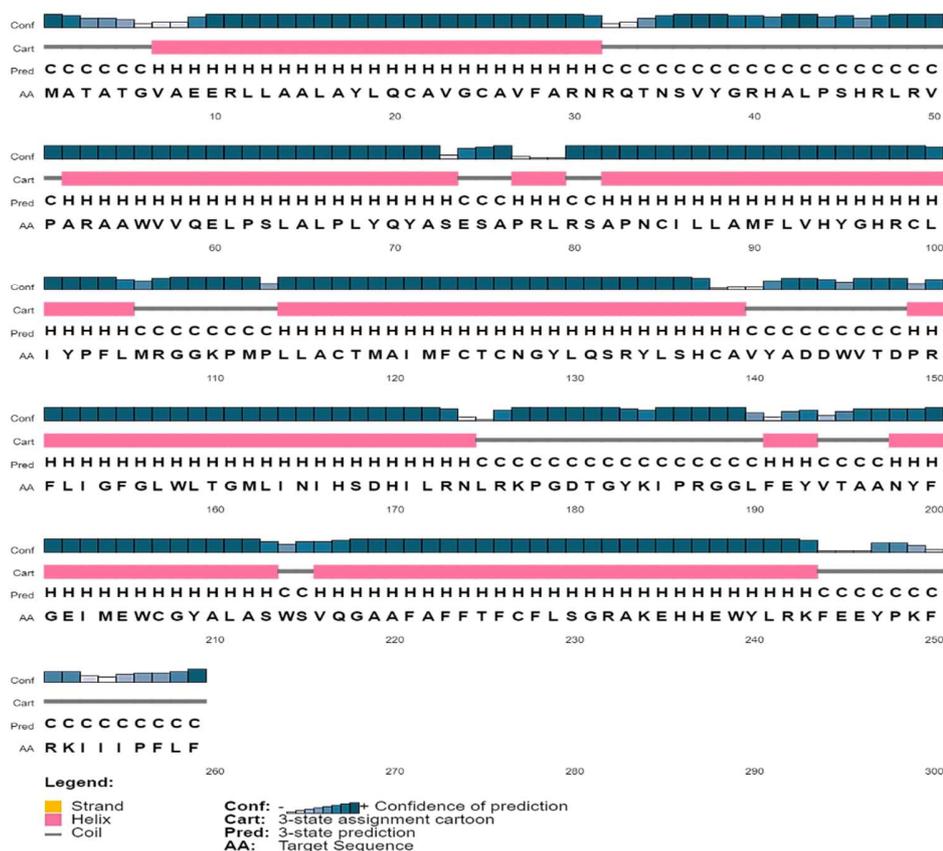


Figura 12. Predicción de la estructura secundaria de la enzima 5 α -reductasa tipo 1 humana. Obtenida con el programa PSIPRED.

De igual manera, se pudo observar que los niveles de confianza predichos anteriormente, son similares a los obtenidos en el servidor PSIPRED, asimismo, se calcularon los posibles plegamientos de la estructura secundaria, siendo el plegamiento alfa-hélice el modo estructural más reproducible.

Con base en esto, es posible elucidar una estructura tridimensional en gran proporción con plegamientos alfa-hélices y algunos plegamientos del tipo β . La

estructura obtenida a través del modelado por homología se observa en la figura 13.

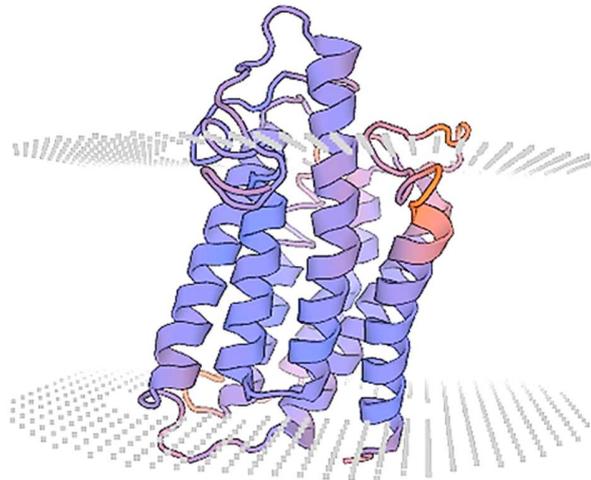


Figura 13. Predicción de la estructura terciaria de la enzima 5 α -reductasa tipo 1 humana. Obtenida con el programa SwissModel.

Tal como relataron los resultados obtenidos en la identificación del plegamiento proteico, se puede observar que la estructura tridimensional de la figura 13, en su gran porcentaje está plegada de manera alfa-hélice, con algunos plegamientos tipo beta y varios *loops*. Además de esto, se puede identificar que la estructura tridimensional de la enzima 5 alfa-reductasa tipo 1, presenta: 7 hélices tipo α , algunos *loops* y uno que otro plegamiento β .

Seguidamente, para afianzar el modelo obtenido por el servidor de SwissModel, se realizó un análisis de distribución de ángulos de torción, a través de un diagrama de *Rammachyran* (Ver figura 14) y se comparó la estructura 3D de la 5 α R1, modelada por homología, con una estructura 3D proteica obtenida por un servidor alternativo, *AlphaFold* (Jumper et al. 2021).

El programa bioinformático *AlphaFold* es un sistema de ingeniería artificial, desarrollado por *DeepMind*, que provee la estructura tridimensional de una proteína a partir de su secuencia de aminoácidos. Además, *AlphaFold* es capaz de producir cadenas laterales altamente precisas cuyo el *backbone* es altamente preciso y mejora considerablemente en relación a los métodos basados en modelo.

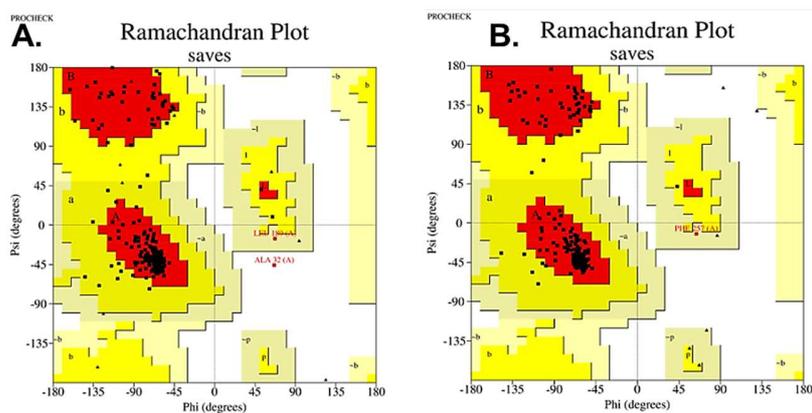


Figura 14. ^{a.} Diagrama de Ramachandran del modelo 3D de la 5αR1, diseñado por *SwissModel*. ^{b.} Diagrama de Ramachandran del modelo 3D de la 5αR1, diseñado por *AlphaFold*. Obtenidos de UCLA

Se observó que el modelo por *SwissModel* obtuvo un 90.5% de *scoring* y el modelo de *AlphaFold* un 95.6% de *scoring*, y cada uno obtuvo un valor de desviación máxima de: 4.0 y 4.8, respectivamente. Asimismo, se observó que los dos modelos presentaron los siguientes parámetros en común: mayor porcentaje de combinaciones alfa-hélice en la zona permitida y pocas combinaciones del tipo beta-hélice. Además, se observó que el modelo obtenido por *AlphaFold* violó menos zonas permitidas en comparación del modelo obtenido de la 5α-reductasa tipo 1. Con base en esto, el modelo obtenido por *SwissModel* se sometió a una minimización de energía, y a una última evaluación de *Ramachadran*.

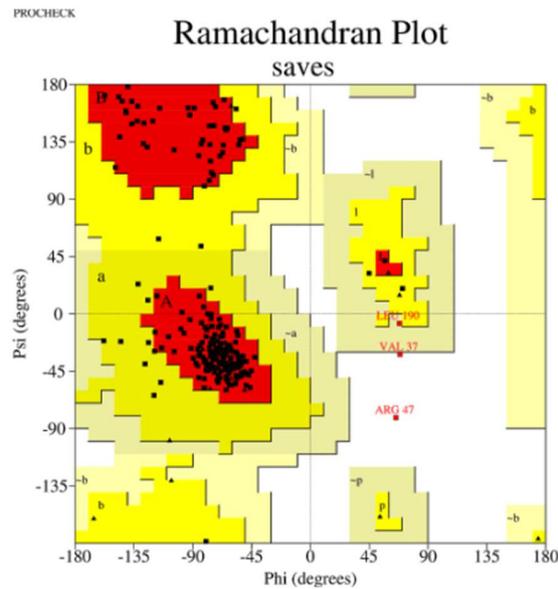


Figura 15. Diagrama de Ramachandran del modelo minimizado 3D de la 5 α R1, diseñado por SwissModel. Obtenidos de UCLA.

Posteriormente de la minimización de energía, se observó la agrupación de algunos aminoácidos que estaban en zonas no permitidas (**Figura 15**) a zonas permitidas. Además, el valor de *scoring* aumentó de 90.5 a 92.5%, siendo un valor más aceptable en comparación del modelo sin minimización, sin embargo, el valor de desviación aumentó a 4.9 siendo similar al valor reportado por el modelo de *AlphaFold*.

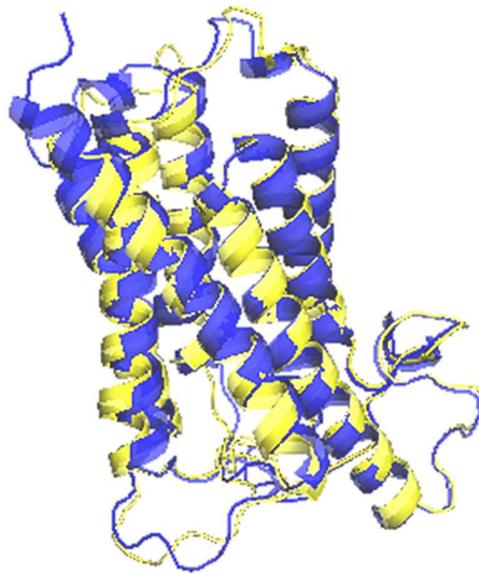


Figura 16. Superposición de estructuras terciarias de la enzima 5 α -reductasa tipo 1 humana. Modelo de color amarillo obtenido con el programa *SwissModel* y Modelo de color azul obtenido con el programa *AlphaFold*.

Finalmente, se observa que en la figura 16, las estructuras tridimensionales superpuestas de los dos modelos obtenidos de la 5 α R1, son totalmente similares. Los dos diseños presentan la misma cantidad, distribución y ubicación de las hélices alfa y beta y de los *loops* presentes en ella. Asimismo, también se puede observar que ciertos fragmentos modelados por *AlphaFold* no están presentes en el modelo obtenido por *SwissModel*, no obstante, son fragmentos que presentan un modelo de confiabilidad bajo, lo cual, puede ser insignificante en el modelo tridimensional (Jumper et al. 2021). Además, estos fragmentos no son tan relevantes en el modelado protéico, ya que son cadenas laterales que no involucran el sitio catalítico de la proteína.

Con base en lo anteriormente mencionado, y teniendo en cuenta que todos los modelos no son totalmente confiables, es posible confirmar que nuestra estructura

3D de la 5 α R1 exhibe valores aceptables para continuar con los dos últimos pasos del desarrollo racional de fármacos.

5.1.1. Validación de la estructura tridimensional de la 5 α R-1 a través de estudios de acoplamiento y dinámica molecular.

Al tener una estructura 3D minimizada es necesario validar la estructura tridimensional del modelo planteado, para así obtener resultados confiables en el diseño de fármacos, por esto, se realizaron ensayos de acoplamiento molecular y dinámica molecular con ligandos con actividad inhibitoria reportada (Lao et al. 2017)

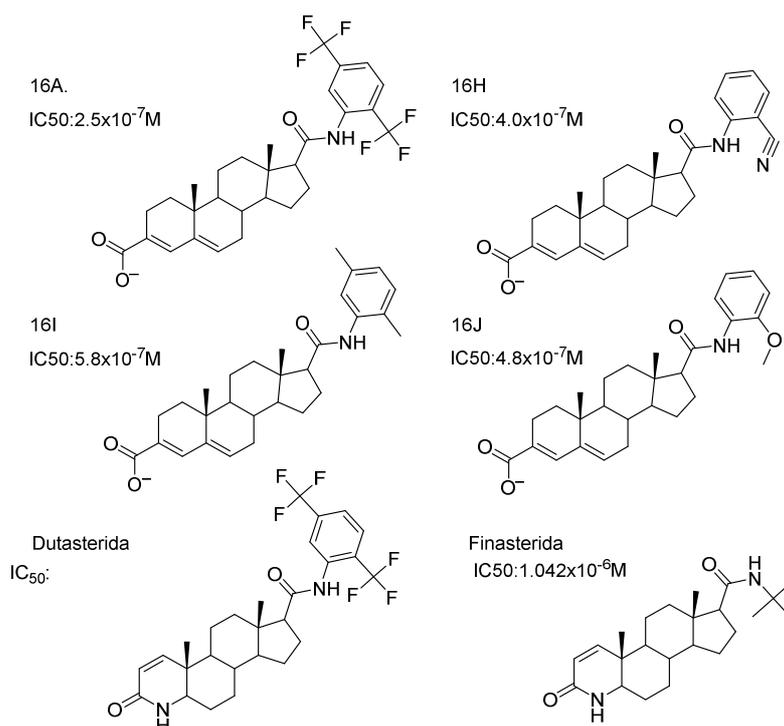


Figura 17. Ligandos derivados del ácido androsta-3,5-dieno-3 carboxílico con actividad inhibitoria en la isoenzima 5-alfa reductasa tipo 1.

Los ligandos empleados en el acoplamiento molecular y dinámica molecular, se construyeron como bases conjugadas del ácido carboxílico (Ver figura 17), debido

al ambiente químico en el cual fueron evaluados *in vitro*, puesto que cada uno fue evaluado a pH 6.

Cada uno de los ligandos se acopló en una caja de volumen 60x60x60, con coordenadas: x: 44.946, y: 43.087 y z: 33.729. Los resultados de energía de acoplamiento molecular se observan en la tabla 5 (*ver tabla*), asimismo algunas poses de los ligandos evaluados se observan en la figura 18 (*ver figura 18*).

Tabla 5. Energía de acoplamiento molecular de los ligandos evaluados.

Ligando	Energía de Acoplamiento molecular (kcal/mol)
16A	-11.36
16H	-12.87
16I	-11.08
16J	-11.89
Dutasterida (D)	-9.75
finasterida (F)	-9.06

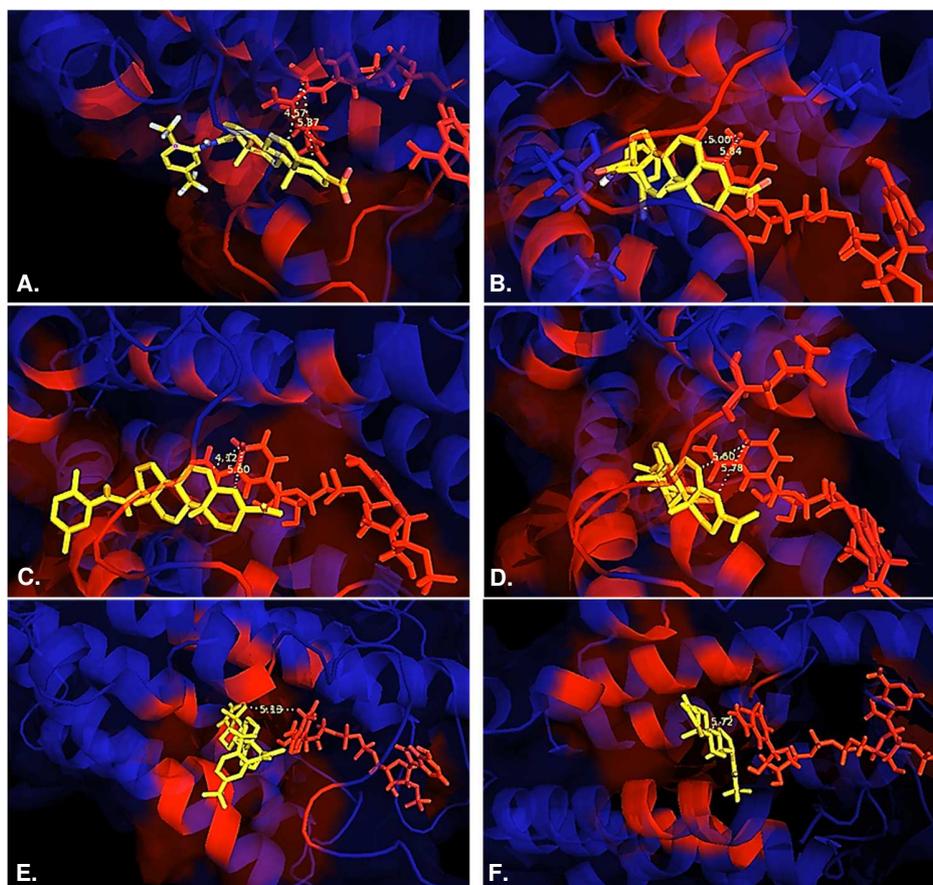


Figura 18. ^A Mejor pose del ligando 16A ^B Mejor pose del ligando 16H ^C Menor pose del ligando 16I ^D Mejor pose del ligando 16J ^E Mejor pose del ligando D ^F Mejor pose del ligando F.

Desde una perspectiva general, los resultados preliminares de cada conformación muestran que todos los ligandos se acomodan cerca de la cofactor (NADPH), pero su distancia varía entre ellos mismos. Adicionalmente, se observa que los aminoácidos TRP56, ALA120, PHE123, y, PHE228 presentan interacciones de Van de Waals con la cadena esteroidal de cada ligando, de igual manera, se observaron, en menor frecuencia, interacciones con los aminoácidos: ARG98, TYR102, MET119 PHE221, PHE224, THR225, LEU229, y entre otras.

En cambio, las interacciones de puente de hidrógeno no eran similares entre sí. Se observaron interacciones con los siguientes aminoácidos LEU19, SER36, GLN59,

GLU60, TYR102, GLY109, ALA120, ARG176, TYR199, SEU236, y, ARG242, como se observan en la tabla **a** (*Ver anexos*).

Por otro lado, el NADPH presentó interacciones de Van de Waals con los siguientes aminoácidos: LEU229 y ARG232, interacciones de puente de hidrógeno: TYR102, GLY109, ARG176, TYR199, SEU236, y, ARG242, e interacciones del tipo apilamiento pi-pi con el aminoácido TRP239. Igualmente, el NADPH se acomodó de la misma manera que se encuentra el cofactor en el sitio catalítico de la proteína 5 α R2 (Xiao et al. 2020b), el cual comprende el espacio entre las hélices 2, 3, 5, 6 y 7 de la proteína, tal como se observa en la siguiente imagen;

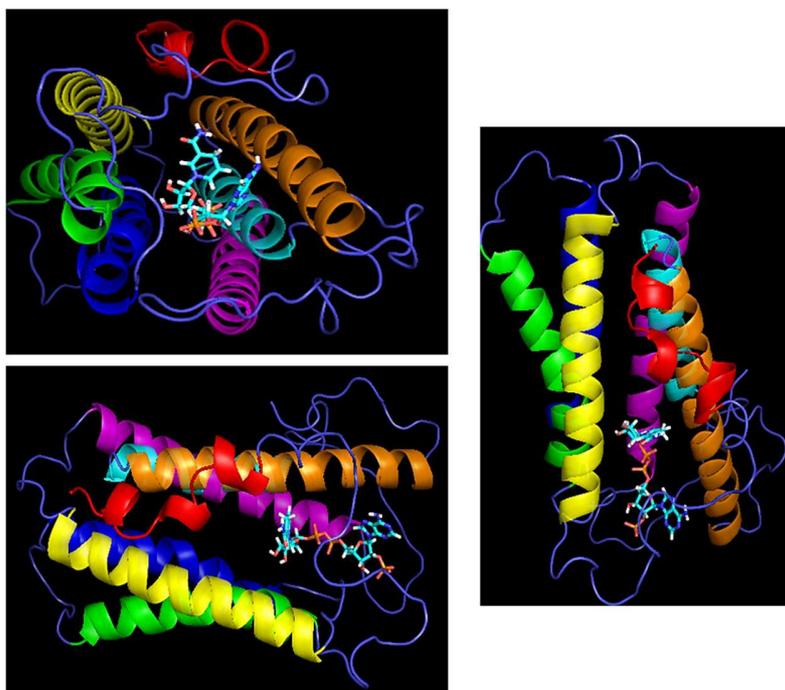


Figura 19. *Diferentes posiciones espaciales del complejo NADPH-5 α R1. Cada hélice está enumerada por color: roja: 1 hélice, verde: 2, azul: 3, amarillo:4, violeta:5 naranja:6 y celeste:7.*

En este sentido, se postula que a nivel teórico las distancias de interacción, tanto entre el complejo ligando-cofactor, y el complejo ligando-proteína, son cruciales para entender la potencialidad de la actividad inhibitoria de cada ligando, debido a

la inducción de una interacción covalente por parte del cofactor hacia el ligando. Sin embargo, los resultados del acoplamiento molecular no confirman esto, por ende, los resultados de la dinámica molecular, como *RMSD*, distancia media átomos importantes, como el sistema alfa, beta insaturado y alguno hidrógeno de la dihidropiridina presente en el NAPH, y los resultados del cálculo de energía, confirmarán este postulado.

Los resultados de la dinámica molecular establecieron que los ligandos 16A, 16I, y dutasterida, alcanzaron una alta estabilidad después de los 30000 ps de MD. Cabe resaltar que los valores de inhibición de los ligandos utilizados para la validación fueron obtenidos por ensayos *in vitro*, por esta razón, las simulaciones de dinámica molecular se realizaron en agua y no en la membrana.

Durante el tiempo de simulación, se observó que los ligandos 16A, 16I y D presentaban una fluctuación menor en comparación de los demás evaluados ($RMSD < 0.5 \text{ \AA}$). Por otro lado, se observó que los ligandos 16H, 16J y finasterida presentaron gran fluctuación durante todo el recorrido de la dinámica molecular y los valores de fluctuación menos favorables ($RMSD > 0.6 \text{ \AA}$) excepto el 16J, tal como se observan en la siguiente figura:

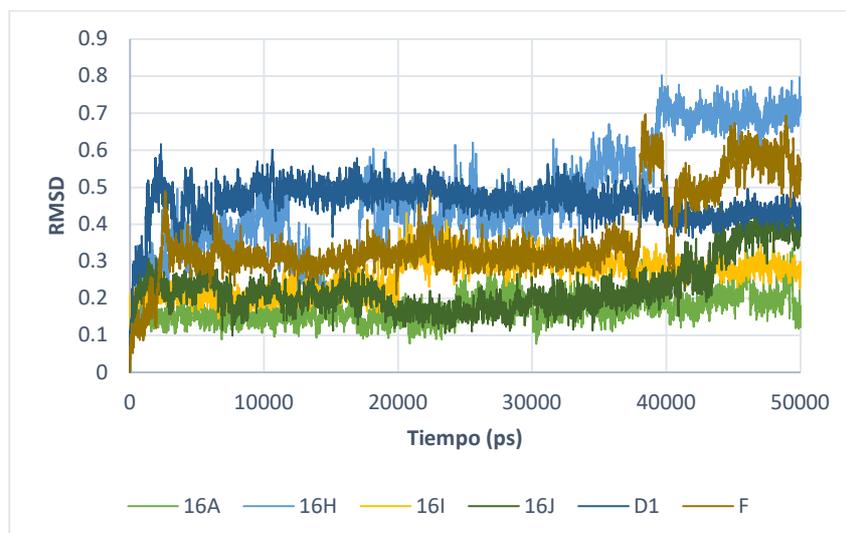


Figura 20. *RMSD de los ligandos acoplados a la enzima 5alfa-reductasa tipo 1.*

Seguidamente, se analizaron las distancias que tuvo cada ligando con el cofactor en los últimos 20000 ps de dinámica molecular, para así correlacionar los resultados de la estabilidad conformacional del complejo proteína ligando con los datos experimentales. En el caso de los ligandos 16, se analizaron los carbonos β y δ del esqueleto esteroidal, debido a sus posibles estructuras de resonancia (**Figura 21**).

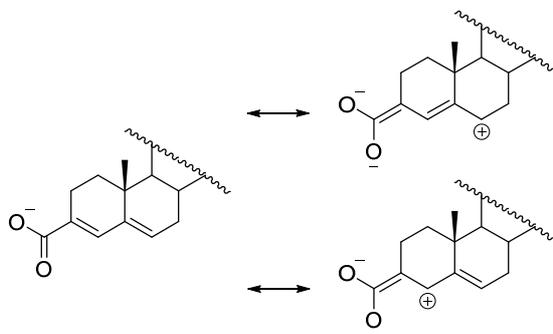


Figura 21. *Estructuras de resonancia de los ligandos derivados del ácido androsta-3,5-dieno-3 carboxílico.*

Es importante tener en cuenta que debe de existir una distancia relativamente corta entre cualquiera de los carbonos β y δ en los anillos A y B de la cadena base, con

algún hidrógeno de la dihidropiridina del NADPH, para así asegurar la transferencia de un hidruro e inducir el mecanismo de inhibición.

Los resultados de distancia media entre cada ligando se observan en la siguiente tabla:

Tabla 6. Distancia media entre el sistema alfa, beta insaturado del ligando con su cofactor (NADPH).

Ligando	Carbono	
	β (nm)	δ (nm)
16A	0,48	0.58
16H	1.53	1.55
16I	0.73	0.58
16J	0.70	0.78

A nivel general, se observa que las distancias entre la dihidropiridina y los carbonos δ y β varían entre los ligandos 16, e influyen en los datos experimentales. No obstante, el ligando **16H** no presentó una buena correlación con los datos experimentales, sin embargo, los demás ligandos exhibieron una correlación aceptable con los datos de concentración inhibitoria, energía libre de unión y distancias entre el complejo ligando-NADPH.

Los valores de energía libre de unión se observan en la siguiente tabla

Tabla 7. Energía de libre de unión calculados por el método MMPBSA y concentración inhibitoria de los ligandos 16.

Ligando	Energía de libre de unión (kcal/mol)	Concentración inhibitoria (IC₅₀) (M)
16A	-46.75 ± 6.04	2.5x10 ⁻⁷
16H	-44.45 ± 3.48	4.0x10 ⁻⁷
16I	-57.43 ± 5.80	5.8x10 ⁻⁷
16J	-46.14 ± 4.82	4.8x10 ⁻⁷

Analizando las tablas 6, 7 y la figura 17, se observa que el ligando **16A** presenta el valor menor de concentración inhibitoria (IC_{50}), asimismo, a nivel computacional, exhibió la menor distancia media entre el complejo ligando-NADPH, 0.48 nm, y uno de los valores más favorables de energía libre de unión, -46.75 kcal/mol. Del mismo modo, se ve una tendencia clara entre las distancias medias de los ligandos **16I** y **16J**, con su respectiva actividad biológica.

Con base en lo anterior, es posible deducir que la actividad biológica de cada ligando está relacionada con la distancia de interacción entre el sistema alfa, beta insaturado y la dihidropiridina,

De igual forma, para afianzar más el parámetro de distancia, y asegurar la capacidad predictiva del modelo de 5 α R-1 construido, se decidió a probar inhibidores comerciales **D** y **F** en la isoforma 2 y así comparar los resultados. Es importante resaltar que la finasterida es selectivo hacia la isoforma 2 y la dutasterida es un inhibidor dual.

Se observó que la distancia media entre el sistema alfa-beta insaturado de los ligandos comerciales y los hidruros de la dihidropiridina, varían con respecto a las isoformas (*Ver tabla 8*) y esto se debe al tipo de conformación existente en cada una de ellas, asimismo, la tabla exhibe los valores de energía libre de unión.

Tabla 8. Distancia media entre el sistema alfa, beta insaturado de los ligandos comerciales con su cofactor (NADPH) y energía libre de unión a través del método MMPBSA.

Ligando	Carbono β		Energía libre de unión (kcal/mol)	
	5 α R1	5 α R2	5 α R1	5 α R2
<i>Dutasterida</i>	0.33	0.6	-49.08 \pm 2.67	-38.63 \pm 3.13
<i>Finasterida</i>	1.12	0.45	-37.94 \pm 3.60	-47.61 \pm 3.5

Se pudo observar que el modo de unión más estable de la finasterida fue con el sistema aromático cerca de la dihidropiridina en la isoforma 1 (0.45 nm), caso contrario de la isoforma 2 (1.12 nm). En la isoforma 2, el sistema alfa, beta insaturado se acomodó a 0.45 nm del hidrógeno de la dihidropiridina y esto, favorecido por una interacción clave del tipo puente de hidrógeno con un aminoácido de interés, el ácido glutámico 57 (Xiao et al. 2020b). Asimismo, la distancia entre el sistema alfa, beta insaturado de la dutasterida y el hidrógeno de la dihidropiridina no fluctuó significativamente en las dos isoformas 5 α R1 y 5 α R2, 0.33 y 0.66, respectivamente.

Este hallazgo permite explicar la selectividad de la finasterida hacia la isoforma 2 y la dualidad de la dutasterida hacia las dos isoformas, ya que si se considera que la capacidad de inhibición recae en la posibilidad de formar un aducto NADP-inhibidor, es fundamental que el sistema alfa, beta-insaturado esté cerca del cofactor, lo cual se puede observar en el caso de la finasterida para la isoforma 2, pero no en la isoforma 1.

Se confirmó que hay una relación directa entre la energía libre de unión y a la distancia de interacción, sin embargo, es importante destacar que este parámetro de energía no es el único a tener en cuenta para predecir la actividad biológica. No

obstante, este es relevante cuando hay una relación entre la distancia del sistema alfa, beta insaturado de cada uno de los ligandos y alguno de los hidrógenos de la dihidropiridina.

Finalmente, estos resultados permiten la validación del modelo construido, ya que este modelo posee la capacidad de explicar la actividad biológica de los diferentes inhibidores estudiados.

5.2. *Diseño bio-isostérico de ligandos*

Como se observó en el apartado anterior, los ligandos 16 y los ligandos comerciales presentan características similares entre sí, por ejemplo, los dos comparten un sistema alfa, beta insaturado y una estructura esteroideal, para así asegurar la actividad anti proliferativa de cada ligando (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6443981/>). Asimismo, se observó que las diferentes sustituciones en el anillo aromático le conferían mayor potencialidad o disminución de la actividad biológica. Con base en esto, se propusieron realizar los cambios bio-isostéricos en el anillo A del esqueleto esteroideal y en el anillo aromático, el set propuesto es el que se observa en la figura 22.

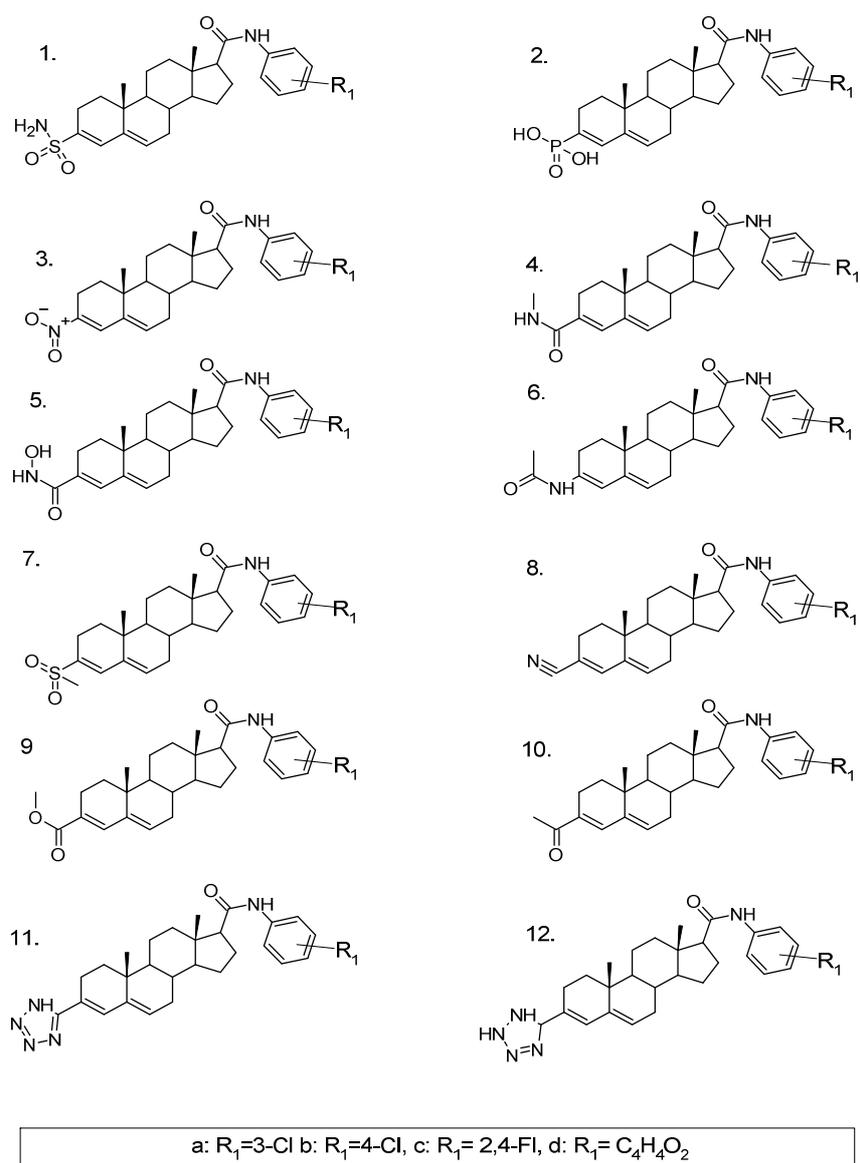


Figura 22. Set de moléculas análogas al ácido androsta-3,5-dieno-3 carboxílico.

Se observa que se realizaron sustituciones claves como: ácidos fosfónicos, que han demostrado actividad biológica en análogos de neurotransmisores ácido y aminobutírico y ácido glutámico (Froestl et al. 1995; Watkins, Korgsgaard-Larsen, y Honoré 1990). Sulfonamidas y derivados de ellas, como agentes antibacterianos, además que estos grupos establecen interacciones similares de puente de hidrógeno en comparación con los ácidos carboxílicos (Ballatore, Huryn, y Smith

2013). Tetrazoles que se asemejan a la acidez y lo planar de los ácidos carboxílicos (McMANUS y HERBST 1959; Schubbert 2001), sin embargo, los valores son un grupo voluminoso (Allen et al. 2012; Costantino et al. 2001). De igual manera sustituciones como ésteres y amidas están relacionadas a los bioisómeros del ácido carboxílico, asimismo los grupos ciano, nitro y cetona se sustituyeron con este bioisómero para evaluar la influencia en algunas propiedades químicas. Es importante mencionar que la mayoría de las sustituciones realizadas se hicieron teniendo presente la necesidad de tener un sistema alfa, beta-insaturado que permita la adición del hidruro del NADPH; sin embargo, se incluyó el grupo 12, como control del estudio, el cual no presenta esta característica, la importancia de este grupo es analizar si el método propuesto tiene la capacidad de discriminar entre los sistemas alfa, beta-insaturados de los que no lo son.

Por último, también se realizaron modificaciones en el anillo aromático, las cuales incluyeron átomos de cloro, en diferente posición, átomos de flúor y por último un dioxol, teniendo el objetivo de mejorar la lipofilidad o alguna de las otras propiedades ADMET.

5.3. Propiedades ADME-T

Los ligandos propuestos se agruparon según su auxóforo (R_1), para analizar la influencia que tiene la sustitución aromática frente a las propiedades ADME-T.

Es necesario tener claro que, al calcular tantas propiedades de interés es complejo clasificar los ligandos en un set de mejores compuestos bajo un único parámetro de interés, por ende, es necesario hacer un filtro de manera estratégica de algunas

propiedades ADME-T, teniendo en cuenta el ambiente bioquímico del blanco molecular de interés. En este trabajo de investigación se consideró como primer filtro los valores de; lipofilicidad y absorción, seguidamente se analizó la posibilidad de penetrar la barrera hematoencefálica, inhibición de algún citocromo de interés y, por último, si violaban alguna de las 5 reglas de Lipinski.

Con base en la literatura se ha identificado que las enzimas 5 α -reductasa, son enzimas de membrana, lo cual, proporciona con ciertos parámetros en específico a cumplir, por ejemplo, la lipofilicidad. Este parámetro relaciona la afinidad que tiene una molécula por un ambiente acuoso o lipofílico, además, es posible prever la capacidad que tienen las estructuras químicas en a travesar las membranas celulares y así unirse a proteínas.

Los resultados del consenso de LogP_{o/w} demostraron qué, a nivel grupal el valor de lipofilicidad variaba con respecto a la electronegatividad del auxóforo (R), siendo los compuestos di-fluorados, los ligandos de ambiente más electronegativo y asimismo, los que presentaron mayor valor de LogP. De igual forma, se observó que todos los ligandos que poseían la ramificación *d* (el grupo dioxol) en el anillo aromático obtuvieron el menor valor de LogP entre ellos. Además, se observó que los valores fluctuaban con respecto a la posición del cloro en el anillo aromático, por ejemplo, los ligandos que presentaban el cloro en posición para obtuvieron un valor mayor de LogP, en comparación de los ligandos con posición meta (*Ver tabla b en anexos*).

Otro resultado importante, y a recalcar, es que la mayoría de los ligandos diseñados, sin importar el R, presentaron una baja absorción, afectado por la estructura esteroideal del farmacóforo, y, ninguno es capaz de penetran la barrera

hematoencefálica (BHE). Sin embargo, la baja absorción que presenta la mayoría de ligandos no es un problema determinante en la elección de fármacos, ya que, actualmente existen una variedad de distintos excipientes y estrategias utilizadas para solventar este tipo de limitante (Deng *et al.*, 2020).

Finalmente, se encontró que ninguno de los compuestos diseñados presentó más de 1 violaciones a las reglas de Lipinski, siendo los valores de LogP el parámetro fuera del rango establecido. Particularmente, el peso molecular de todos los compuestos tuvo un rango de 435 g/mol a 492 g/mol, y, en relación a las reglas de Lipinski, 10 estructuras no presentaron ninguna violación, y 40 presentaron una violación. Además, ninguno de los ligandos diseñados es capaz de pasar la barrera hematoencefálica, siendo un buen parámetro de evaluación.

Con base en esto, no es posible determinar, bajo este único análisis, cuál de los ligandos se debe de descartar para llevar a cabo los demás ensayos, por ende, cada uno de los ligandos se sometió a ensayos de acoplamiento molecular, para así en conjunto decidir que ligandos serían los adecuados para someterlos a dinámica molecular.

5.4. Acoplamiento Molecular

Se realizaron un total de 50 acoplamientos moleculares, cada uno con 20 corridas, 25.000.000 evaluaciones y 27.000 generaciones. Los resultados se agruparon en dos grandes grupos. En el primer grupo se agruparon los ligandos que presentaron la menor distancia entre los carbonos β de cada ligando con respecto al cofactor y asimismo, que presentaran el mayor *cluster* posible. Seguidamente, el segundo

grupo se agrupó con respecto la energía menos favorable entre el complejo y las mayores distancias entre los carbonos β del ligando al cofactor (*Ver tabla c en anexos*). También, se evaluaron las distancias entre el carbono δ del farmacóforo y el cofactor, sin embargo, se tomaron relevantes cuando exhibieran menores valores de distancia en comparación de su carbono vecino.

En el primer grupo se destacaron 15 ligandos, tales como: **1b**, **1c**, **2b**, **3b**, **3c**, **4a**, **5b**, **5d**, **6b**, **7b**, **7c**, **7d**, **8b**, **9b** y **10b**. Se observó que la mayoría de los 15 ligandos, en específico 9, presentaron un átomo de cloro en posición *-para-* al anillo aromático, 3 ligandos con dos átomos de fluor (*en posición 2,4*), 2 ligandos presentaron el grupo dioxolano y un ligando exhibió un átomo de cloro en posición *-meta-*.

Con base en las similitudes de algunos grupos, que anteriormente se mencionaron, fue posible analizar el carácter de LogP con respecto a la influencia del bio-isoster y asimismo como afecta este parámetro en las distancias de los ligandos. Por ejemplo, se observó que los ligandos que tienen en común la posición *p-cloro*, con respecto al anillo aromático, exhibieron tanto la menor y la mayor distancia entre los carbonos β del esqueleto esteroideal con el cofactor (*NADPH*). Por ejemplo, el carbono β del ligando **8b** se acomodó a 5.43 Å de la dihidropiridina y el **6b** se acomodó a 7,25 Å, siendo la distancia más larga, entre el complejo ligando-cofactor, del primer grupo de ligandos. De igual forma, la porción del carbono δ de los ligandos mencionados anteriormente (**8b** y **6b**), se acomodó de manera desfavorable hacia el cofactor, 6.89 Å y 8.46 Å, respectivamente.

Asimismo, se observó que los ligandos que presentaron los grupos; sulfamidas, amidas y ácido fosfonico, encabezaron las mayores distancias del primer grupo, y esto por el bajo carácter lipofílico de estos *bio-isósteros*. Como se observa en el ligando **1c**; exhibió la mayor distancia de interacción, 6.23 Å, entre el carbono β y la dihidropiridina, en comparación con sus análogos di-flurados. Asimismo, la distancia entre el carbono δ del ligando **1c** y el cofactor, fue 7.57 Å.

Las posiciones de los ligandos mencionados anteriormente, se pueden observar en la siguiente figura:

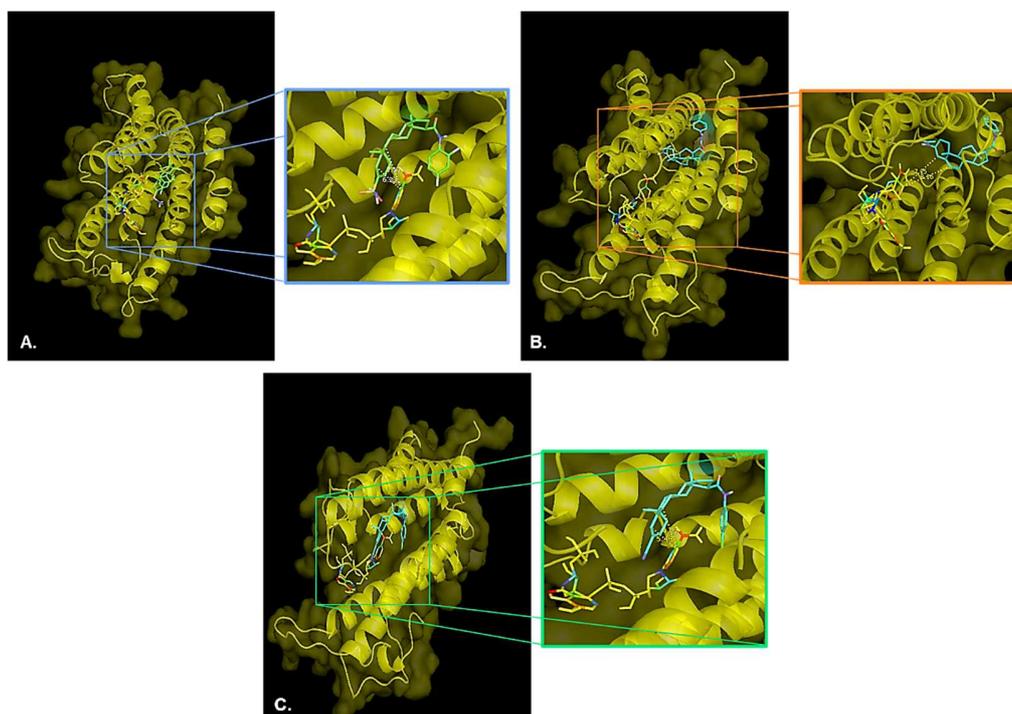


Figura 23. ^A. Mejor pose del ligando **1c**, ^B. Mejor pose del ligando **6b** y ^C. Mejor pose del ligando **8b**.

Al analizar cada pose de los ligandos en la figura anterior, se pudo observar que los ligandos **8b** y **6b** se acomodaron próximos a la dihidropiridina con la porción donde se encontraba el sistema alfa, beta insaturado, además, el anillo aromático del ligando **8b** se acercó a la dihidropiridina. En cambio, el ligando **1c** se acomodó con

la porción del anillo aromático di-florado y no el sistema alfa, beta insaturado de interés.

Por otro lado, todos los ligandos que no pertenecieron al primer grupo se agruparon en el segundo grupo. A nivel general se observó que la mayoría de los ligandos del segundo grupo se acercaron a la dihidropiridina con la cara del anillo A, donde se encuentra el carbono beta, de la cadena esteroidal. No obstante, algunos ligandos no presentaron esta característica. Por ejemplo, se identificó que los ligandos que presentaron la sustitución di-florada (**4c**, **11c**, y **10c**) exhibieron las distancias menos favorables posibles, tal como se observa en la figura 24.

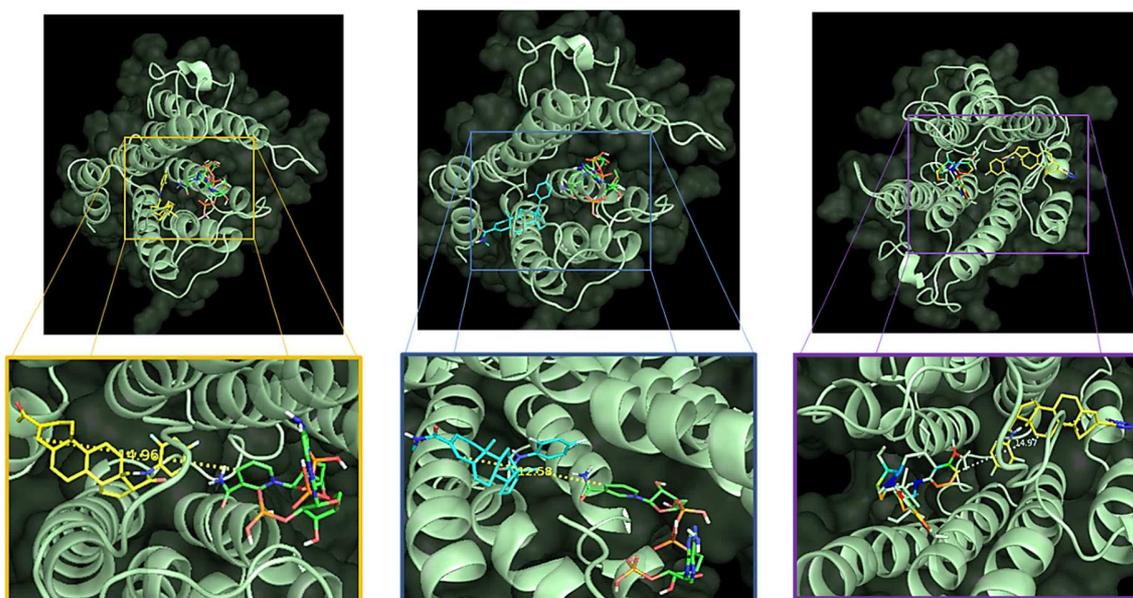


Figura 24. ^A. Mejor pose del ligando **10c**, ^B. Mejor pose del ligando **4c** y ^C. Mejor pose del ligando **11c**.

La característica en común que se observó en cada uno de los ligandos di-florado, fue que el anillo aromático de cada ligando se acomodó cerca de la dihidropiridina y no el sistema alfa, beta insaturado. Esta característica entre este grupo es netamente influenciada por la ramificación del anillo aromático, puesto que, estos

dos átomos de flúor les confiere un mayor carácter lipofílico que el mismo bioisóster.

Otro análisis alterno que puede extraerse de este grupo, es que los ligandos **8d** y **9d** exhibieron tanto la menor como una de las mayores distancias del segundo grupo análogo, respectivamente. Se observó que en el ligando **8d** presentó una distancia, entre el sistema alfa, beta insaturado y la dihidropiridina, de aproximadamente 7.34 Å. De igual manera, el ligando **9d** exhibió la mayor distancia, 14.16 Å, tal como se observan en la siguiente figura.

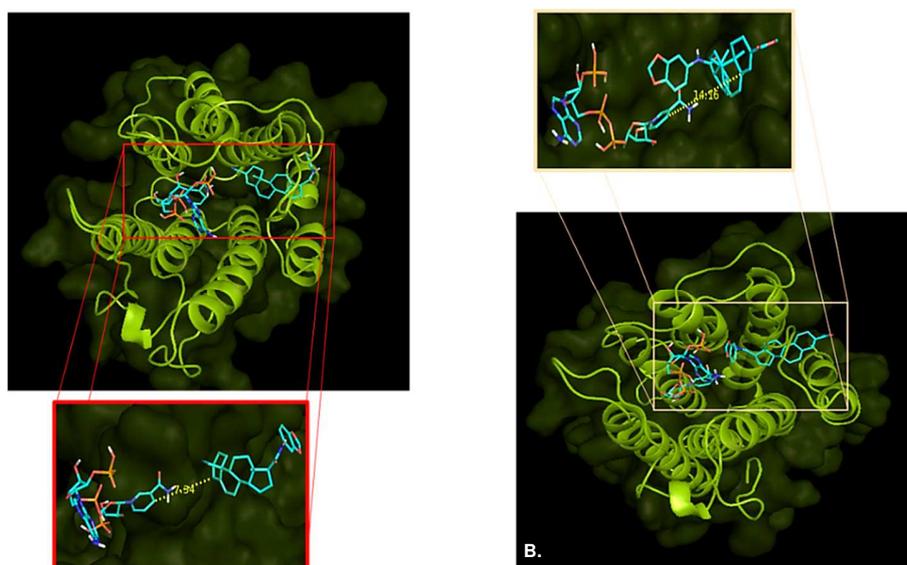


Figura 25. ^A. Mejor pose del ligando **8d** y ^B. Mejor pose del ligando **9d**.

La variación de estas distancias se debe a la influencia del bioisóster de cada ligando y la ramificación del anillo aromático. Por ejemplo, se observó que el ligando **9d** se acomodó de una manera inusual a la esperada, ya que la oxolano del anillo aromático estuvo cerca de la dihidropiridina, y no el carbono β o δ del esqueleto esteroideal. Caso contrario del ligando **8d**, en él se observa que el sistema alfa, beta

insaturado se acomodó de la manera esperada, pose influenciada por el carácter lipofílico del grupo ciano (Kadigamuwa, Mapa, y Wimalasena 2016) .

Asimismo, se observó que los ligandos que presentaron una distancia mayor o igual a 6.5 Å, no son capaces de inducir una interacción de tipo covalente con el NADPH, debido a que no se posicionaron con respecto al sistema alfa, beta insaturado, sino que se acomodaron con la cara del anillo aromático.

Es importante resaltar que ninguno de los ligandos del grupo de control 12 mostró valores importantes en el estudio de acoplamiento molecular, esta observación permite resaltar que el protocolo utilizado es capaz de eliminar compuestos que no cumplen con las características electrónicas necesarias para interactuar con el NADPH.

De igual forma, es necesario subrayar que los resultados del acoplamiento molecular no predicen con certeza el comportamiento del sistema biológico, sino que da las posibles interacciones entre un complejo de interés. Por esto, es necesario realizar ensayos de dinámica molecular para evaluar la afinidad del ligando tanto en el sitio catalítico como en el cofactor.

Finalmente, haciendo un filtro se sometieron los ligandos del primer grupo a dinámica molecular, excluyéndose ligando 6b, puesto que exhibió una distancia que posiblemente no induce a una interacción covalente. Por otro lado, ningún ligando del segundo grupo se eligió para llevarlo a simulaciones de dinámica molecular.

5.5. Dinámica Molecular

Se calculó la energía libre de unión en los últimos 20000 ps de cada uno de los ligandos del primer grupo. Para el cálculo de energía se consideró tanto la proteína como el cofactor, estos dos sistemas se unieron en un grupo y se calculó la energía promedio en 101 puntos de los últimos 20000 ps de la simulación de la dinámica molecular. El promedio de los resultados se observa en la siguiente tabla;

Tabla 8. Energía de libre de unión calculados por el método MMPBSA.

Ligando	Energía libre de unión (kcal/mol)	Ligando	Energía libre de unión (kcal/mol)
5d	-37.34 ± 3.68	3c	-45.95 ± 2.52
1b	-58.36 ± 3.71	4a	-54.06 ± 4.16
7d	-50.69 ± 4.10	7b	-66.45 ± 4.01
1c	-45.24 ± 3.84	11b	-42.54 ± 3.57
2b	-30.36 ± 2.98	8b	-43.37 ± 3.25
3b	-47.60 ± 2.93	9b	-48.44 ± 3.55
5b	-52.99 ± 3.03	10b	-43.66 ± 4.71

A nivel general, se observó que todos los ligandos exhiben valores favorables de energía libre de unión. Por ejemplo, los ligandos **7b**, **1b**, **4a**, **5b**, y **7d**, presentaron las energías más favorables del sistema ($\Delta G^\circ > -50 \text{ kcal/mol}$), resaltando el ligando **7b** que exhibió la mejor energía de unión -66.45 kcal/mol. Sin embargo, en este proyecto se ha demostrado que la energía libre de unión no es un valor significativo si no hay una relación directa con las distancias entre la dihidropiridina del NADPH y el sistema alfa, beta insaturado de cada uno de los ligandos. Con base en esto, se calcularon las distancias medias entre los carbonos β y δ , de cada uno de los ligandos, y la porción de la dihidropiridina del cofactor. Los resultados se observan en la siguiente tabla;

Tabla 9. Distancia media entre los ligandos estudiados y la dihidropiridina del cofactor de la enzima 5 α R1.

Ligando	Carbono		Ligando	Carbono	
	β (nm)	δ (nm)		β (nm)	δ (nm)
5d	0,37	0.49	3c	0.61	0.68
1b	0.73	0.76	4a	0.60	0.70
7d	0.37	0.43	7b	0.58	0.69
1c	0.56	0.73	11b	0.78	0.80
2b	1.78	1.90	8b	1.78	1.87
3b	1.42	1.42	9b	1.0	1.0
5b	0.80	0.86	10b	0.72	0.83

Con base en los resultados de la tabla 9, fue posible evidenciar una selectividad entre la dihidropiridina y los carbonos β de cada ligando, en comparación de los carbonos δ , debido a sus valores mayores de distancia de interacción. Asimismo, se observó que los ligandos que presentaron las energías de unión más favorables, exhibieron distancias de interacción claves para correlacionar los valores de distancias obtenidos (*ver tabla 9*). Por ejemplo, los ligandos **1b** y **5b** presentaron una buena estabilidad del complejo proteína-ligando-cofactor, sin embargo, las conformaciones en las que se encontraban los ligandos no eran favorable para un ataque nucleofílico de un hidruro inducido por la dihidropiridina del NADPH (distancia > 6.0 nm), y esto se debe, a la gran distancia que se presenta entre estas dos moléculas. De igual manera, los ligandos **8b**, **2b**, **3b**, **9b**, **11b** y **10b** exhibieron distancias > 7.0 nm entre el complejo ligando-cofactor, lo cual nos daría a entender que estos ligandos no podrían presentar la interacción clave de la inhibición, lo cual es clave para su actividad biológica. Algunas poses se pueden observar en la siguiente figura;

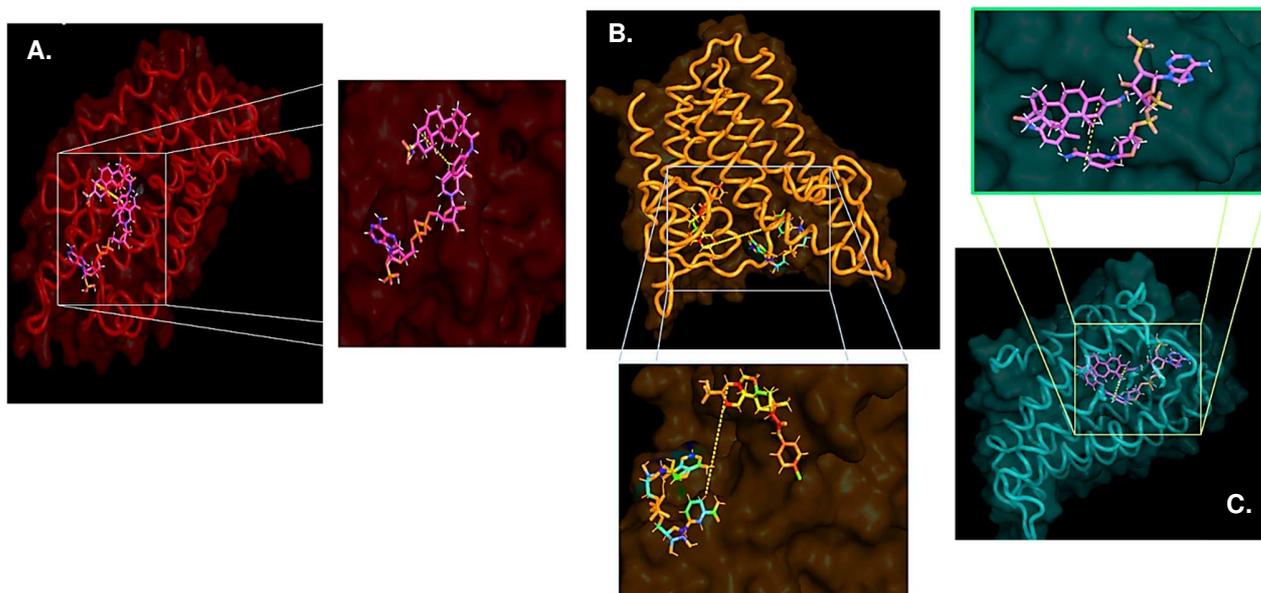


Figura 26. ^{A.} Mejor pose del ligando **1b**, y ^{B.} Mejor pose del ligando **2b**

y ^{B.} Mejor pose del ligando **5b**

Por otro lado, se observó que los ligandos **7b**, **4a** y **7d** exhibieron valores favorables tanto de energía libre de unión, como distancia de interacción. Por ejemplo, se observa que el ligando **7d** presentó la menor distancia entre la dihidropiridina y los carbonos β , δ (Ver tabla 8), respectivamente. Igualmente, fue posible apreciar que el ligando **7b** presentó la energía de unión más favorable y una distancia favorable de interacción entre el complejo ligando-cofactor (<0.6 nm). De la misma manera, el ligando **5d** exhibió la distancia más favorable de inhibición (0.37 nm), pero una energía libre de unión regular (-37.34 kcal/mol). Asimismo, los ligandos **1c**, **3c** y **4a**, exhibieron distancias favorables de que posiblemente puedan inducir a la interacción clave de la actividad biológica.

A partir de lo anterior, es posible deducir que la estabilidad del compuesto no está relacionada directamente con la distancia de interacción, sin embargo, la distancia

jugará un papel importante al momento de elegir el mejor compuesto, ya que es necesario la posibilidad de interacción para inducir la cascada de inhibición. Por esto, se escogieron los ligandos que presentaron las menores distancias, **5d**, **7d**, **1c** y **7b**, los cuales se analizaron a detalle la estabilidad conformacional de los últimos 20000 ps de dinámica (**Figura 27**),

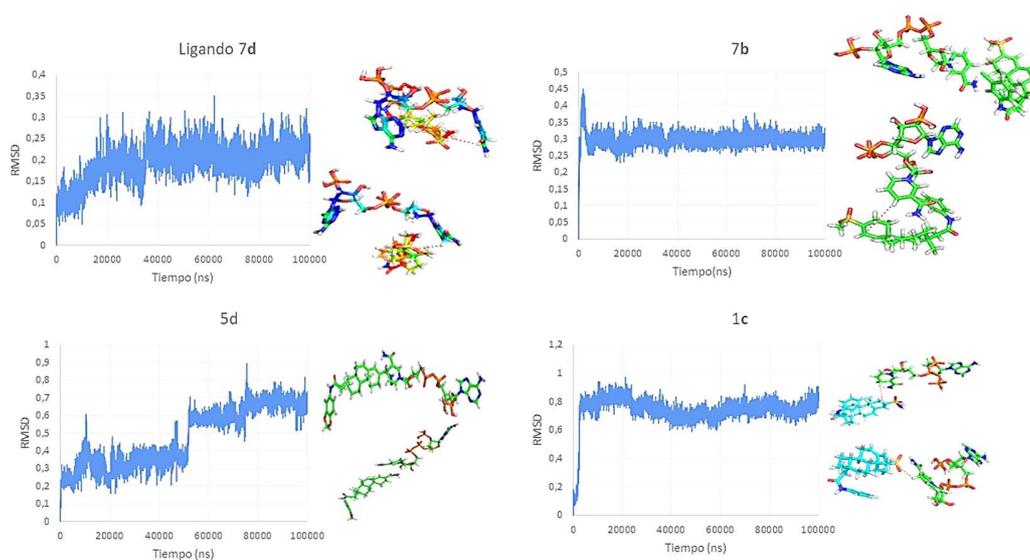


Figura 27. Poses conformacionales de los ligandos de interés con respecto al RMSD.

Se observó que la estabilidad conformacional de cada uno de los ligandos no varió en los últimos 20000 ps de dinámica molecular, excepto, los ligandos **1c** y **5d** que presentaron una fluctuación considerable en el RMSD, indicando una gran variación desde su conformación inicial hasta su conformación final, lo que hace suponer que las conformaciones encontradas en el estudio de acoplamiento molecular no eran la más estable (*ver figura 27*). De igual manera los ligandos que tienen el bio-isóster metilsulfona, como; **7b** y **7d**, exhibieron los menores valores de RMSD < 6.0 nm, además, obtuvieron valores de energía libre de unión muy estables (> -50 kcal/mol) indicándonos que las posiciones iniciales se mantuvieron constantes en la

simulación. De igual forma es importante resaltar que el ligando **7b**, no presentó ninguna fluctuación conformacional significativa.

Con base en esto, es posible considerar que los ligandos **5d**, **7d**, **1c** y **7b** son los mejores ligandos de su grupo y a nivel general. Además, es importante recalcar que el ligando **7b** se considera el candidato líder debido a sus propiedades ADMET, a su constante estabilidad conformacional y la energía más favorable de unión.

6. Conclusiones

Se obtuvo un set de 4 ligandos con perfiles prometedores como inhibidores de la enzima 5-alfa reductasa 1, además, se modeló una estructura tridimensional capaz de predecir la actividad biológica de la misma.

Se encontraron ciertas características claves para entender el perfil activo que los ligandos prometedores. Por ejemplo, es necesario tener un sistema alfa, beta insaturado en el anillo A de la estructura base esteroïdal y tener alguna ramificación lipofílica para potenciar la afinidad entre el complejo cofactor-ligando, por ejemplo, una metilsulfona. Asimismo, se confirmó que la influencia de átomos muy electronegativos, como el flúor, le confiere cierto carácter lipofílico al ligando. De igual forma, también se entendió a nivel computacional la selectividad de los ligandos comerciales, como la finasterida y la dutasterida.

Por último y más importante, es que las distancias entre el sistema alfa, beta insaturado y la dihidropiridina del cofactor NADPH, deben de ser cortas, para asegurar la transferencia del hidruro y así asegurar un proceso de inhibición.

7. Perspectivas

Como paso a seguir, se recomendaría realizar ensayos de acoplamiento y dinámica molecular a los 50 ligandos propuestos con la isoforma 2, para así identificar la posible dualidad o selectividad de los ligandos frente a los blancos moleculares.

Con el fin de predecir la actividad *in vivo*, se recomienda realizar los estudios de dinámica molecular incluyendo la membrana celular.

De igual manera, se recomienda proponer rutas sintéticas capaces de obtener los mejores ligandos, asimismo, caracterizarlos y evaluarlos en cada una de estas moléculas en ensayos *in vitro* y quien sabe en ensayos *in vivo*, para así correlacionar y corroborar los valores obtenidos en los ensayos *in silico*.

8. Referencias bibliográficas

- Abbaszadegan, Mohammad Reza et al. 2013. "Structural Biology: Modeling Applications and Techniques at a Glance." *Archives of Advances in Biosciences* 4(1). <https://journals.sbmu.ac.ir/aab/article/view/3995>.
- Adcock, Stewart A., and J. Andrew McCammon. 2006. "Molecular Dynamics: Survey of Methods for Simulating the Activity of Proteins." *Chemical Reviews* 106(5): 1589–1615.
- Adelusi, Temitope Isaac et al. 2022a. "Molecular Modeling in Drug Discovery." *Informatics in Medicine Unlocked* 29: 100880.
- . 2022b. "Molecular Modeling in Drug Discovery." *Informatics in Medicine Unlocked* 29: 100880.
- Aggarwal, Saurabh et al. 2010a. "An Overview on 5 α -Reductase Inhibitors." *Steroids* 75(2): 109–53.
- . 2010b. "An Overview on 5 α -Reductase Inhibitors." *Steroids* 75(2): 109–53.
- . 2010c. "An Overview on 5 α -Reductase Inhibitors." *Steroids* 75(2): 109–53.
- Alberto Arcediano, Javier Cassinello Espinosa. 2007. "Cáncer de Próstata En El Anciano." In *Revisiones En Cáncer*, , 284–94.
- Allen, Frank H. et al. 2012. "The Hydrogen Bond Environments of 1 *H*-Tetrazole and Tetrazolate Rings: The Structural Basis for Tetrazole–Carboxylic Acid Bioisosterism." *Journal of Chemical Information and Modeling* 52(3): 857–66.
- Andersson, S, and D W Russell. 1990a. "Structural and Biochemical Properties of Cloned and Expressed Human and Rat Steroid 5 Alpha-Reductases." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87(10): 3640–44.

- . 1990b. "Structural and Biochemical Properties of Cloned and Expressed Human and Rat Steroid 5 Alpha-Reductases." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87(10): 3640–44.
- ANDRIOLE, GERALD et al. 2004. "DIHYDROTESTOSTERONE AND THE PROSTATE: THE SCIENTIFIC RATIONALE FOR 5 α -REDUCTASE INHIBITORS IN THE TREATMENT OF BENIGN PROSTATIC HYPERPLASIA." *Journal of Urology* 172(4 Part 1): 1399–1403.
- Askew, Emily B. et al. 2007. "Modulation of Androgen Receptor Activation Function 2 by Testosterone and Dihydrotestosterone." *Journal of Biological Chemistry* 282(35): 25801–16.
- Azzouni, Faris, Alejandro Godoy, Yun Li, and James Mohler. 2012. "The 5 Alpha-Reductase Isozyme Family: A Review of Basic Biology and Their Role in Human Diseases." *Advances in Urology* 2012: 1–18.
- Bakshi, Raman K. et al. 1995. "4-Aza-3-Oxo-5. Alpha. -Androst-1-Ene-17. Beta. -N-Arylcarboxamides as Dual Inhibitors of Human Type 1 and Type 2 Steroid 5. Alpha.-Reductases. Dramatic Effect of N-Aryl Substituents on Type 1 and Type 2 5. Alpha. -Reductase Inhibitory Potency." *Journal of Medicinal Chemistry* 38(17): 3189–92.
- Ballatore, Carlo, Donna M. Huryn, and Amos B. Smith. 2013. "Carboxylic Acid (Bio)Isosteres in Drug Design." *ChemMedChem* 8(3): 385–95.
- Bateman, Alex et al. 2021. "UniProt: The Universal Protein Knowledgebase in 2021." *Nucleic Acids Research* 49(D1): D480–89.
- Batista, Rafael Loch, and Berenice Bilharinho Mendonca. 2020. "<p>Integrative and Analytical Review of the 5-Alpha-Reductase Type 2 Deficiency Worldwide</P>." *The Application of Clinical Genetics* Volume 13: 83–96.
- Bellido MC: Reproducción en el varón. In *Fisiología Humana*. Edited by Tresguerres JAF. Madrid, España: McGRAW-Hill-Interamericana; 1999:1033-1047.
- Berry, Stephen J., Donald S. Coffey, Patrick C. Walsh, and Larry L. Ewing. 1984. "The Development of Human Benign Prostatic Hyperplasia with Age." *Journal of Urology* 132(3): 474–79.
- Bottegoni, Giovanni. 2011. "Protein-Ligand Docking." *Frontiers in Bioscience* 16(1): 2289.
- Brás, N. F. et al. 2014. "Protein Ligand Docking Docking in Drug Discovery Drug Discovery." In *Protein Modelling*, Cham: Springer International Publishing, 249–86.
- Buchan, Daniel W A, and David T Jones. 2019. "The PSIPRED Protein Analysis Workbench: 20 Years On." *Nucleic Acids Research* 47(W1): W402–7.
- Bull, Herbert G. et al. 1996. "Mechanism-Based Inhibition of Human Steroid 5 α -Reductase by Finasteride: Enzyme-Catalyzed Formation of NADP–Dihydrofinasteride, a Potent Bisubstrate Analog Inhibitor." *Journal of the American Chemical Society* 118(10): 2359–65.
- Camacho, Christiam et al. 2009. "BLAST+: Architecture and Applications." *BMC Bioinformatics* 10(1): 421.
- Cao, Renzhi et al. 2015. "Large-Scale Model Quality Assessment for Improving Protein Tertiary Structure Prediction." *Bioinformatics* 31(12): i116–23.
- Carson, Culley, and Roger Rittmaster. 2003. "The Role of Dihydrotestosterone in Benign Prostatic Hyperplasia." *Urology* 61(4): 2–7.
- Chandramore, Kavita. 2017. "HOMOLOGY MODELING OF SUBCUTANEOUS FILARIASIS DHFR PROTEINS." *International Journal of Current Pharmaceutical Research* 9(6): 76.
- Chatterjee, Bandana. 2003. "The Role of the Androgen Receptor in the Development of Prostatic Hyperplasia and Prostate Cancer." *Molecular and Cellular Biochemistry* 253(1/2): 89–101.
- Chen, W., C.C. Zouboulis, and C.E. Orfanos. 1996. "The 5 α -Reductase System and Its Inhibitors." *Dermatology* 193(3): 177–84.

- Conley, A. J., and I. M. Bird. 1997. "The Role of Cytochrome P450 17 α -Hydroxylase and 3 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase in the Integration of Gonadal and Adrenal Steroidogenesis via the Δ 5 and Δ 4 Pathways of Steroidogenesis in Mammals." *Biology of Reproduction* 56(4): 789–99.
- Contrera, Joseph F, Philip Maclaughlin, Lowell H Hall, and Lemont B Kier. 2005. "QSAR Modeling of Carcinogenic Risk Using Discriminant Analysis and Topological Molecular Descriptors." *Current drug discovery technologies* 2(2): 55–67.
- COOKE, PAUL S., PETER YOUNG, and GERALD R. CUNHA. 1991. "Androgen Receptor Expression in Developing Male Reproductive Organs*." *Endocrinology* 128(6): 2867–73.
- Corona, G et al. 2012. "Inhibitors of 5 α -Reductase-Related Side Effects in Patients Seeking Medical Care for Sexual Dysfunction." *Journal of endocrinological investigation* 35(10): 915–20.
- . 2017. "Sexual Dysfunction in Subjects Treated with Inhibitors of 5 α -Reductase for Benign Prostatic Hyperplasia: A Comprehensive Review and Meta-Analysis." *Andrology* 5(4): 671–78.
- Costantino, Gabriele et al. 2001. "Synthesis and Biological Evaluation of 2-(3'-(1 H -Tetrazol-5-Yl)Bicyclo[1.1.1]Pent-1-Yl)Glycine (S -TBPG), a Novel MGLu1 Receptor Antagonist." *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 9(2): 221–27.
- Cruciani, Gabriele et al. 2005. "MetaSite: Understanding Metabolism in Human Cytochromes from the Perspective of the Chemist." *Journal of Medicinal Chemistry* 48(22): 6970–79.
- Cuozzo, Alessandro et al. 2022. "SwissBioisostere 2021: Updated Structural, Bioactivity and Physicochemical Data Delivered by a Reshaped Web Interface." *Nucleic Acids Research* 50(D1): D1382–90.
- Daina, Antoine, Olivier Michielin, and Vincent Zoete. 2017a. "SwissADME: A Free Web Tool to Evaluate Pharmacokinetics, Drug-Likeness and Medicinal Chemistry Friendliness of Small Molecules." *Scientific Reports* 7(1): 42717.
- . 2017b. "SwissADME: A Free Web Tool to Evaluate Pharmacokinetics, Drug-Likeness and Medicinal Chemistry Friendliness of Small Molecules." *Scientific Reports* 7(1): 42717.
- Debes, Jose D, and Donald J Tindall. 2002. "The Role of Androgens and the Androgen Receptor in Prostate Cancer." *Cancer Letters* 187(1–2): 1–7.
- Dehm, Scott M., and Donald J. Tindall. 2007. "Androgen Receptor Structural and Functional Elements: Role and Regulation in Prostate Cancer." *Molecular Endocrinology* 21(12): 2855–63.
- Dong, Jing et al. 2018. "Experimental Characterization of a SESAM Mode-Locked Yb:YAG Thin Disk Laser." In *High-Power Lasers and Applications IX*, eds. Ruxin Li and Upendra N. Singh. SPIE, 29.
- Draws, J. 2000. "Drug Discovery: A Historical Perspective." *Science (New York, N. Y.)* 287(5460): 1960–64.
- Drury, Jason E., Luigi di Costanzo, Trevor M. Penning, and David W. Christianson. 2009. "Inhibition of Human Steroid 5 β -Reductase (AKR1D1) by Finasteride and Structure of the Enzyme-Inhibitor Complex." *Journal of Biological Chemistry* 284(30): 19786–90.
- Escalona, J. C., Carrasco, R., & Padrón, J. A. (2005). Introducción al diseño de Fármacos. Retrieved from <http://www.fq.uh.cu/investig/lqct/imagenes2/disenos.pdf>
- Faller, Bernard, David Farley, and Hanspeter Nick. 1993. "Finasteride: A Slow-Binding 5. Alpha.-Reductase Inhibitor." *Biochemistry* 32(21): 5705–10.
- Forchielli, Enrico, and Ralph I. Dorfman. 1956. "SEPARATION OF Δ 4-5 α - AND Δ 4-5 β -HYDROGENASES FROM RAT LIVER HOMOGENATES." *Journal of Biological Chemistry* 223(1): 443–48.
- Fondo Colombiano de Enfermedades de Alto Costo, 2020. Link: <https://cuentadealtocosto.org/site/cancer/>
- Froestl, Wolfgang et al. 1995. "Phosphinic Acid Analogs of GABA. 1. New Potent and Selective GABAB Agonists." *Journal of Medicinal Chemistry* 38(17): 3297–3312.

- Frye, Stephen v et al. "Discovery and Development of GG745, a Potent Inhibitor of Both Isozymes of 5 α -Reductase." *Integration of Pharmaceutical Discovery and Development*: 393–422.
- Frye, Stephen v. et al. "Discovery and Development of GG745, a Potent Inhibitor of Both Isozymes of 5 α -Reductase." In *Integration of Pharmaceutical Discovery and Development*, Boston: Kluwer Academic Publishers, 393–422.
- Gelmann, Edward P. 2002. "Molecular Biology of the Androgen Receptor." *Journal of Clinical Oncology* 20(13): 3001–15.
- Genheden, Samuel, and Ulf Ryde. 2015. "The MM/PBSA and MM/GBSA Methods to Estimate Ligand-Binding Affinities." *Expert Opinion on Drug Discovery* 10(5): 449–61.
- Gill, SupreetKaur, AjayFrancis Christopher, Vikas Gupta, and Parveen Bansal. 2016. "Emerging Role of Bioinformatics Tools and Software in Evolution of Clinical Research." *Perspectives in Clinical Research* 7(3): 115.
- Grossmann, M. E., H. Huang, and D. J. Tindall. 2001. "Androgen Receptor Signaling in Androgen-Refractory Prostate Cancer." *JNCI Journal of the National Cancer Institute* 93(22): 1687–97.
- Gur, Serap, Philip J Kadowitz, and Wayne JG Hellstrom. 2013. "Effects of 5-Alpha Reductase Inhibitors on Erectile Function, Sexual Desire and Ejaculation." *Expert Opinion on Drug Safety* 12(1): 81–90.
- Habib, FK et al. 1998. "The Localisation and Expression of 5 Alpha-Reductase Types I and II MRNAs in Human Hyperplastic Prostate and in Prostate Primary Cultures." *Journal of Endocrinology* 156(3): 509–17.
- Hammes, Gordon G. 2002. "Multiple Conformational Changes in Enzyme Catalysis." *Biochemistry* 41(26): 8221–28.
- Han, Guangzhou et al. 2005. "Mutation of the Androgen Receptor Causes Oncogenic Transformation of the Prostate." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102(4): 1151–56.
- Han, Yufei et al. 2021. "Crystal Structure of Steroid Reductase SRD5A Reveals Conserved Steroid Reduction Mechanism." *Nature Communications* 12(1): 449.
- Hara, Takahito et al. 2008. "Androgen Receptor and Invasion in Prostate Cancer." *Cancer Research* 68(4): 1128–35.
- Heinlein, Cynthia A., and Chawnschang Chang. 2004. "Androgen Receptor in Prostate Cancer." *Endocrine Reviews* 25(2): 276–308.
- Henshall, S M et al. 2001. "Altered Expression of Androgen Receptor in the Malignant Epithelium and Adjacent Stroma Is Associated with Early Relapse in Prostate Cancer." *Cancer research* 61(2): 423–27.
- Huggins, C., and C. v. Hodges. 1972. "Studies on Prostatic Cancer: I. The Effect of Castration, Of Estrogen and of Androgen Injection on Serum Phosphatases in Metastatic Carcinoma of the Prostate." *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 22(4): 232–40.
- Huggins, Charles, and Clarence v Hodges. 1941. "Studies on Prostatic Cancer. I. The Effect of Castration, of Estrogen and of Androgen Injection on Serum Phosphatases in Metastatic Carcinoma of the Prostate*." *Cancer Research* 1(4): 293–97.
- Imperato-McGinley, J, and Y.-S Zhu. 2002. "Androgens and Male Physiology the Syndrome of 5 α -Reductase-2 Deficiency." *Molecular and Cellular Endocrinology* 198(1–2): 51–59.
- Jain, Ajay N. 2003. "Surflex: Fully Automatic Flexible Molecular Docking Using a Molecular Similarity-Based Search Engine." *Journal of Medicinal Chemistry* 46(4): 499–511.
- Jones, Gareth et al. 1997. "Development and Validation of a Genetic Algorithm for Flexible Docking 1 1 Edited by F. E. Cohen." *Journal of Molecular Biology* 267(3): 727–48.

- Joe BN. Clinical features, diagnosis, and staging of newly diagnosed breast cancer. In: UpToDate. Burstein HJ, Vora SR (eds.). Waltham, MA: UpToDate, 2019.
- Jumper, John et al. 2021. "Highly Accurate Protein Structure Prediction with AlphaFold." *Nature* 596(7873): 583–89.
- Kadigamuwa, Chamila C., Mapa S. T. Mapa, and Kandatege Wimalasena. 2016. "Lipophilic Cationic Cyanines Are Potent Complex I Inhibitors and Specific *in Vitro* Dopaminergic Toxins with Mechanistic Similarities to Both Rotenone and MPP⁺." *Chemical Research in Toxicology* 29(9): 1468–79.
- Kalyaanamoorthy, Subha, and Yi-Ping Phoebe Chen. 2014. "Modelling and Enhanced Molecular Dynamics to Steer Structure-Based Drug Discovery." *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 114(3): 123–36.
- Kempainen, J A, M v Lane, M Sar, and E M Wilson. 1992. "Androgen Receptor Phosphorylation, Turnover, Nuclear Transport, and Transcriptional Activation. Specificity for Steroids and Antihormones." *Journal of Biological Chemistry* 267(2): 968–74.
- Kolesinska, Zofia et al. 2014. "Changes Over Time in Sex Assignment for Disorders of Sex Development." *Pediatrics* 134(3): e710–15.
- KONDO, Kazu-Hiro et al. 1994. "Cloning and Expression of cDNA of Human Delta4-3-Oxosteroid 5beta-Reductase and Substrate Specificity of the Expressed Enzyme." *European Journal of Biochemistry* 219(1–2): 357–63.
- Koshland, D. E. 1963. "Correlation of Structure and Function in Enzyme Action." *Science* 142(3599): 1533–41.
- Krieger, Elmar, Sander B Nabuurs, and Gert Vriend. 2003. "Homology Modeling." *Methods of biochemical analysis* 44: 509–23.
- Kuntz, Irwin D. 1992. "Structure-Based Strategies for Drug Design and Discovery." *Science* 257(5073): 1078–82.
- Leach, A. R. (2001). *Molecular Modelling: Principles y Applications* (Vol. 1). Singapore: Prentice Hall.
- Labrie, Fernand. 2004. "Adrenal Androgens and Intracrinology." *Seminars in Reproductive Medicine* 22(04): 299–309.
- Lao, Kejing et al. 2017. "Design, Synthesis and Biological Evaluation of Novel Androst-3,5-Diene-3-Carboxylic Acid Derivatives as Inhibitors of 5 α -Reductase Type 1 and 2." *Steroids* 124: 29–34.
- Leach, Damien A. et al. 2015. "Stromal Androgen Receptor Regulates the Composition of the Microenvironment to Influence Prostate Cancer Outcome." *Oncotarget* 6(18): 16135–50.
- Lilja, H., and P.-A. Abrahamsson. 1988. "Three Predominant Proteins Secreted by the Human Prostate Gland." *The Prostate* 12(1): 29–38.
- Madersbacher, Stephan, Natalie Sampson, and Zoran Culig. 2019. "Pathophysiology of Benign Prostatic Hyperplasia and Benign Prostatic Enlargement: A Mini-Review." *Gerontology* 65(5): 458–64.
- Mandal, Soma, Mee'nal Moudgil, and Sanat K. Mandal. 2009. "Rational Drug Design." *European Journal of Pharmacology* 625(1–3): 90–100.
- McMANUS, J. M., and ROBERT M. HERBST. 1959. "Tetrazole Analogs of Amino Acids¹." *The Journal of Organic Chemistry* 24(11): 1643–49.
- McNaughton Collins, M. 1997. "Early Detection of Prostate Cancer. Serendipity Strikes Again." *JAMA: The Journal of the American Medical Association* 278(18): 1516–19.
- Mezei, Mihaly. 2003. "A New Method for Mapping Macromolecular Topography." *Journal of Molecular Graphics and Modelling* 21(5): 463–72.
- Mirone, Vincenzo et al. 2006. "Androgens and Benign Prostatic Hyperplasia." *European Urology Supplements* 5(4): 410–17.

- Mishra, Vinita, and C V S Siva Prasad. 2011. "Ligand Based Virtual Screening to Find Novel Inhibitors against Plant Toxin Ricin by Using the ZINC Database." *Bioinformation* 7(2): 46–51.
- Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, 30(16), 2785–2791.
- Myers, Scott, and Ann Baker. 2001. "Drug Discovery—an Operating Model for a New Era." *Nature Biotechnology* 19(8): 727–30.
- Ng M, Baradhi KM. Benign Prostatic Hyperplasia. [Updated 2022 May 8]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK558920/>
- Occhiato, Ernesto G., Antonio Guarna, Giovanna Danza, and Mario Serio. 2004. "Selective Non-Steroidal Inhibitors of 5 α -Reductase Type 1." *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 88(1): 1–16.
- Okuda, A, and K Okuda. 1984. "Purification and Characterization of Delta 4-3-Ketosteroid 5 Beta-Reductase." *Journal of Biological Chemistry* 259(12): 7519–24.
- Österberg, Fredrik et al. 2002. "Automated Docking to Multiple Target Structures: Incorporation of Protein Mobility and Structural Water Heterogeneity in AutoDock." *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 46(1): 34–40.
- Pagadala, Nataraj S., Khajamohiddin Syed, and Jack Tuszynski. 2017. "Software for Molecular Docking: A Review." *Biophysical Reviews* 9(2): 91–102.
- Pitman, Melissa R., and R. Ian Menz. 2006. "Methods for Protein Homology Modelling." In , 37–59.
- Prada-Gracia, Diego, Sara Huerta-Yépez, and Liliana M. Moreno-Vargas. 2016. "Application of Computational Methods for Anticancer Drug Discovery, Design, and Optimization." *Boletín Médico Del Hospital Infantil de México (English Edition)* 73(6): 411–23.
- QUIGLEY, CHARMIAN A. et al. 1995. "Androgen Receptor Defects: Historical, Clinical, and Molecular Perspectives*." *Endocrine Reviews* 16(3): 271–321.
- Rarey, Matthias, Bernd Kramer, Thomas Lengauer, and Gerhard Klebe. 1996. "A Fast Flexible Docking Method Using an Incremental Construction Algorithm." *Journal of Molecular Biology* 261(3): 470–89.
- Roehrborn, Claus G et al. 2002. "Efficacy and Safety of a Dual Inhibitor of 5-Alpha-Reductase Types 1 and 2 (Dutasteride) in Men with Benign Prostatic Hyperplasia." *Urology* 60(3): 434–41.
- . 2005. "Benign Prostatic Hyperplasia: An Overview." *Reviews in urology* 7 Suppl 9: S3–14.
- Russell, David W., and Jean D. Wilson. 1994a. "STEROID 5 α -REDUCTASE: TWO GENES/TWO ENZYMES." *Annual Review of Biochemistry* 63(1): 25–61.
- Russell, David W, and Jean D Wilson. 1994b. "Steroid 5 α -Reductase: Two Genes/Two Enzymes." *Annual Review of Biochemistry* 63: 25–61.
- Samuels, Leo T. et al. 1950. "METABOLISM OF TESTOSTERONE BY LIVERS OF DIFFERENT SPECIES OF ANIMALS." *Journal of Biological Chemistry* 183(1): 231–39.
- Schmidt, Lucy J., and Donald J. Tindall. 2011. "Steroid 5 α -Reductase Inhibitors Targeting BPH and Prostate Cancer." *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 125(1–2): 32–38.
- Schubbert, Suzanne. 2001. "Genotyping and Drug Response: Use of Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) versus Haplotypes to Predict Albuterol Efficacy." *AAPS PharmSci* 3(3): 1–2.
- Sèdes, Lauriane et al. 2018. "Cholesterol: A Gatekeeper of Male Fertility?" *Frontiers in Endocrinology* 9.

- Shacham, Sharon et al. 2001. "Mechanism of GnRH Receptor Signaling on Gonadotropin Release and Gene Expression in Pituitary Gonadotrophs." In , 63–90.
- SHI, Y. 2007. "Orphan Nuclear Receptors in Drug Discovery." *Drug Discovery Today* 12(11–12): 440–45.
- Shirakawa, Toshiro et al. 2004. "Messenger RNA Levels and Enzyme Activities of 5 Alpha-Reductase Types 1 and 2 in Human Benign Prostatic Hyperplasia (BPH) Tissue." *The Prostate* 58(1): 33–40.
- Silva-Ortiz, Aylin Viviana et al. 2015. "Synthesis and Activity of Novel 16-Dehydropregnenolone Acetate Derivatives as Inhibitors of Type 1 5 α -Reductase and on Cancer Cell Line SK-LU-1." *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 23(24): 7535–42.
- Šimková, Markéta, Jiří Heráček, Pavel Drašar, and Richard Hampl. 2021. "Determination of Intraprostatic and Intratesticular Androgens." *International Journal of Molecular Sciences* 22(1): 466.
- Sinnecker, Gernot H. G. et al. 1996. "Phenotypic Classification of Male Pseudohermaphroditism Due to Steroid 5 α -Reductase 2 Deficiency." *American Journal of Medical Genetics* 63(1): 223–30.
- Sipl, W. 2000. "Receptor-Based 3D QSAR Analysis of Estrogen Receptor Ligands--Merging the Accuracy of Receptor-Based Alignments with the Computational Efficiency of Ligand-Based Methods." *Journal of computer-aided molecular design* 14(6): 559–72.
- So, Alan I., Antonio Hurtado-Coll, and Martin E. Gleave. 2003. "Androgens and Prostate Cancer." *World Journal of Urology* 21(5): 325–37.
- Sperandio, Olivier, Maria A Miteva, Francois Delfaud, and Bruno O Villoutreix. 2006. "Receptor-Based Computational Screening of Compound Databases: The Main Docking-Scoring Engines." *Current protein & peptide science* 7(5): 369–93.
- Steinegger, Martin et al. 2019. "HH-Suite3 for Fast Remote Homology Detection and Deep Protein Annotation." *BMC Bioinformatics* 20(1): 473.
- Sung, Hyuna et al. 2021a. "Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries." *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 71(3): 209–49.
- . 2021b. "Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries." *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 71(3): 209–49.
- Suzuki, H, T Ueda, T Ichikawa, and H Ito. 2003. "Androgen Receptor Involvement in the Progression of Prostate Cancer." *Endocrine-related cancer*: 209–16.
- Tang, Yun, Weiliang Zhu, Kaixian Chen, and Hualiang Jiang. 2006. "New Technologies in Computer-Aided Drug Design: Toward Target Identification and New Chemical Entity Discovery." *Drug Discovery Today: Technologies* 3(3): 307–13.
- The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.2r3pre, Schrödinger, LLC.
- Thiele, Susanne, Ute Hoppe, Paul-Martin Holterhus, and Olaf Hiort. 2005. "Isoenzyme Type 1 of 5alpha-Reductase Is Abundantly Transcribed in Normal Human Genital Skin Fibroblasts and May Play an Important Role in Masculinization of 5alpha-Reductase Type 2 Deficient Males." *European Journal of Endocrinology* 152(6): 875–80.
- Thomas, Lynn N. et al. 2005. "Differential Alterations in 5 α -Reductase Type 1 and Type 2 Levels during Development and Progression of Prostate Cancer." *The Prostate* 63(3): 231–39.
- Tindall, Donald J., and Roger S. Rittmaster. 2008. "The Rationale for Inhibiting 5 α -Reductase Isoenzymes in the Prevention and Treatment of Prostate Cancer." *Journal of Urology* 179(4): 1235–42.
- Tong, Yu, and Ren-yuan Zhou. 2020. "Review of the Roles and Interaction of Androgen and Inflammation in Benign Prostatic Hyperplasia." *Mediators of Inflammation* 2020: 1–7.

- Traish, Abdulmageed M et al. 2011. "Adverse Side Effects of 5 α -Reductase Inhibitors Therapy: Persistent Diminished Libido and Erectile Dysfunction and Depression in a Subset of Patients." *The journal of sexual medicine* 8(3): 872–84.
- Trost, Landon, Theodore R Saitz, and Wayne J G Hellstrom. 2013. "Side Effects of 5-Alpha Reductase Inhibitors: A Comprehensive Review." *Sexual medicine reviews* 1(1): 24–41.
- Uemura, Motohide et al. 2007. "Novel 5 α -Steroid Reductase (SRD5A3, Type-3) Is Overexpressed in Hormone-Refractory Prostate Cancer." *Cancer Science* 0(0): 071106234520001-???
- Upreti, Rita et al. 2014. "5 α -Reductase Type 1 Modulates Insulin Sensitivity in Men." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 99(8): E1397–1406.
- Venkatachalam, C.M., X. Jiang, T. Oldfield, and M. Waldman. 2003. "LigandFit: A Novel Method for the Shape-Directed Rapid Docking of Ligands to Protein Active Sites." *Journal of Molecular Graphics and Modelling* 21(4): 289–307.
- Waterhouse, Andrew et al. 2018. "SWISS-MODEL: Homology Modelling of Protein Structures and Complexes." *Nucleic Acids Research* 46(W1): W296–303.
- Watkins, Jeff C., Povl Korgsgaard-Larsen, and Tage Honoré. 1990. "Structure-Activity Relationships in the Development of Excitatory Ammonium Acid Receptor Agonists and Competitive Antagonists." *Trends in Pharmacological Sciences* 11(1): 25–33.
- Weigel, Nancy L., and Nicole L. Moore. 2007. "Steroid Receptor Phosphorylation: A Key Modulator of Multiple Receptor Functions." *Molecular Endocrinology* 21(10): 2311–19.
- Whitacre, David C et al. 2002. "Androgen Induction of in Vitro Prostate Cell Differentiation." *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research* 13(1): 1–11.
- WILSON, JEAN D., JAMES E. GRIFFIN, and DAVID W. RUSSELL. 1993. "Steroid 5 α -Reductase 2 Deficiency." *Endocrine Reviews* 14(5): 577–93.
- Wirth, Matthias, Vincent Zoete, Olivier Michielin, and Wolfgang H. B. Sauer. 2013. "SwissBioisostere: A Database of Molecular Replacements for Ligand Design." *Nucleic Acids Research* 41(D1): D1137–43.
- Xiao, Qingpin et al. 2020a. "Structure of Human Steroid 5 α -Reductase 2 with Anti-Androgen Drug Finasteride." *Research square*.
- . 2020b. "Structure of Human Steroid 5 α -Reductase 2 with Anti-Androgen Drug Finasteride." *Research square*.
- Zhu, M.-L., and N. Kyprianou. 2008. "Androgen Receptor and Growth Factor Signaling Cross-Talk in Prostate Cancer Cells." *Endocrine Related Cancer* 15(4): 841–49.
- Zhu, Yuan-Shan, and Guang-Huan Sun. 2005. "5 α -Reductase Isozymes in the Prostate." *Journal of medical sciences (Taipei, Taiwan)* 25(1): 1–12.

9. Anexos

Tabla a. Resultados de interacción aminoacídica de los ligandos comerciales y los ligandos 16.

AMINOÁCIDOS-INTERACCIONES DE VAN DER WAALS															
Ligando	ALA120	PHE123	PHE221	PHE224	THR225	PHE228	LEU229	ARG232	ARG98	TIR102	MET119	TRP56	LEU19	GLN59	TIR38
D	1	1	1	1	1	1									
F						1	1		1	1					
16A	1	1				1						1	1		
16H	1	1				1						1			1
16I	1	1				1					1	1	1		
16J	1					1						1		1	

AMINOÁCIDOS-INTERACCIONES DE PUENTE DE HIDRÓGENO											
Ligando	LEU19	SER36	GLN59	GLU60	TIR102	GLY109	ALA120	ARG176	TIR199	SEU236	ARG242
D		1		1							
F				1							
16A	1										
16H			1				1				
16I											
16J							1				
NAD					1	1		1	1	1	1

AMINOÁCIDOS INTERACCIÓN PI-PI	
Ligando	TRP239
NAD	1

Tabla b. Resultados importantes de las propiedades ADME-T de cada ligando diseñado.

Ligando	Formula	MW (g/mol)	#H-bond donors	MR	TPSA (A)	Consensus Log P	BBB permeant	Lipinski #violations
Dutasterida	C ₂₃ H ₃₆ N ₂ O ₂	372.54	2	113.18	58.20	3.29	Yes	0
2d	C ₂₇ H ₃₄ NO ₆ P	499.54	3	134.41	114.90	3.65	No	0
1d	C ₂₇ H ₃₄ N ₂ O ₅ S	498.63	2	135.09	116.10	3.74	No	0
5d	C ₂₈ H ₃₄ N ₂ O ₅	478.58	3	131.96	96.89	3.92	No	0
3d	C ₂₇ H ₃₂ N ₂ O ₅	464.55	1	131.52	93.38	4.14	No	0
11d	C ₂₈ H ₃₃ N ₅ O ₃	487.59	2	136.43	102.02	4.32	No	1
2b	C ₂₆ H ₃₃ CINO ₄ P	489.97	3	133.35	96.44	4.32	No	1

2a	$C_{26}H_{33}ClNO_4P$	489.97	3	133.35	96.44	4.33	No	1
1a	$C_{26}H_{33}ClN_2O_3S$	489.07	2	134.04	97.64	4.34	No	0
1b	$C_{26}H_{33}ClN_2O_3S$	489.07	2	134.04	97.64	4.35	No	0
12d	$C_{28}H_{35}N_5O_3$	489.61	3	151.05	96.34	4.40	No	1
2c	$C_{26}H_{32}F_2NO_4P$	491.51	3	128.26	96.44	4.42	No	1
1c	$C_{26}H_{32}F_2N_2O_3S$	490.61	2	128.94	97.64	4.47	No	1
4d	$C_{29}H_{36}N_2O_4$	476.61	2	136.04	76.66	4.49	No	0
6d	$C_{29}H_{36}N_2O_4$	476.61	2	136.04	76.66	4.49	No	0
7d	$C_{28}H_{35}NO_5S$	497.65	1	137.19	90.08	4.59	No	0
5b	$C_{27}H_{33}ClN_2O_3$	469.02	3	130.90	78.43	4.73	No	1
5a	$C_{27}H_{33}ClN_2O_3$	469.02	3	130.90	78.43	4.74	No	1
3a	$C_{26}H_{31}ClN_2O_3$	454.99	1	130.47	74.92	4.82	No	1
3b	$C_{26}H_{31}ClN_2O_3$	454.99	1	130.47	74.92	4.83	No	1
5c	$C_{27}H_{32}F_2N_2O_3$	470.55	3	125.81	78.43	4.83	No	1
8d	$C_{28}H_{32}N_2O_3$	444.57	1	127.98	71.35	4.84	No	0
3c	$C_{26}H_{30}F_2N_2O_3$	456.52	1	125.38	74.92	4.91	No	1
9d	$C_{29}H_{35}NO_5$	477.59	1	134.32	73.86	4.91	No	1
10d	$C_{29}H_{35}NO_4$	461.59	1	133.23	64.63	4.97	No	1
11b	$C_{27}H_{32}ClN_5O$	478.03	2	135.38	83.56	4.99	No	1
11a	$C_{27}H_{32}ClN_5O$	478.03	2	135.38	83.56	5.01	No	1
12b	$C_{27}H_{34}ClN_5O$	480.04	3	150.00	77.88	5.10	No	1
11c	$C_{27}H_{31}F_2N_5O$	479.56	2	130.29	83.56	5.11	No	1
12a	$C_{27}H_{34}ClN_5O$	480.04	3	150.00	77.88	5.12	No	1
4b	$C_{28}H_{35}ClN_2O_2$	467.04	2	134.98	58.20	5.19	No	1
4a	$C_{28}H_{35}ClN_2O_2$	467.04	2	134.98	58.20	5.20	No	1
6a	$C_{28}H_{35}ClN_2O_2$	467.04	2	134.98	58.20	5.20	No	1
6b	$C_{28}H_{35}ClN_2O_2$	467.04	2	134.98	58.20	5.20	No	1
12c	$C_{27}H_{33}F_2N_5O$	481.58	3	144.91	77.88	5.25	No	1
7a	$C_{27}H_{34}ClNO_3S$	488.08	1	136.14	71.62	5.28	No	1
7b	$C_{27}H_{34}ClNO_3S$	488.08	1	136.14	71.62	5.29	No	1
4c	$C_{28}H_{34}F_2N_2O_2$	468.58	2	129.89	58.20	5.30	No	1

6c	$C_{28}H_{34}F_2N_2O_2$	468.58	2	129.89	58.20	5.31	No	1
7c	$C_{27}H_{33}F_2NO_3S$	489.62	1	131.04	71.62	5.37	No	1
8a	$C_{27}H_{31}ClN_2O$	435.00	1	126.92	52.89	5.54	No	1
8b	$C_{27}H_{31}ClN_2O$	435.00	1	126.92	52.89	5.56	No	1
9a	$C_{28}H_{34}ClNO_3$	468.03	1	133.27	55.40	5.61	No	1
9b	$C_{28}H_{34}ClNO_3$	468.03	1	133.27	55.40	5.61	No	1
8c	$C_{27}H_{30}F_2N_2O$	436.54	1	121.83	52.89	5.66	No	1
10a	$C_{28}H_{34}ClNO_2$	452.03	1	132.18	46.17	5.66	No	1
10b	$C_{28}H_{34}ClNO_2$	452.03	1	132.18	46.17	5.67	No	1
<i>Finasterida</i>	$C_{27}H_{30}F_6N_2O_2$	528.53	2	129.94	58.20	5.72	No	2
9c	$C_{28}H_{33}F_2NO_3$	469.56	1	128.17	55.40	5.73	No	1
10c	$C_{28}H_{33}F_2NO_2$	453.56	4	127.09	46.17	5.76	No	1

Tabla c. Resultados de energía de acoplamiento molecular y distancias entre el complejo ligando-cofactor.

<i>Primer grupo de ligandos</i>		
<i>Ligando</i>	Distancia	Energía de acoplamiento molecular (kcal/mol)
8b	5,43	-10.47
9b	5,49	-10.71
5b	5,5	-10.72
3c	5,73	-10.89
7d	5,73	-12.03
4a	5,86	-11.63
5d	5,92	10.87
10b	5,96	11.81
3b	5,97	-11.7
7b	6,15	-10.66
7c	6,15	-11.07
1b	6,16	-10.56

2b	6,16	9.96
1c	6,23	-10.78
6b	7,25	-11.44

Segundo grupo de ligandos

<i>Ligando</i>	Distancia	Energía de acoplamiento molecular (kcal/mol)	<i>Ligando</i>	Distancia	Energía de acoplamiento molecular (kcal/mol)
6a	8,01	-11.92	4c	11,4	-9.63
11a	8,61	-11.29	5c	12,45	-10.36
3a	8,65	-10.69	8c	12,45	-10.05
5a	8,72	-11.5	11c	13,47	-8.89
9a	8,97	-10.79	9c	13,71	-8.58
1a	9,01	-11.41	10c	13,71	-8.74
2a	9,33	-12.55	8d	7,34	11.13
7a	12,17	-11.3	4d	7,7	-10.53
8a	12,43		10d	8,53	-11.35
12a	12,54	-11.07	1d	8,73	-11.22
10a	12,56	-11.04	12d	8,77	-12.02
4b	7,88	-9.69	2d	8,79	-11.11
11b	7,97	-11.67	3d	8,81	-11.69
12b	8,61	-11.03	6d	12,71	-10.14
12c	7,46	-11.35	11d	13,83	-9.23
2c	7,66	-10.67	9d	14,16	-9.23
6c	10,05	-9.86			