

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**Estudio *in silico* de la interacción
entre la insulina glargina y los
receptores IR e IGF1R**

MARTHA MARGARITA GONZÁLEZ BELTRÁN

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS, DEPARTAMENTO DE QUIMICA
BOGOTÁ, COLOMBIA

2016

Estudio *in silico* de la interacción entre la insulina glargina y los receptores IR e IGF1R

MARTHA MARGARITA GONZÁLEZ BELTRÁN

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Bioquímica

DIRECTOR

PH.D CLAUDIO GÓMEZ ALEGRÍA

Profesor Asociado

Departamento de Farmacia

Facultad de Ciencias – Universidad Nacional de Colombia

Línea de Investigación:

Farmacología molecular y bioquímica

Grupo de Investigación:

UNIMOL

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

FACULTAD DE CIENCIAS

ÁREA CURRICULAR DE QUIMICA

BOGOTÁ, COLOMBIA

2016

Agradecimientos

Agradezco en primer lugar a Dios quien fue mi guía para el desarrollo de esta tesis y ha bendecido mi vida desde siempre. A mi familia, mi novio y en especial a mi abuela quien desde el cielo puede ver la culminación de esta tesis, ella siempre creyó mí y me apoyo inclusive durante su enfermedad para que lograra cumplir mis sueños. Al profesor Claudio Gómez Alegría, por su guía durante todo el proceso y por dedicar su conocimiento y tiempo para el correcto desarrollo de este trabajo. A los profesores Emiliano Barreto y Fabián López por su apoyo académico para la realización de esta tesis. A mis compañeros Edwin Reyes y Francisco Olea por su apoyo incondicional para la realización de este proyecto. Al maestro Víctor Castañeda, por su paciencia y consejos.

Gracias a todos los que me apoyaron y estuvieron acompañándome siempre.

Resumen

Introducción: La glargina es un análogo de la insulina utilizado para el tratamiento de la diabetes mellitus. Se ha reportado que este análogo presenta actividad mitogénica y que podría tener relación con cáncer en algunos pacientes. También se ha observado que este análogo es capaz de interactuar no sólo con el receptor de insulina (IR) sino también con el receptor del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF1R), y se ha sugerido que la actividad mitogénica pudiese estar mediada por IGF1R, lo que estimula el interés por conocer las bases estructurales de la interacción glargina-receptor, que se desconocen por completo. **Objetivo:** realizar un estudio estructural *in silico* de la interacción entre la glargina y los receptores IR e IGF1R. **Metodología:** En la base de datos PDB se buscaron las estructuras 3D reportadas para Glargina, IR e IGF1R, y se evaluó su calidad mediante el programa *Molprobit*. Luego, utilizando cuatro programas computacionales diferentes (ClusPro, SwarmDock, HADDOCK y AutoDock), se estudió mediante *docking* molecular la interacción de glargina con los receptores IR e IGF1R. **Resultados:** Se obtuvo un total de 637 modelos para el complejo glargina-IR y 807 para glargina-IGF1R. Aplicando criterios de selección basados en la estructura conocida de sistemas ligando-receptor análogos, se seleccionaron dos modelos finales para el complejo glargina-IR y dos para el complejo glargina-IGF1R, los que fueron descritos en términos de las interacciones implicadas. **Conclusión:** Se proponen modelos computacionales de la estructura 3D para los complejos glargina-IR y glargina-IGF1R.

Palabras claves: Glargina, Receptor insulina, Receptor IGF1R, *Docking* Molecular.

Abstract

Introduction: Glargine is an insulin analog used for treatment of diabetes mellitus. It has been reported that this analog has mitogenic activity that could be related to cancer in some patients. It has also been observed that this analogue is able to interact not only with the insulin receptor (IR) but also with the insulin-like growth factor 1 receptor (IGF1R), and it has been suggested that the mitogenic activity could be mediated by IGF1R which stimulates the interest to know the structural basis of glargine-receptor interaction that are completely unknown. **Objective:** To conduct a study in silico of structural interaction between glargine and receptors IR and IGF1R. **Methodology:** 3D structures PDB data reported for Glargine, IR and IGF1R were sought, and its quality was evaluated using Molprobity suite. Then, using four different computer programs (ClusPro, SwarmDock, Haddock and AutoDock), glargine interaction with receptors IR and IGF1R was studied by molecular docking. **Results:** A total of 637 models for the glargine-IR complex and 807 for glargine-IGF1R was obtained. Applying selection criteria based on the known structure of analogues ligand-receptor systems, two final models for glargine-IR complex and two-IGF1R for glargine complex were selected and described in terms of the interactions involved. **Conclusion:** 3D computer models for complex structure glargine-IR and glargine-IGF1R are proposed.

Key words: Glargine, insulin receptor, IGF1R receptor, Molecular Docking.

Contenido

	Pág.
Resumen	IV
Abstract	IV
Lista de figuras	VIII
Lista de tablas	X
Lista de Símbolos y abreviaturas	XI
Introducción	12
Planteamiento del problema:	13
Objetivos.....	15
1. MARCO TEORICO	16
1.1 Insulina.....	16
1.1.1 Estructura	16
1.1.2 Secreción de insulina.....	18
1.1.3 Acciones de la Insulina	20
1.2 Análogos de insulina	22
1.3 Familia de receptores tirosin-quinasa (RTKs).....	27
1.3.1 Receptor de insulina (IR)	28
1.3.2 Receptor de factor de crecimiento insulínico (IGF1R).....	33
1.4 Docking	37
1.4.1 <i>Docking</i> proteína-proteína	38
1.4.2 Puntaje de las Predicciones.....	41
1.4.3 Evaluación de los Métodos de <i>docking</i>	42
1.4.4 Servidores en línea más utilizados para la realización de <i>docking</i>	43
2. Materiales y métodos	48
2.1 Materiales:.....	48
2.2 Métodos:	49
2.2.1 Búsqueda y recopilación de estructuras	49
2.2.2 Evaluación de la calidad estructural de las moléculas utilizadas.....	50
2.2.3 Preparación de las estructuras	51
2.2.4 Docking	51
2.2.5 Criterios de selección de modelos finales	53
2.2.6 Visualización de estructuras	54

2.2.7	Comparación de los modelos obtenidos	54
2.2.8	Superposición de estructuras 3D	55
3.	RESULTADOS	56
3.1	Moléculas utilizadas en el estudio	56
3.2	Evaluación de la Calidad de las estructuras 3D utilizadas.	58
3.3	Interacción Glargina-Receptor de insulina (IR)	63
3.4	Interacción glargina-Receptor IGF1R	70
3.5	Diferencias y similitudes estructurales entre los modelos obtenidos.....	78
3.6	Superposición de estructuras	81
4.	Discusión.....	86
5.	Conclusiones y recomendaciones.....	92
A.	Anexo: Figuras	94
	Bibliografía	96

Lista de figuras

Figura 1-1: Insulina.....	17
Figura 1-2: Estructura 3D de la insulina.....	17
Figura 1-3: Esquema de la secreción de la insulina en las células β del páncreas	20
Figura 1-4: Vía de señalización de la insulina.....	21
Figura 1-5: Análogos de acción rápida.	23
Figura 1-6: Insulina Glargina.	25
Figura 1-7: Estructura de la glargina y sus metabolitos M1 y M2.....	26
Figura 1-8: Topología global de los RTK	28
Figura 1-9: Subunidades α y β del receptor de insulina.	29
Figura 1-10: Receptor de Insulina.....	30
Figura 1-11: Ectodominio del receptor IR	31
Figura 1-12: Dominio extracelular del receptor IR donde se encuentran los Sitios 1 y 2 de unión a insulina	32
Figura 1-13: Residuos importantes para la interacción de insulina con su receptor (IR). 33	
Figura 1-14: Receptor IFG1R.	34
Figura 1-15: Receptor IR y sus isoformas IRA e IRB, Receptor IGF1R y receptores híbridos.	35
Figura 1-16: Sitios de unión de IGF1 al receptor IGF1R.	36
Figura 1-17: Tipos de docking molecular	37
Figura 1-18: Organización esquemática de un método típico de docking	39
Figura 1-19: Esquema general del algoritmo de ClusPro.....	44
Figura 1-20: Esquema general del algoritmo de SwarmDock..	46
Figura 3-1: Estructura 3D de la glargina (PDB: 4IYD).....	56
Figura 3-2: Estructura 3D receptor IR. PDB ID: 3W11	57
Figura 3-3: Estructura 3D receptor IGF1R PDB: 1IGR.....	58
Figura 3-4: Gráfico de Ramachandran para Glargina (4IYD).....	59
Figura 3-5: Gráfico de Ramachandran para IR (3W11).	60
Figura 3-6: Gráfico de Ramachandran para IGF1R (1IGR)	61
Figura 3-7: Modelos computacionales finales propuestos para el complejo Glargina-IR. 64	
Figura 3-8: Modelo glargina-IR (ClusPro modelo 004.09).....	65
Figura 3-9: Superficie de contacto en el modelo glargina-IR (ClusPro modelo 004.09) . 66	
Figura 3-10: Modelo glargina-IR (SwarmDock modelo 7d)	67
Figura 3-11: Superficie de contacto del modelo glargina-IR (SwarmDock modelo 7d)... 69	

Figura 3-12: Modelos computacionales seleccionados para el complejo Glargina-Receptor IGF1R.	71
Figura 3-13: Superficie de contacto involucrando el dominio L1 de IGF1R en el modelo con glargina (Swarmdock 38a)	73
Figura 3-14: Superficie de contacto del dominio CR de IGF1R en el modelo con glargina (Swarmdock 38a)	73
Figura 3-15: Superficie de contacto del dominio L1 de IGF1R en complejo con glargina (Swarmdock 55b)	76
Figura 3-16: Superficie de contacto del dominio CR de IGF1R en complejo con glargina (Swarmdock 55b)	76
Figura 3-17: Resumen de modelos teóricos 3D obtenidos	79
Figura 3-18: Estructuras 3D de insulina y de glargina.....	81
Figura 3-19: Superposición de las estructuras 3D de insulina y glargina	82
Figura 3-20: Estructuras 3D de glargina y del factor de crecimiento IGF1	83
Figura 3-21: Superposición de las estructuras 3D de glargina e IGF1	84
Figura 3-22: Estructuras 3D del receptor IR y del receptor IGF1R.....	84
Figura 3-23: Superposición de las estructuras 3D del receptor IR y el receptor IGF1R.	85

Lista de tablas

Tabla 1-1: Farmacocinética de los análogos de la insulina	22
Tabla 1-2: Evaluación de desempeño de los servidores en línea en el encuentro de CAPRI 2014	43
Tabla 3-1: Análisis geométricos y de torsión de la glargina (PDB: 4IYD)	59
Tabla 3-2: Análisis geométricos y de torsión del receptor de la insulina IR (PDB: 3W11)	60
Tabla 3-3: Análisis geométricos y de torsión del IFG1R (PDB: 1IGR).....	61
Tabla 3-4: Residuos del “sitio 1” de unión del IR y su resultado de acuerdo a Ramachandran plot.	62
Tabla 3-5: Análisis geométrico y de torsión del IFG1R.....	63
Tabla 3-6: Modelos computacionales de la interacción glargina-Receptor IR.	63
Tabla 3-7: Interacciones del complejo glargina-receptor IR (modelo 004.09 de ClusPro).	65
Tabla 3-9: Interacciones del complejo glargina-IR (modelo 7d de SwarmDock).....	68
Tabla 3-10: Resumen de interacciones del modelo 7d.....	70
Tabla 3-11: Selección de modelos de la interacción glargina-Receptor IGF1R.....	70
Tabla 3-12: Interacciones en el modelo glargina-IGF1R (modelo 38a de SwarmDock)..	72
Tabla 3-13: Resumen interacciones modelo 38a.	74
Tabla 3-14: Residuos de contacto del complejo glargina-IGF1R (modelo 55b de SwarmDock).....	75
Tabla 3-15: Resumen interacciones modelo 55b.	77
Tabla 3-16: Valores de ΔG y K_d de todos los modelos 3D finales obtenidos.	80

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolos con letras latinas

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
Ln	Logaritmo natural	1	EC (3.1) EC (3.2)
mM	MiliMolar	10^{-3} molar	Sec 1.1.1 y 1.1.2
nM	NanoMolar	10^{-9} molar	Sec 1.3.1
R	Constante de los gases	J/mol·K	EC (3.1) EC (3.2)
T	Temperatura	K	EC (3.1) EC (3.2)

Símbolos con letras suecas

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
Å	Angstrom	10^{-10} m	Distancia molecular

Símbolos con letras griegas

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
ΔG	Energía libre Gibbs	J/mol	EC (3.1) EC (3.2)

Subíndices

Subíndice	Término
K_d	Constante de disociación
K_m	Constante Michaelis-Menten

Superíndices

Superíndice	Término
e^x	Euler a la x potencia

Introducción

Este trabajo representa un primer intento de acercamiento a un problema bioquímico relacionado con la interacción entre el análogo de insulina glargina y dos receptores con los que interactúa diferencialmente a nivel celular, a saber, los receptores IR e IGF1R. Desde el punto de vista clínico, el estudio de este problema pudiese tener importantes implicaciones porque el uso del análogo glargina ha sido relacionado con el desarrollo de cáncer en individuos diabéticos sometidos a terapia farmacológica con este tipo de medicamentos, aunque dicha relación parece estar en entredicho por los últimos estudios en el campo. Lo que sí parece estar claro es que glargina tiene efectos mitogénicos sobre células en cultivo, efectos que serían más dependientes del receptor IGF1R que del receptor IR.

Lo anterior nos lleva a indagar en las bases bioquímicas de la interacción ligando-receptor. Así, a través de la aplicación de herramientas computacionales, en el presente trabajo se proponen hipotéticos modelos estructurales 3D para los complejos binarios glargina-IR y glargina-IGF1R, los que son analizados desde el punto de vista de las interacciones establecidas entre el ligando y el receptor.

Planteamiento del problema:

La diabetes es una enfermedad crónica que aparece cuando el páncreas no produce insulina suficiente (Diabetes Mellitus tipo 1) o cuando el organismo no utiliza eficazmente la insulina que produce (Diabetes mellitus tipo 2) (Kenneth & Polonsky, 2012). Entre las aproximaciones farmacoterapéuticas de la diabetes se encuentra el uso de insulina humana, una hormona peptídica secretada por las células β del páncreas, y el uso de análogos de la insulina, que son moléculas derivadas de insulina al reemplazarle algunos aminoácidos, lo que provoca cambios en sus propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas. Los análogos de insulina se clasifican en dos grupos dependiendo de sus propiedades farmacocinéticas: análogos de acción rápida y análogos de acción prolongada. Uno de los análogos de acción prolongada más utilizados es la glargina, en la cual se centra este estudio. A nivel subcutáneo la glargina forma microprecipitados, y es liberada al torrente sanguíneo por medio de degradación proteolítica, lo que genera metabolitos activos conocidos como metabolitos M1 y M2.

Tanto insulina como glargina actúan a través del receptor insulínico (IR), un receptor perteneciente a la familia de receptores del tipo tirosin-quinasa (RTKs), el cual está involucrado en vías de señalización que llevan al consumo de glucosa y a proliferación celular en los tejidos sensibles a la hormona. Sin embargo, la insulina y sus análogos también tienen la capacidad de unirse a otros receptores de la misma familia, como el receptor del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF1R), promoviendo vías metabólicas y mitogénicas (Drejer, 1992; Sliker *et al*, 1997; Kurtzhals *et al*, 2000; Ciaraldi *et al.*, 2001; Vajo *et al.*, 2001; Rakatzi *et al.*, 2003; Jensen and De Meyts, 2009; Sica *et al*, 2012). Recientemente se ha sugerido que el uso de glargina podría estar relacionado con cáncer en pacientes bajo terapia con este análogo (Hemkens *et al*, 2009; Jonasson *et al*, 2009; Sica *et al*, 2012), aunque otros trabajos descartan dicha posibilidad, lo cual ha generado toda una controversia en relación con este tema (Colhoun, 2009; Suissa *et al*, 2011, Ruitter *et al*, 2012;). Un trabajo reciente de nuestro grupo no encontró asociación entre el uso de análogos de insulina y la presencia de cáncer (Ardila-Muñoz, 2014).

Estudios *in vitro* han mostrado que altas dosis de glargina promueven mitogénesis en líneas celulares en cultivo (Ciaraldi & Sasaoka, 2011; Liu *et al*, 2011). También se ha observado que la glargina interactúa tanto con el receptor IR como con IGF1R, y se ha sugerido que el incremento de la mitogénesis inducido por glargina estaría mediado por el

receptor IGF1R (Varewijck *et al*, 2010; Ciaraldi & Sasaoka, 2011). Además, se ha propuesto que las modificaciones estructurales de los análogos podrían afectar el balance entre la activación de rutas metabólicas y mitogénicas mediado por esta familia de receptores (Sciacca *et al*, 2012; Varewijck & Janssen, 2012).

Desde el punto de vista bioquímico, la explicación de tales observaciones podría radicar en las bases estructurales de la interacción glargina-receptor, algo que se desconoce por ahora. Se conoce la estructura 3D del complejo insulina-receptor IR y también se conoce algo de la interacción IGF1-receptor IGF1R, pero no existe información estructural de los complejos de glargina con ninguno de los dos receptores. Este trabajo representa un primer intento de acercamiento de nuestro grupo hacia el problema de conocer la estructura de los complejos glargina-IR y glargina-IGF1R, y las bases estructurales de las interacciones implicadas.

Dada la similitud estructural entre los ligandos implicados en la activación de estos receptores (glargina, insulina, y el factor de crecimiento IGF1) y dada también la similitud estructural entre los receptores IR e IGF1R, planteamos la hipótesis de que los complejos de glargina con los receptores IR e IGF1R deberían compartir características estructurales no sólo entre ellos sino también con las de los complejos homólogos insulina-receptor IR, cuya estructura 3D ya se conoce, e IGF1-receptor IGF1R, cuyo conocimiento es limitado. Tomando como base el conocimiento que se tiene de los complejos homólogos, pensamos que la estructura desconocida de los complejos glargina-IR y glargina-IGF1R puede ser predicha por métodos computacionales, lo que nos permitiría acercarnos a conocer las bases estructurales de tales interacciones.

Con este trabajo intentamos responder la siguiente pregunta de investigación:

¿Cuáles son las hipotéticas estructuras 3D para los complejos glargina-receptor IR y glargina-receptor IGF1R?

Estudios *in silico* de este tipo son empleados en la industria farmacéutica para el desarrollo de nuevos fármacos, y podrían tener un impacto futuro en el desarrollo de nuevos análogos de insulina (De meyts, 2004; Varewijck *et al*, 2010; Varewijck & Janssen, 2012).

Objetivos

Objetivo general

Realizar un estudio estructural *in silico* de la interacción entre la glargina y los receptores IR e IGF1R.

Objetivos específicos

1. Analizar y preparar las biomoléculas a utilizar en el estudio.
2. Analizar la interacción *in silico* entre glargina y el receptor IR mediante *docking* molecular.
3. Analizar la interacción *in silico* entre glargina y el receptor IGF1R mediante *docking* molecular.
4. Establecer las posibles diferencias o similitudes estructurales entre los modelos *in silico* obtenidos.

1. MARCO TEORICO

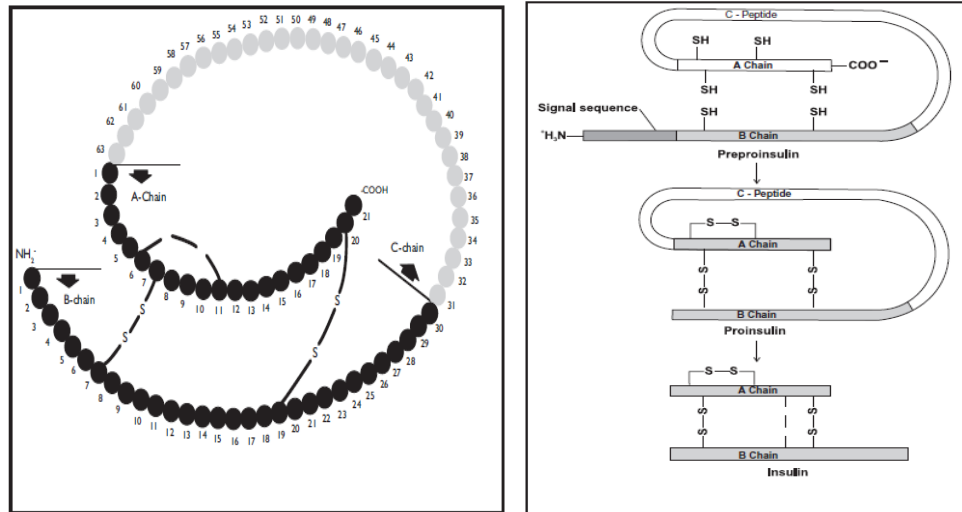
1.1 Insulina

1.1.1 Estructura

La insulina es una hormona peptídica de 51 aminoácidos formada por dos cadenas de aminoácidos (una cadena A de 21 aminoácidos, y una cadena B de 30 aminoácidos) que se encuentran unidas entre sí de manera covalente a través de dos puentes disulfuro (**Figura 1-1 panel Izquierdo.**) (Vardanyan & Hurby, 2006). La hormona es sintetizada en el páncreas por las células β de los islotes de Langerhans en forma de preproinsulina, la que por acción enzimática es convertida en proinsulina (**Figura 1-1 panel Derecho.**).

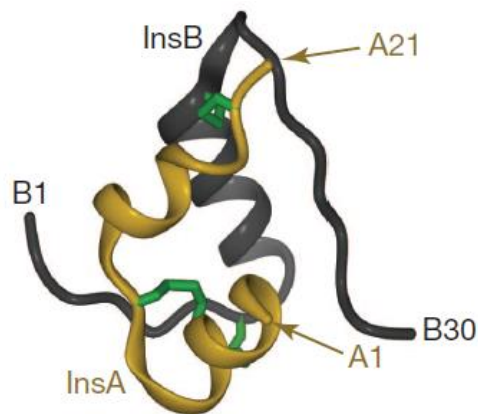
Las formas precursoras de la insulina tienen una tercera cadena conocida como el péptido C, de 33 aminoácidos, que conecta las cadenas A y B. La proinsulina es transportada al aparato de Golgi, desde donde sale en vesículas secretoras. La conversión de proinsulina a insulina se lleva a cabo por acción de las convertasas 2 y 3, y de la carboxi peptidasa H.

Figura 1-1: Insulina. Panel Izquierdo. Estructura de la proinsulina. Las cadenas A y B se representan en color negro y el Péptido C en color gris. Panel Derecho. Biosíntesis de la insulina. Imagen tomada de Shashank *et al*, 2007.



La estructura secundaria de la insulina consiste en tres hélices α unidas por puentes disulfuro que van de los residuos A1-A8, A12-A18 y B9-B19, las cuales se pliegan tridimensionalmente formando la estructura terciaria mostrada en la **Figura 1-2**.

Figura 1-2: Estructura 3D de la insulina. La cadena A se representa en color amarillo, la cadena B en color gris y los puentes disulfuro en color verde. Imagen tomada de Menting *et al*, 2013.



La estructura 3D de la insulina monomérica se demostró por primera vez por medio de cristalografía de rayos X en 1926 (Abel, 1926). Cuarenta años más tarde, se resolvió la estructura de la insulina hexamérica que contiene zinc (Blundell *et al*, 1971; Blundell *et al*, 1972). Estudios de NMR 2D también han contribuido al conocimiento de las conformaciones monomérica, dimérica y hexamérica de la insulina. Los monómeros tienden a formar dímeros cuando la concentración de insulina aumenta, y en presencia de zinc y pH favorable (10mM Zn⁺⁺, pH~6,0) los monómeros se ensamblan para formar conformaciones de orden superior (hexámeros) mediante las cuales la insulina se almacena dentro de las células β del páncreas. Una vez que los hexámeros se secretan del páncreas hacia el torrente sanguíneo, la repulsión electrostática y la disminución de la concentración de la insulina permite la disociación a su forma monomérica, que es la forma activa.

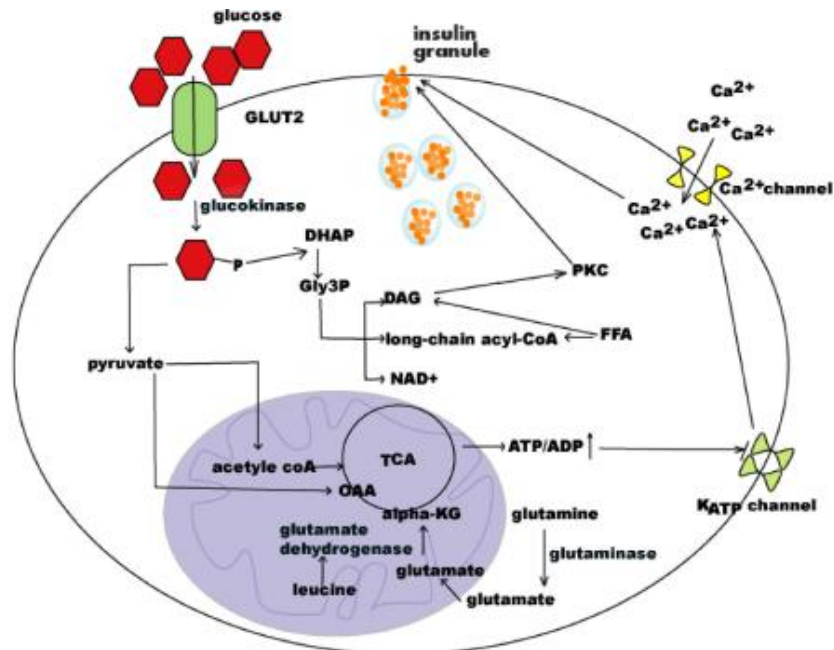
La estructura terciaria del monómero de insulina está altamente organizada y estabilizada por interacciones de la cadena lateral de aminoácidos específicos. Algunos residuos de la cadena A (IleA2, ValA3, CysA6-CysA11 y LeuA13), y otros residuos de la cadena B (PheB1, ValB12, ValB18, LeuB15 y PheB24) comprenden el núcleo hidrofóbico de la estructura monomérica. Por otro lado, la torsión de los residuos GlyB20-GlyB23 de la cadena B permiten el plegamiento de los residuos PheB24-ArgB32, son conservados evolutivamente y al parecer son de gran importancia para la determinación de la afinidad de la insulina por su receptor (receptor de insulina o receptor IR por sus siglas en inglés). Algunos estudios revelaron que los aminoácidos conservados evolutivamente de la cadena A son: GlyA1, IleA2, ValA3, GluA4TyrA19, CysA20, AsnA21 y de la cadena B son: glyB23, PheB24, PheB25 y TyrB26 (Pullen *et al*, 1976). El residuo A21 y los que se encuentran en la región comprendida entre B23 y B25 aumentan la afinidad por el receptor (De meys, 2004). Por otro lado, varias mutaciones fueron identificadas en estas regiones que reducen la afinidad por el receptor, incluyendo PheB25, PheB24 y ValA3. Los pacientes que albergan estas mutaciones muestran hiperinsulinemia (Kwok *et al*, 1983; Nanjo *et al*, 1986).

1.1.2 Secreción de insulina

La insulina es secretada por las células β del páncreas en respuesta a varios estímulos, como glucosa, arginina, y sulfonilureas, pero el principal determinante de su secreción es

el aumento de la glucosa en sangre. Las células β del páncreas presentan en su membrana celular el transportador de glucosa GLUT2, que transporta glucosa hacia el interior celular mediante difusión facilitada. GLUT2 también se expresa en el hígado y en menor medida en células de absorción renales e intestinales. A diferencia de otros transportadores de glucosa como GLUT4, que se expresa principalmente en músculo y células adiposas, la movilización de GLUT2 a la membrana plasmática es independiente de insulina. Después de que la glucosa entra en las células β , es fosforilada por la glucoquinasa que se expresa sólo en cuatro tipos de células en mamíferos (células hepáticas, células β pancreáticas, enterocitos, y neuronas sensibles a la glucosa) (Suckale & Solimena, 2008). Esta glucoquinasa posee dos propiedades que la distinguen de otras y que le permiten funcionar como sensor de los niveles de glucosa en las células β : (i) su baja K_m (K_m : 6 I/L) y (ii) no se inhibe por producto, permitiendo una actividad continuada a pesar de una alta glucólisis. La glucoquinasa es pues el paso limitante de la velocidad en el metabolismo de la glucosa de las células β y se considera que es un sensor de glucosa importante (Suckale & Solimena, 2008). El producto final de la glucólisis es piruvato, sustrato que luego se oxida a través del ciclo del ácido tricarbóxico en las mitocondrias de las células β para producir ATP. El aumento la relación ATP/ADP producto del metabolismo de la glucosa produce secuencialmente el cierre de los canales de potasio dependientes de ATP (K_{ATP}) y por lo tanto la despolarización de la membrana celular. Esta despolarización promueve la apertura de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, la afluencia de Ca^{2+} y finalmente la activación de la exocitosis de los gránulos que contienen insulina. Así, la hormona es liberada al torrente sanguíneo y transportada hacia los tejidos sensibles en donde efectúa su acción mediada por el receptor de la insulina (Shashank et al, 2007) (**Figura 1-3**).

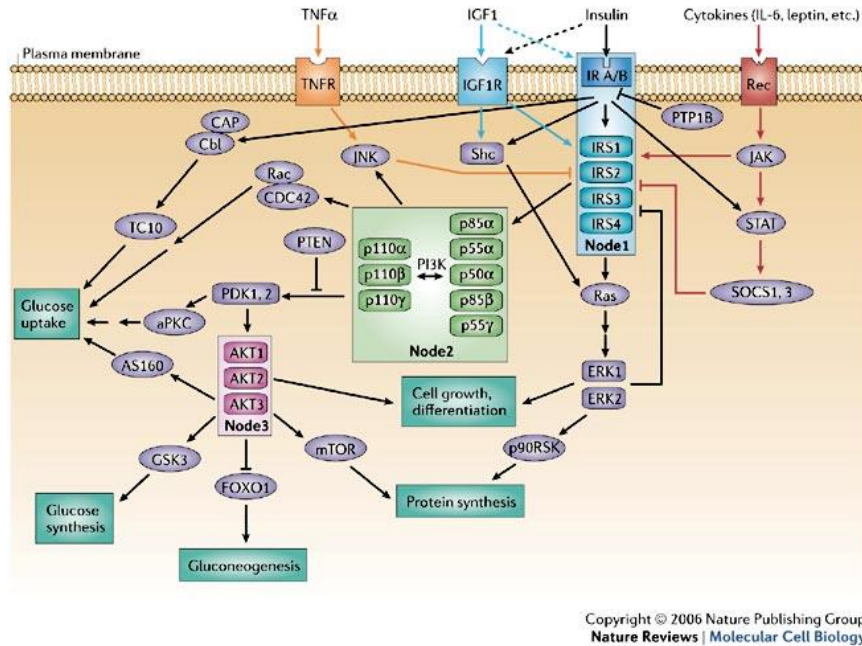
Figura 1-3: Esquema de la secreción de la insulina en las células β del páncreas. Imagen tomada de Zhuo *et al*, 2013



1.1.3 Acciones de la Insulina

Cuando la insulina llega a las células del tejido blanco se une al receptor IR produciendo su activación y autofosforilación en residuos de tirosina localizados en la parte intracelular del receptor; esto desencadena una cascada de señalización intracelular (**Figura 1-4**) que conduce a cambios metabólicos, expresión de genes y a crecimiento y diferenciación celular. (Saltiel & Pessin, 2002).

Figura 1-4: Vía de señalización de la insulina. Imagen tomada de Taniguchi *et al*, 2006.



En tejido adiposo y músculo, la insulina aumenta la tasa de transporte de glucosa a través de la membrana celular, aumenta la velocidad de la glucólisis y estimula la tasa de síntesis de glucógeno, esto último también en hígado; paralelamente, inhibe la gluconeogénesis y la degradación del glicógeno.

En cuanto al metabolismo de lípidos, estimula la captación celular y la síntesis de ácidos grasos y de triglicéridos en los tejidos, aumenta la tasa de formación de lipoproteína de muy baja densidad en el hígado, y aumenta la absorción de triglicéridos de la sangre en el tejido adiposo y el músculo, disminuye la velocidad de la lipólisis en el tejido adiposo y por lo tanto reduce el nivel de ácidos grasos en plasma, disminuye la velocidad de oxidación de ácidos grasos en el músculo e hígado (Newsholme & Dimitriadis , 2001).

La insulina también regula el metabolismo de proteínas, aumentando la velocidad de transporte de algunos aminoácidos en los tejidos, aumentando la velocidad de la síntesis de proteínas en el músculo, tejido adiposo, hígado y otros tejidos y disminuyendo la tasa

de degradación de proteínas en el músculo y también disminuyendo la velocidad de formación de urea (Newsholme & Dimitriadis , 2001).

1.2 Análogos de insulina

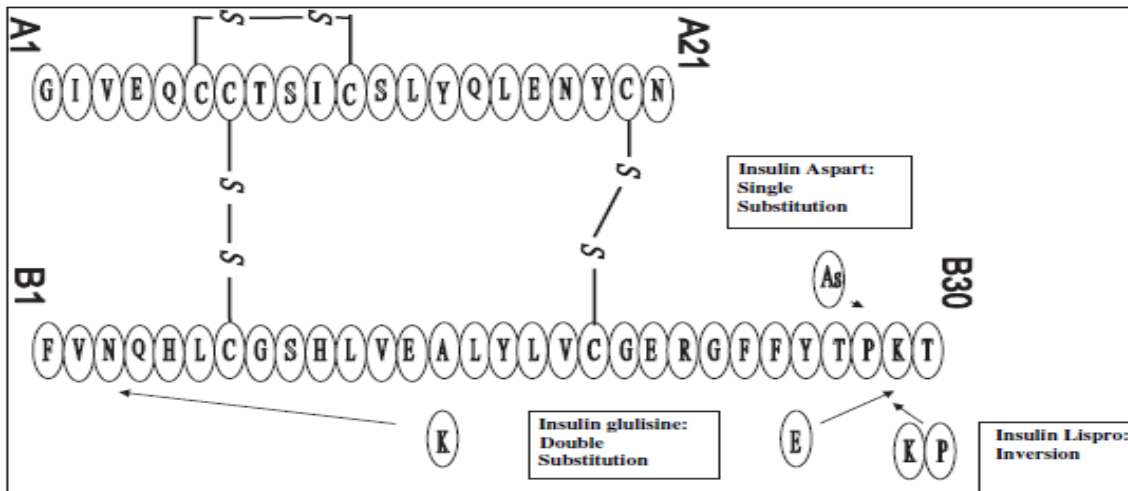
Los análogos de insulina son moléculas homólogas a la insulina que fueron desarrolladas por medio de tecnología de ADN recombinante realizando mutaciones puntuales en la insulina humana. Al igual que la insulina, estas moléculas se unen al receptor IR y son capaces de imitar la acción de la insulina. Estos análogos tienen diferencias en su perfil farmacocinético, clasificándose según dicho perfil en análogos de acción rápida y análogos de acción prolongada (**Tabla 1-1**).

Tabla 1-1: Farmacocinética de los análogos de la insulina. Tomada de Sansone, 2006.

Análogo	Comienzo de acción	Pico	Duración de acción
Lyspro	5 - 15 min	1 - 1,5 h	3 - 5 h
Aspart	5 - 15 min	1 - 2 h	3 - 5 h
Glulisina	5 - 15 min	1 - 1,5 h	3 - 5 h
Glargina	2 - 4 h	Mínima	20 - 24 h
Detemir	2 - 4 h	6 a 14 h	16 - 20 h
Regular	30 - 60 min	2 - 3 h	5 - 8 h
¹ NPH	2 - 4 h	4 - 10 h	10 - 16 h

- **Análogos de acción rápida (prandiales):** Los análogos de acción rápida, tienen un comienzo de acción rápido (5-15 min) y una duración corta (3-5 h). Los cambios estructurales conducentes a estos análogos se realizan en la porción B26-B30 de la insulina, y tienden a inhibir la formación de dímeros y hexámeros. El primer análogo de acción rápida disponible fue Lispro, cuya secuencia de aminoácidos se obtiene de la inversión de la secuencia Pro28-Lys29 de la cadena B por Lys28-Pro29 (**Figura 1-5**). Esta inversión provoca una menor tendencia a la asociación, dando lugar a una absorción más rápida de la insulina monomérica. Los estudios farmacocinéticos han demostrado que la insulina lispro tiene actividad máxima en aproximadamente 1 h y duración de la acción entre 3 y 5 h (**Tabla 1-1**) (Sheldon *et al*, 2008).

Figura 1-5: Análogos de acción rápida producto de la modificación de algunos aminoácidos de la insulina. Imagen tomada de Sheldon *et al*, 2008



El segundo análogo disponible de acción rápida fue la insulina Aspart resultante de la sustitución de la prolina en la posición B28 por ácido aspártico (**Figura 1-5**) reduciendo la auto-asociación de la molécula y permitiendo una formación débil de dímeros y hexámeros (Sheldon *et al*, 2008). Aspart se absorbe el doble de rápido que la insulina regular, alcanza una concentración máxima en plasma de aproximadamente dos veces al de la insulina humana y su perfil de actividad es muy similar a la de lispro.

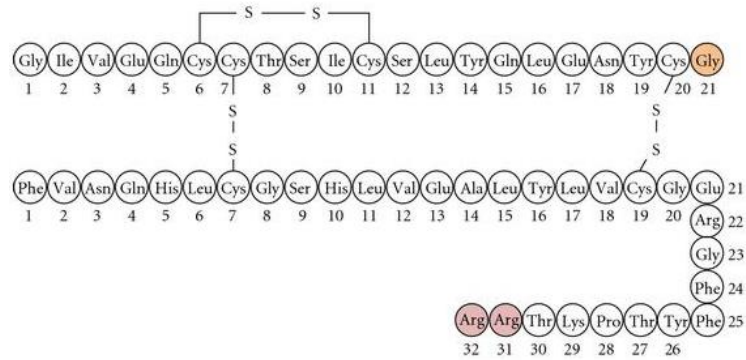
El tercer análogo de acción rápida que se aprobó fue la glulisina, en la que de la lisina y el ácido glutámico son sustituidos por asparagina y glicina en las posiciones B3 y B29, respectivamente (**Figura 1-5**). Los estudios indican que glulisina tiene un perfil farmacodinámico igual al de lispro.

- **Análogos de acción prolongada (Basales):** Estos análogos simulan la liberación de insulina basal que ocurre durante la noche o entre las comidas. Estos análogos se caracterizan por tener un inicio de acción lenta (2-4 h) y una duración de la acción mucho más prolongada (16-24 h) (**Tabla 1-1**). A este grupo pertenecen los siguientes análogos:

Detemir: resulta de la eliminación de la treonina en posición 30 de la cadena B y la adición de una cadena de ácido graso de 14 carbonos en el aminoácido 29 de la cadena B. La acción prolongada de la insulina detemir se debe a que las modificaciones en la cadena B hacen que las moléculas estén fuertemente asociadas entre sí y unidas a la albúmina a través de la cadena de ácido graso.

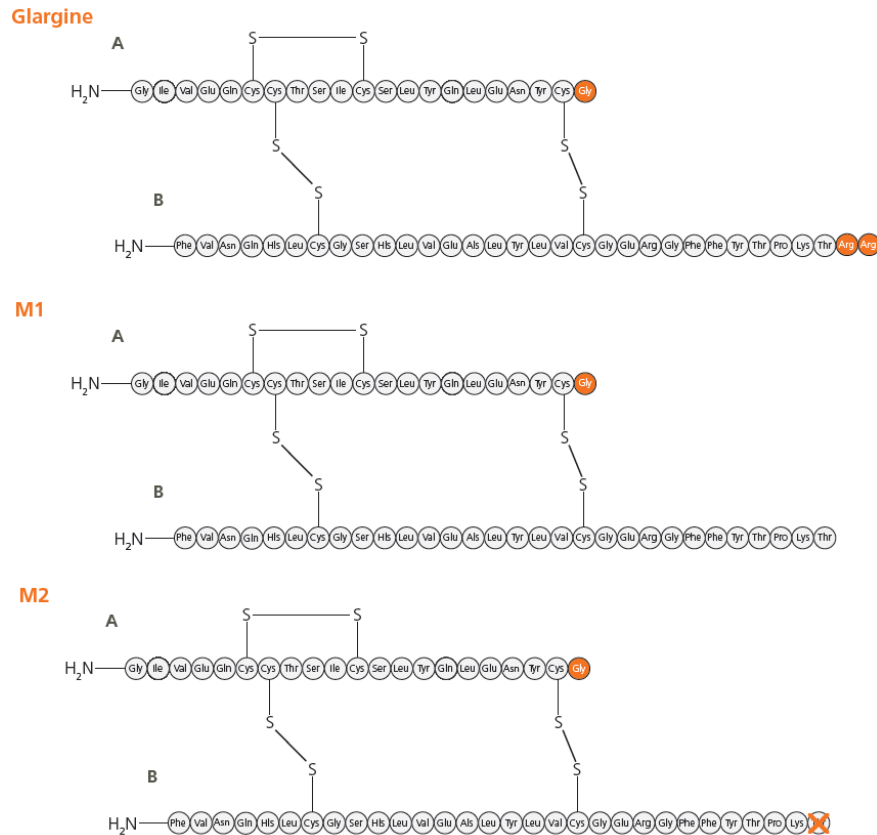
Glargina: La glargina es el primer análogo de insulina de acción prolongada que se obtuvo por tecnología de ADN recombinante utilizando *Escherichia coli* como hospedero de expresión (Wang, 2003). Se produce por la sustitución de Asparagina por Glicina en la posición 21 de la cadena A y la adición de dos residuos de Arginina en las posiciones 31 y 32 de la cadena B (**Figura 1-6**). Al adicionar los dos residuos de arginina se produce un cambio en el punto isoeléctrico de la molécula de 5.4 a 6.7, esto le confiere una menor solubilidad al pH del tejido subcutáneo, llevando a la formación de microprecipitados en el lugar de inyección, y causando absorción lenta del fármaco (Hilgenfeld *et al*, 2014). La sustitución de asparagina por glicina previene la desaminación y dimerización en un ambiente ácido (Hilgenfeld *et al*, 2014). Cuando se inyecta insulina glargina que se encuentra en solución a pH 4 en el espacio subcutáneo (pH 7.4), esta se precipita produciendo una duración prolongada de la acción.

Figura 1-6: Insulina Glargina. Sustitución de aminoácidos en insulina humana para producir glargina. Imagen tomada de Keiko *et al*, 2011.



La glargina es liberada del microprecipitado por degradación proteolítica produciendo los metabolitos M1 y M2, los cuales circulan por el torrente sanguíneo y son los responsables de ejercer la acción en cada uno de los tejidos sensibles a insulina. Los estudios de metabolismo *in vivo* en ratas, perros y humanos han demostrado niveles plasmáticos significativos de los dos metabolitos principales de la insulina glargina (metabolitos denominados M1 y M2). M1 resulta de la escisión de los dos aminoácidos arginina terminales en el extremo C-terminal de la cadena B (B31 y B32) y M2 resulta de la eliminación secuencial de las dos argininas del extremo C-terminal de la cadena B y la desaminación adicional de la treonina en la posición B30 (Kuerzel *et al*, 2003) (**Figura 1-7**). Se ha demostrado que en los pacientes tratados con glargina, la presencia de los metabolitos M1 y M2 en el plasma sanguíneo es del 90% mientras el nivel de glargina sin modificar es mínimo; incluso a altas dosis, estos niveles representan sólo el 10% de la concentración total (Lucidi *et al*, 2015).

Figura 1-7: Estructura de la glargina y sus metabolitos M1 y M2. Imagen tomada de Carlsson *et al*, 2012.



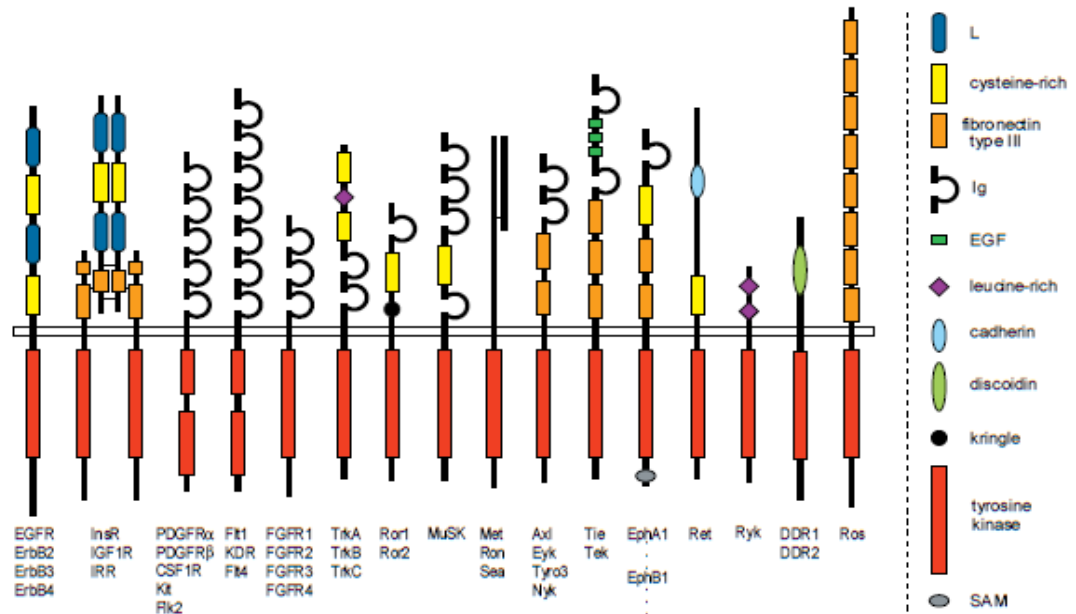
La actividad metabólica de la glargina alcanza su efecto máximo 2-3 horas después de la aplicación, y permanece constante cerca de 24 horas. Está indicada para la administración por vía subcutánea una vez al día (al acostarse) en pacientes con diabetes tipo 1 y pacientes adultos con diabetes tipo 2. Fue aprobada por la organización de Administración de alimentos y medicamentos de EE.UU. (FDA) en abril de 2000, y por la Agencia Europea para la Evaluación de Medicamentos (EMA) en junio de 2000 (Wang, 2003), y se ha visto que en pacientes diabéticos el uso de análogos mejora el control glucémico sin aumentar los eventos de hipoglucemia con respecto a la insulina regular.

1.3 Familia de receptores tirosin-quinasa (RTKs)

A esta familia pertenecen diversos receptores que poseen actividad tirosin-quinasa. Estos receptores están conformados por un ectodominio glicosilado al cual se une el ligando; este ectodominio está conectado mediante una α -hélice al dominio intracelular donde radica la actividad tirosin-quinasa. Esta actividad es responsable de catalizar la autofosforilación del receptor en respuesta a la unión del ligando, lo que ocurre mediante transferencia del fosfato desde el ATP a los grupos hidroxilo de las tirosinas que conforman repeticiones conservadas en las que se ensamblan proteínas encargadas de conducir la respuesta intracelular. Los RTKs, juegan un papel importante en el control de procesos celulares fundamentales como son el ciclo celular eucariota, migración celular, metabolismo, proliferación y diferenciación celular.

La topología global de los RTKs (**Figura 1-8**), su mecanismo de activación, y los componentes que promueven el encendido de vías de señalización intracelulares están altamente conservados en la evolución, desde el nematodo *Caenorhabditis elegans* hasta los seres humanos, demostrando que son puntos claves para algunas funciones reguladoras a nivel celular. Por otra parte, algunas enfermedades son el resultado de cambios o anomalías que alteran la actividad, número y distribución de estos receptores.

Figura 1-8: Topología global de los RTK. Imagen tomada de Hubbard & Till, 2000

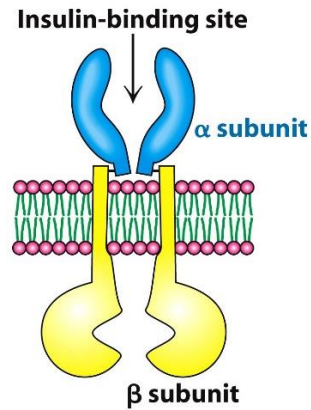


Las mutaciones en los RTKs y la activación aberrante de sus vías de señalización se relacionan con cáncer, diabetes, inflamación, trastornos óseos, arteriosclerosis y angiogénesis, y por lo tanto estas conexiones han impulsado el desarrollo de una nueva generación de fármacos que bloquean o atenúan su actividad.

1.3.1 Receptor de insulina (IR)

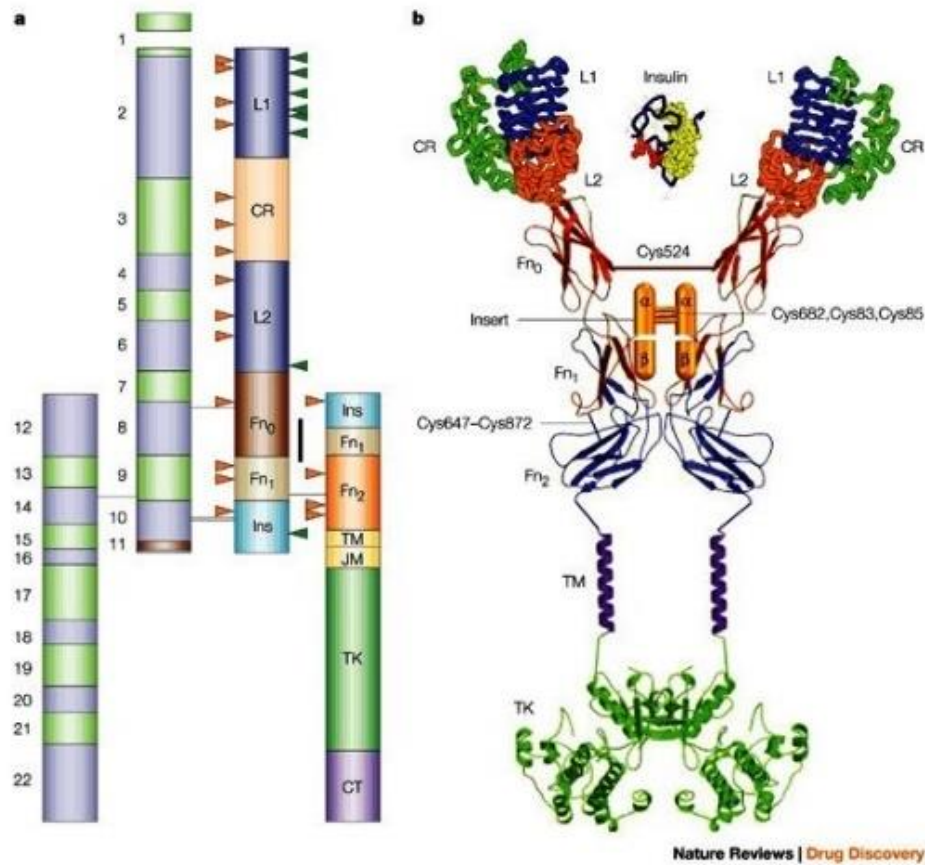
El receptor de insulina (IR) es una proteína de 1382 aminoácidos localizada en la membrana de las células sensibles a la insulina y está compuesto por dos subunidades α y dos subunidades β (Seino *et al*, 1989) (**Figura 1-9**).

Figura 1-9: Subunidades α y β del receptor de insulina y su localización en la membrana celular. Imagen tomada de Berg *et al*, 2012.



Estructuralmente este receptor está compuesto de dominios con repeticiones ricas en leucina (L1 y L2), un dominio rico en cisteína (CR), tres dominios de fibronectina tipo III (Fn_0 , Fn_1 , Fn_2), un dominio en Fn_1 (ID), un dominio transmembranal (TM), un dominio yuxtamembranal (JM), un dominio tirosina quinasa (TK) y el extremo carboxilo terminal α CT (**Figura 1-10**).

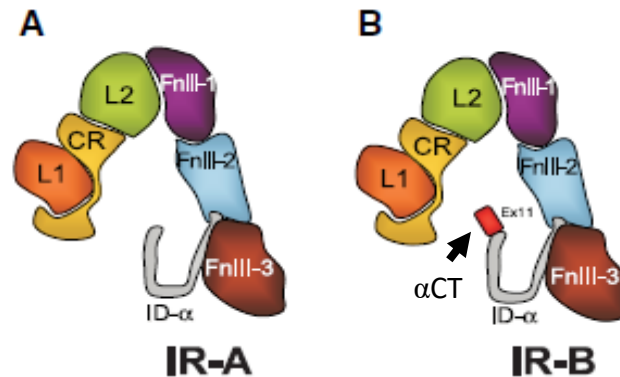
Figura 1-10: Receptor de Insulina. **A)** Muestra los 22 exones del gen que lo codifica. El exón 11 codifica el dominio α CT. **B)** Organización en dominios del receptor de insulina. La región más inmunogénica se encuentra en Fn0 y se representa por una barra vertical negra. Las puntas de flecha de color naranja indican los sitios de N-glicosilación. Las puntas de flecha de color verde indican los puntos más probables ('hot spots') para unión del ligando, tal como lo han mostrado experimentos de mutagénesis dirigida a aminoácidos individuales. Imagen tomada de De Meyts & Whittaker, 2002.



Las dos subunidades α del receptor, están unidas por un puente disulfuro en el residuo Cys524 en cada dominio Fn₀. Tres residuos de Cys (682, 683 y 685) en el inserto (ID) del dominio Fn₁ también están involucrados en la formación de puentes disulfuro. Hay también un único puente disulfuro entre las subunidades α y β , formado entre Cys647 del dominio Fn₁ y Cys872 del dominio Fn₂. El gen que codifica IR está localizado en el cromosoma 19, y consiste en 22 exones que varían en tamaño desde 36 hasta aproximadamente 9000

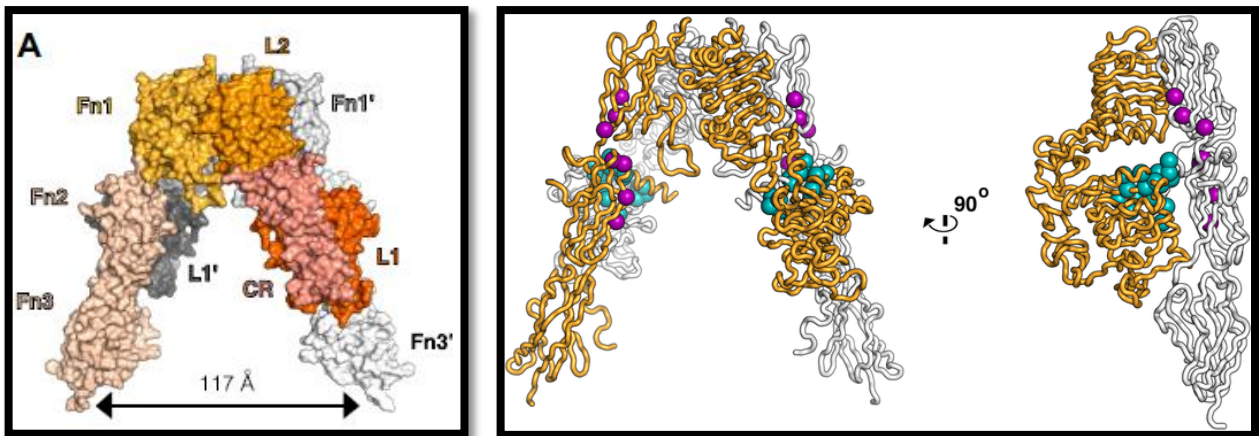
pares de bases (Vardanyan & Hruby, 2006). Existen dos isoformas (A y B) del receptor de insulina, que derivan del proceso de ‘*splicing*’ alternativo del exón 11; la isoforma A carece de los residuos codificados por el exón 11, mientras que la isoforma B incluye tales residuos que se denominan dominio α CT (**Figura 1-11**). Cabe resaltar la importancia del dominio α CT debido a que la ausencia de este α CT disminuye la afinidad del receptor por el ligando insulina y debido a esto la isoforma con mayor afinidad a la insulina es la isoforma B. Las células pueden expresar receptores de tipo IRA/IRA, IRB/IRB, o incluso receptores híbridos IRA/IRB.

Figura 1-11: Ectodominio del receptor IR. **A)** Conformación de los dominios de la isoforma IR-A. **B)** Conformación de los dominios isoforma IR-B. El dominio α CT, que corresponde a los aminoácidos codificados por el exón 11, se representa como el rectángulo rojo de IR-B. Imagen tomada de Belfiore *et al*, 2009.



Una de las características importantes en la unión del receptor con la insulina es que las subunidades α extracelulares se pliegan formando una “V” invertida (**Figura 1-11**). Existen dos sitios de unión a ligando en el receptor IR, ambos localizados en el ectodominio del receptor. El “Sitio 1”, se encuentra entre los dominios L1 y α CT, la unión de insulina a este sitio 1 ocurre con una constante de disociación (K_d) de 6.4nM. El “Sitio 2” se encuentra entre los residuos de Fn1 ' y Fn2 ' y tiene una constante de disociación de 400nM (Williams *et al*, 1995) (**Figura 1-12**). Una característica clásica de la unión del ligando a IR es su cooperatividad negativa lo que implica la comunicación entre los dos sitios de tal manera que la unión del ligando en uno de los sitios genera un estado asimétrico del receptor en que se disminuye la afinidad por el segundo sitio de unión (De Meyts & Whittaker, 2002).

Figura 1-12: Dominio extracelular del receptor IR donde se encuentran los Sitios 1 y 2 de unión a insulina. Ambas subunidades α se encuentran coloreadas una en blanco y la otra en naranja. Los residuos implicados en la formación del sitio 1 de unión están representados en esferas verdes y los residuos implicados en la formación del sitio 2 de unión en esferas magenta. Imagen tomada de Kavran *et al*, 2014.

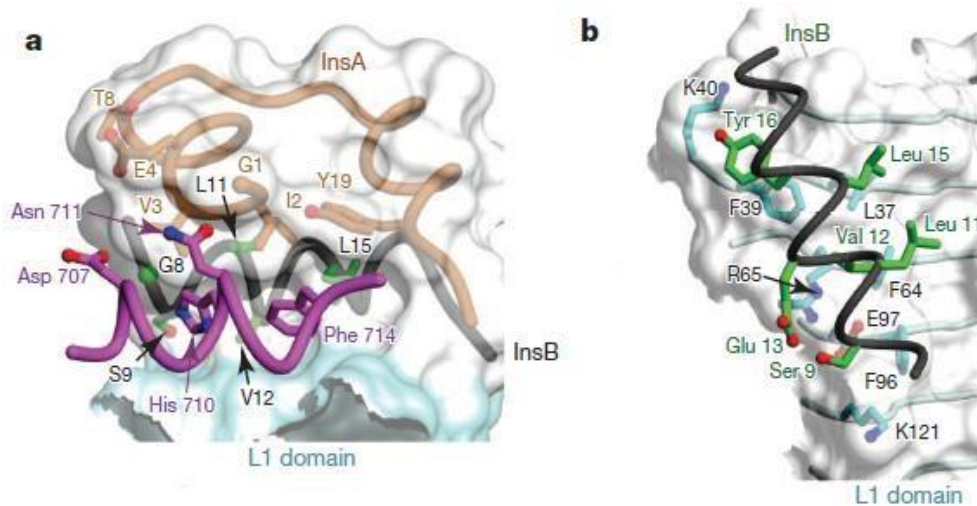


Los residuos del sitio 1 del receptor IR importantes para la interacción con insulina, tanto a nivel del dominio L1 como de α CT, son: A nivel del dominio α CT His710, que se inserta en un bolsillo formado por el residuo ValA3 de la cadena A de la insulina y por los residuos GlyB8, SerB9 y ValB12 de la cadena B.

Phe714, que ocupa una hendidura hidrofóbica formada por los residuos GlyA1, IleA2 y TyrA19 de la cadena A de la Insulina y por los residuos LeuB11, ValB12 y LeuB15 de la cadena B de la insulina; y Asn711, que se orienta hacia los residuos GlyA1, ValA3 y GluA4 de la cadena A de la insulina.

Por su parte, en el dominio L1 del receptor se han descrito los siguientes residuos importantes: Phe39, Phe64 y Arg65, posicionados hacia el residuo ValB12 de la cadena B de la insulina. El residuo Phe39 se encuentra posicionado cerca del residuo TyrB16 de la cadena B de la insulina (**Figura 1-13**):

Figura 1-13: Residuos importantes para la interacción de insulina con su receptor (IR). **A.** Residuos del dominio α CT reportados como importantes para la interacción. **B.** Residuos del dominio L1 reportados como importantes para la interacción. Imágenes tomadas de Menting *et al*, 2013.



1.3.2 Receptor de factor de crecimiento insulínico (IGF1R)

El receptor de factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF1R) es una glicoproteína transmembranal conformada por 1408 aminoácidos. Posee un porcentaje de identidad con el IR del 60% y al igual que este receptor está conformado por dos subunidades α y dos subunidades β unidas por puentes disulfuro (L1: Cys3-Cys33 y Cys120-Cys148, L2: Cys302-Cys323 y Cys425-Cys458) (De Meyts & Whittaker, 2002). La subunidad α está conformada por los dominios L1, CR, L2, FNIII-1, FNIII-2 α e ID α , y la subunidad β está conformada por los dominios ID β , FNIII-2 β , FNIII-3, TM, JM, TK y C-terminal. El gen que codifica IGF1R está localizado en el cromosoma 15 y es muy similar en tamaño y en organización estructural al gen del receptor IR ya que consta de 21 exones (10 exones que codifican la subunidad α y 11 exones que codifican la subunidad β). En la región N-terminal del ectodominio, se encuentran los dominios L1 y L2 separados por una región rica en cisteína (CR) que contiene 22 residuos de cisteína, mientras que en el extremo C-terminal se encuentran dominios de fibronectina tipo III (Fn III) (Ward *et al*, 2003). El dominio intracelular está compuesto por un dominio juxtamembranal, por varios sitios de fosforilación de residuos de tirosina y por una región α CT (Ward *et al*, 2003). La subunidad

α posee 38 residuos de cisteína, mientras que la subunidad β posee 3 residuos de cisteína extracelulares y cinco intracelulares. Los monómeros α forman el dímero α - α por medio de varios enlaces disulfuro, el primero de los cuales involucra en los residuos Cys514 de cada subunidad α y el segundo en los residuos de cisteína en las posiciones 669, 670 y 672 (Ward *et al*, 2003) (**Figura 1-14**).

A diferencia del receptor IR, el receptor IGF1R no presenta isoformas pero como se mencionó antes, comparte un alto porcentaje de similitud e identidad con el receptor IR, lo que conllevaría a la formación de receptores híbridos de la forma IRA/IGF1R o IRB/IGF1R (**Figura 1-15**). Estos receptores híbridos promueven en su mayoría señales mitogénicas.

Figura 1-14: Receptor IGF1R. **A.** Organización de dominios. Imagen tomada de Garrett *et al*, 2002 **B.** Modelo de cintas de la organización de dominios de su estructura modular con base en datos de cristalografía de rayos X. Imagen tomada de Hubbard & Till, 2000.

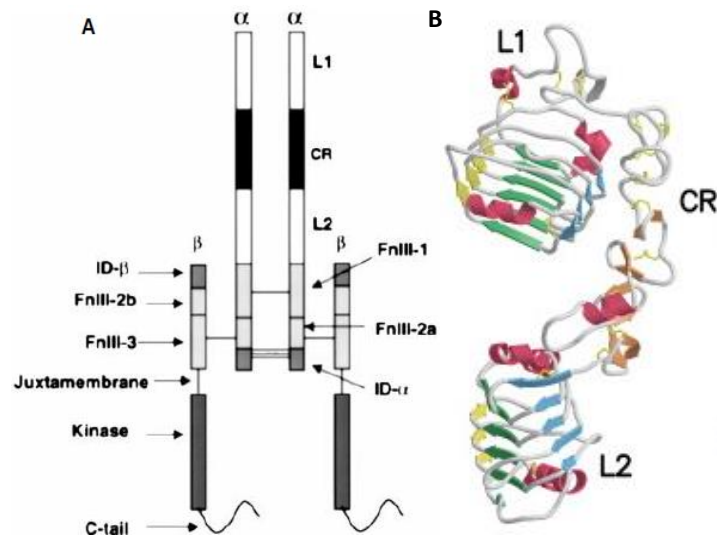
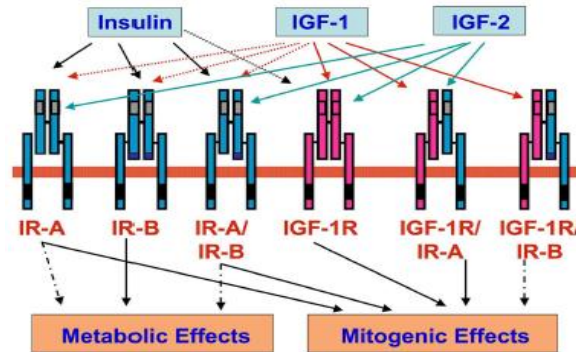


Figura 1-15: Receptor IR y sus isoformas IRA e IRB, Receptor IGF1R y receptores híbridos. (IR-A/IR-B, IGF-1R/IR-A, y IGF-1R/IR-B). Imagen tomada de Sciacca *et al*, 2012.

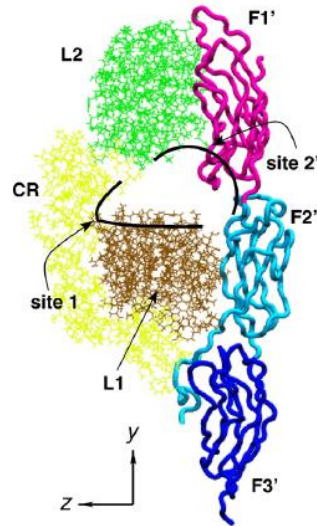


El IGF1R tiene como ligandos las siguientes hormonas: insulina, factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF1) y factor de crecimiento insulínico tipo 2 (IGF2) (**Figura 1-16**). EL IGF1 es un péptido de 70 aminoácidos compuesto por una cadena única de aminoácidos que se encuentra estabilizada por tres puentes disulfuro y es sintetizado en su mayoría en el hígado. IGF1 comparte un 52% de identidad con la insulina (Brzozowski *et al*, 2002; Annunziata *et al*, 2011).

La estructura del IGF2 es igual a la de IGF1 pero tiene un total de 67 aminoácidos que comparte un 67% de identidad con la insulina y también es sintetizado principalmente en el hígado. Ambos IGF's poseen los mismos enlaces disulfuro y su estructura terciaria es bastante similar a la de la insulina. La principal diferencia estructural entre los IGF's e insulina es que los IGF's conservan el péptido C que contiene la proinsulina, y hay una pequeña extensión de la cadena A en las moléculas de IGF, extensión conocida como la cadena D. (Annunziata *et al*, 2011).

Al igual que con el receptor IR, en el receptor IGF1R existen dos sitios de unión a ligando, ambos localizados en el ectodominio del receptor. A diferencia del receptor IR en donde el sitio 1 se encuentra entre los dominio L1 y α CT, en el receptor IGF1R el sitio 1 se encuentra entre el dominio L1 y el dominio CR, mientras que el sitio 2 de unión se encuentra en el dominio L2 y Fn1'-Fn2'. Aunque no se ha cristalizado el complejo de IGF1 o IGF2 con el receptor IGF1R, por medio de otro tipo de análisis como *Alanine scanning* se han reportado residuos de unión del 'sitio 1' (Harish & Cameron, 2010) (**Figura 1-16**).

Figura 1-16: Sitios de unión de IGF1 al receptor IGF1R. En la parte superior se muestran los dominios L1, CR, L2, F1, F2, y F3. En la parte inferior se listan entre paréntesis los residuos de interacción entre el receptor IGF1R con IGF1 estos últimos presentados en grilla. Imagen tomada de Harish & Cameron, 2010.



	IGF1
L1	V11 (F90, R112), D12 (R59), L14 (Y83) Q15 (L33, F58, R59), F23 (-), Y24 (Y28, H30) F25 (F82, Y83), K27 (L54), P28 (L81, Y83, N84) T29 (W79, R108), Y31 (-) S35 (W79), I43 (Y83), V44 (N84)
CR	G32 (S260, S261), S33 (~F241, I255) S34 (G265), S35 (F266, Q275) R36 (R240, E242, Q275, E276), R37 (~E264)

Tanto el receptor de insulina (IR) como el receptor de factor de crecimiento IGF1R pertenecen a la familia de los RTK (Vardanyan & Hruby, 2006). Estos dos receptores comparten aproximadamente el 80% de la secuencia de aminoácidos de su dominio tirosin-quinasa y un 60% de identidad en su ectodominio (Vardanyan & Hruby, 2006), y poseen una característica estructural que los diferencia de otros receptores tirosin-quinasa: poseen dos tipos de subunidades (α y β) unidas por puentes disulfuro, la subunidad α en donde se une el ligando es extracelular y la subunidad β intracelular, donde se encuentra el dominio tirosin-quinasa. Estas subunidades provienen de un pro receptor producto de un gen para cada receptor; el receptor nativo es ensamblado por dimerización de los pro-receptores de las subunidades α y β , seguido de una escisión proteolítica para producir el receptor maduro, este paso es esencial para la función del receptor; un receptor que tenga mutado el sitio de escisión produce una disminución en la afinidad del ligando y una reducción en la actividad tirosin-quinasa (Vardanyan & Hruby, 2006).

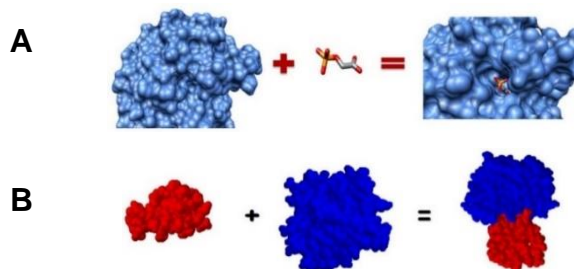
1.4 Docking

El *docking* molecular es una herramienta computacional de simulación que se usa para predecir la conformación de un complejo entre dos biomoléculas (Laurie & Jackson, 2005; Bastard *et al*, 2011).

Existen dos tipos de *docking*: el *docking* proteína-ligando, y el *docking* proteína-proteína (**Figura 1-17**). La aplicación más importante del *docking* proteína-ligando es el tamizaje (*'screening'*) de pequeñas moléculas promisorias consignadas en una base de datos, y que luego sean susceptibles de usarse para el diseño de fármacos, mientras que la principal utilidad del *docking* proteína-proteína es la investigación de complejos moleculares entre proteínas.

En la predicción de una interacción entre dos o más moléculas yace el '*problema del docking*', el cual puede describirse así: teniendo dos moléculas de estructura conocida, y que se sabe que interactúan entre sí, *¿se puede determinar su estructura 3D cuando forman un complejo?* Mientras que el planteamiento del problema no representa mayor dificultad, tanto la búsqueda de la estructura 3D, como la determinación de la interacción energéticamente más favorable, son asuntos bastante más complejos (Jackson, 2005).

Figura 1-17: Tipos de docking molecular. **A.** Docking proteína-ligando. **B.** Docking proteína-proteína. Imagen tomada de Hernández-Santoyo *et al*, 2014



El tratamiento del *docking* involucra aspectos relacionados con la complementariedad molecular, con la búsqueda del problema y con la flexibilidad conformacional (Jackson, 2005).

1.4.1 *Docking* proteína-proteína

El *docking* de proteínas se refiere a cualquier procedimiento capaz de predecir la estructura 3D de un complejo proteico binario a partir de las estructuras de sus proteínas individuales (Bastard *et al*, 2011). Las aplicaciones son:

- Reconocimiento de proteínas, de cuya interacción depende una actividad biológica.
- Entendimiento de las redes celulares de interacción proteica.
- Indagación del estado termodinámico del reconocimiento entre dos moléculas.
- Determinación de la interacción entre dos proteínas cuya resolución experimental sea difícil y/o no se haya realizado.

El presente trabajo encaja dentro de esta última aplicación. El *docking* proteína-proteína se aplica a la interacción de dos moléculas, donde una de ellas se denomina '*receptor*' y la otra '*ligando*' (no confundir con el *ligando* del *docking* proteína-ligando, donde el ligando es una molécula muy pequeña que no es proteína). Este tipo de *docking* consiste en una exploración amplia de las posiciones y orientaciones relativas de las dos moléculas, con el propósito de generar todas las posibles geometrías de asociación, las cuales son puntuadas y ordenadas de manera predictiva. Para hacerlo se han desarrollado métodos que aplican requerimientos rigurosos en términos de velocidad y exploración del espacio conformacional (Zacharias, 2010).

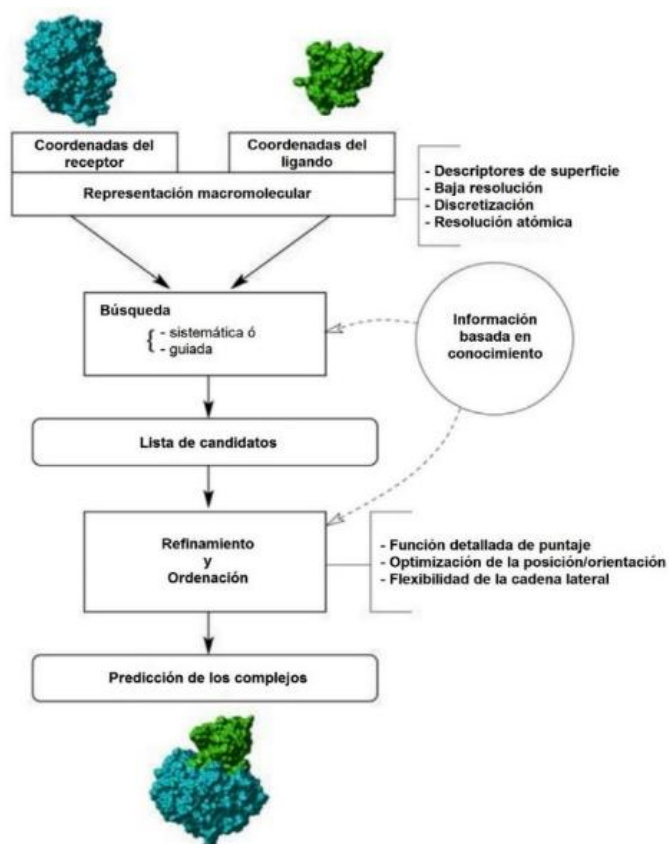
Los métodos de *docking* proteína-proteína combinan tres componentes fundamentales (**Figura 1-18**):

- Una representación apropiada de las dos moléculas con una definición de los grados de libertad que se buscarán.
- Un algoritmo que explore el espacio conformacional tan completo como sea posible.
- Una función de puntaje para clasificar las predicciones.

Los programas de *docking* presentan diferentes niveles de complejidad para la representación de la interacción y el puntaje. Los modelos varían desde la representación simplificada de la superficie, a una muy detallada a nivel atómico. Cuando las moléculas se consideran rígidas sólo se tiene en cuenta hasta el 6° de libertad, aunque en la

actualidad algunos programas permiten la introducción de grados de libertad adicionales, representados principalmente por los cambios en la superficie de la cadena lateral. Las funciones de puntaje también varían desde métodos estadísticos o funciones basadas en conocimiento, hasta evaluaciones de la energía libre de la unión (ΔG) por medio del ajuste de las superficies (Bastard *et al*, 2011).

Figura 1-18: Organización esquemática de un método típico de docking. La estrategia requiere la elección de la representación de una proteína, un método de búsqueda y un grado de resolución para el refinamiento y puntaje final. Imagen tomada de Leis & Zacharias, 2011



El uso de modelos simplificados y de funciones de puntaje sencillas permite la búsqueda del espacio conformacional total dentro de un tiempo razonable. Por otro lado, el uso de representaciones detalladas y de funciones de puntaje complejas dificulta en extremo la consecución de un resultado final (Bastard *et al*, 2011). Sin embargo, aunque las simplificaciones permiten una resolución más rápida también introducen sesgos en el

puntaje, produciendo las llamadas **soluciones de falso positivo**, que son las predicciones alejadas de la estructura verdadera (nativa) del complejo, pero con un puntaje alto. Es importante también anotar que para ser eficiente, una función de puntaje necesita adaptarse al nivel de resolución de la representación proteica. Por ejemplo, es inútil usar funciones de puntaje basadas en el cálculo de los potenciales atómicos (que son sensibles a las desviaciones atómicas en fracciones de angstroms) en procedimientos de *docking* en donde las posiciones relativas de las proteínas y de las cadenas laterales no se han ajustado con alta precisión (Leis & Zacharias, 2011).

Para disminuir la aparición de falsos positivos muchos programas de *docking* incluyen dos fases (Leis & Zacharias, 2011):

- 1) **Fase de búsqueda:** en donde se trabaja a baja resolución y el espacio conformacional se explora extensamente.
- 2) **Fase de refinamiento:** en donde las mejores geometrías que resultan de la fase anterior se re-evalúan a alta resolución. La búsqueda se concentra en la vecindad de la geometría candidata y el puntaje usa criterios más estrictos.

Los algoritmos de la fase de búsqueda pueden dividirse en dos categorías (Leis & Zacharias, 2011):

- a) **Búsqueda sistemática:** en donde se generan todas las posibles posiciones/orientaciones relativas de las dos moléculas antes de identificar y clasificar las geometrías más favorables.
- b) **Búsqueda guiada:** usa directamente la función de puntaje para guiar la búsqueda hacia las geometrías más favorables.

En la mayoría de los programas de *docking*, la fase de búsqueda es seguida por una fase de refinamiento. La principal razón de esto es que las funciones de puntaje no son capaces de ordenar correctamente las predicciones, o incluso distinguir las predicciones falso positivas de las correctas. Generalmente, sólo las mejores predicciones, seleccionadas entre las agrupaciones (*clusters*) más representativas de soluciones, pasan a la fase de refinamiento.

El refinamiento puede tener varias estrategias:

- a) Incrementar la resolución
- b) Contabilización de los cambios conformacionales de la cadena lateral
- c) Solvatación explícita

1.4.2 Puntaje de las Predicciones

El puntaje es un componente esencial de cualquier método de *docking*. Mientras que condición necesaria para que el método de *docking* sea exitoso es que la búsqueda genere geometrías complejas cercanas a la nativa, la función de puntaje debe ser capaz de identificar esas estructuras dentro de cientos de estructuras generadas.

Teóricamente, una función de puntaje 'ideal' permite distinguir geometrías de asociación correctas de las incorrectas, relacionando la constante de disociación del complejo predicho con la energía libre. Sin embargo, en la práctica esta cantidad es difícil de obtener y su cálculo requiere grandes recursos informáticos. En consecuencia, las funciones de puntaje usadas en los programas de *docking* son sólo aproximaciones a la energía libre, aunque basadas en formulaciones robustas (Zacharias, 2010). Una función de puntaje 'ideal' (E) debería tener características similares a:

$$E = \omega_0 E_{int} + \omega_1 E_{vw} + \omega_2 E^{solv}/_{el} + \omega_3 E_{hb} + \omega_4 E_{hp} + \omega_5 E^{solv}/_{SA} + \omega_6 E_{config} \quad (1.1)$$

Dónde:

- $\omega_0 E_{int}$: sumas energías electrostáticas y de van der Waals
- $\omega_1 E_{vw}$: energía potencial por las interacciones de Van der Waals
- $\omega_2 E^{solv}/_{el}$: energía potencial electrostática corregida por la superficie accesible al solvente
- $\omega_3 E_{hb}$: energía potencial debido a los puentes de hidrógeno
- $\omega_4 E_{hp}$: energía potencial hidrofóbica dependiente de la superficie hidrofóbica
- $\omega_5 E^{solv}/_{SA}$: energía de solvatación superficial

- $\omega_6 E_{config}$: entropía para la cadena lateral

1.4.3 Evaluación de los Métodos de *docking*.

Desde sus inicios, los grupos que trabajan con *docking* proteína-proteína han estado organizados en un proceso de evaluación continua. Desde el año 2001, CAPRI (*Critical Assessment of Predicted Interactions*) es la comunidad mundial que evalúa los métodos de *docking* con base en pruebas ciegas de predicción (Bastard *et al*, 2010).

Han existido 37 rondas de CAPRI desde el 2001 hasta el presente. En las rondas se entregan 'tareas' que consisten en predecir las interacciones de varios complejos proteína-proteína cuya estructura se ha determinado experimentalmente, pero que todavía no se han dado a conocer al público. El propósito es evaluar predicciones de programas y/o servidores en línea que aceptan participar en la evaluación (Bastard *et al*, 2010). En el encuentro de evaluación realizado en el 2015, adicionalmente a las tareas de predicción habituales, se introdujeron otros tipos de tareas: diseño de sistemas de ensamble de proteínas multidominio, predicción de complejos de proteínas con otras biomoléculas (ácidos nucleicos, oligosacáridos), predicción de la estructura de hidratación de la superficie proteína-proteína, predicción de la afinidad de complejos con mutaciones puntuales (Bonvin, 2013; Lensink & Wodak, 2013). Algunos programas tuvieron un buen desempeño en las tareas habituales y presentaron aproximaciones para resolver estos nuevos desafíos (**Tabla 1-2**).

Tabla 1-2: Evaluación de desempeño de los servidores en línea en el encuentro de CAPRI 2014. Tabla tomada de Lensink *et al*, 2014

CAPRI Server Ranking	
HADDOCK	15/9**
CLUSPRO	14/8**
SWARMDOCK	11/4**
GRAMM-X	6/1**
LZERD	3
DOCK/PIERR	1

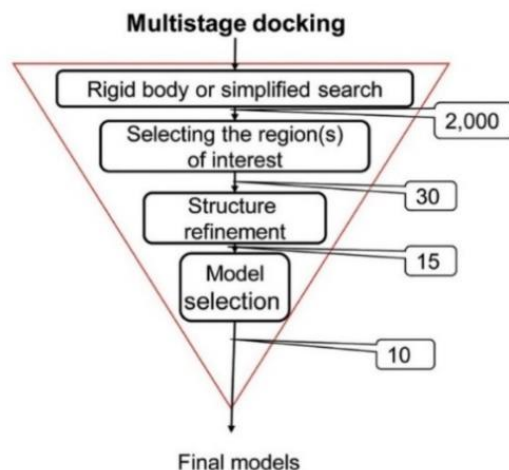
Participant ranking by INTERFACE quality and #,
Over a **total of 42 Interfaces in 25 targets**

1.4.4 Servidores en línea más utilizados para la realización de *docking*.

ClusPro

ClusPro, un servidor web totalmente automatizado para el acoplamiento computacional de estructuras de proteínas (Comeau *et al*, 2004a; Comeau *et al*, 2004b). Los usuarios pueden cargar los archivos de coordenadas de las dos estructuras proteicas o introducir los códigos de dichas estructuras. Los algoritmos evalúan miles de millones de potenciales complejos, conservando un número preestablecido con complementariedad de superficie favorable. Un método de filtrado se aplica a este conjunto de estructuras, seleccionando aquellas con buenas energías electrostáticas y desolvatación para su posterior agrupación (**Figura 1-19**). Los complejos son clasificados en función de sus propiedades de agrupación y son enviados automáticamente al usuario a través de correo electrónico. Los resultados de este servidor, constan fundamentalmente de la evaluación y asignación de puntaje en cuatro categorías diferentes de interacción molecular: a) Balanceado, b) Favorecido electrostáticamente, c) Favorecido Hidrofóticamente, d) Fuerzas electrostáticas y de Van der Waals ($V_{dW+Elec}$).

Figura 1-19: Esquema general del algoritmo de ClusPro. **1)** Búsqueda simplificada o de cuerpo rígido, **2)** Selección de la región de interés, **3)** Refinamiento de las estructuras del docking y **4)** Discriminación global (Selección de las mejores estructuras). Número de estructuras retenidas en cada paso en la mayoría de casos. Basado en Zacharias, 2010.



HADDOCK

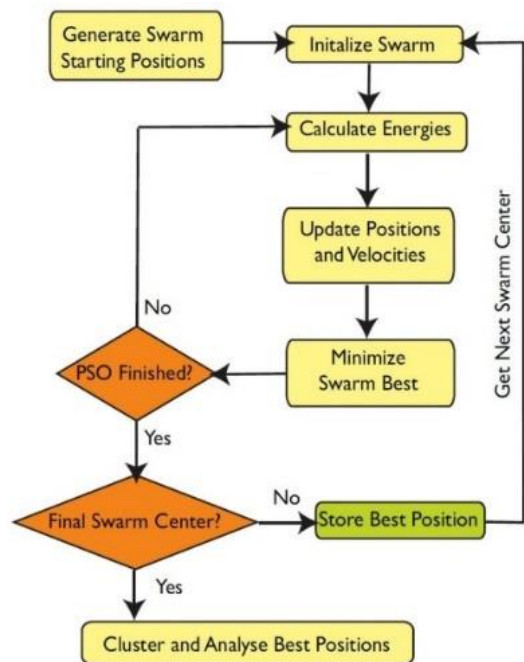
HADDOCK (High Ambiguity Driven biomolecular DOCKing) es un servidor automatizado que hace uso de los datos de interacción bioquímicos y/o biofísicos tales como desplazamiento químico, datos de experimentos de titulación de RMN, datos de mutagénesis o predicciones bioinformáticas (Domiguez *et al*, 2003; Vries *et al*, 2007). Esta información se introduce como restricciones de interacción ambiguas (AIRS) para impulsar el proceso de acoplamiento; un AIR se define como una distancia ambigua entre todos los residuos que se encuentran involucrados en la interacción. *HADDOCK* utiliza un algoritmo de 3 pasos: *docking* para la minimización de la energía de moléculas rígidas, simulación de alineamiento semiflexible y refinamiento de solvatación (Domiguez *et al*, 2003; Vries *et al*, 2007). Este servidor permite delimitar la búsqueda de la interacción a los residuos de unión del receptor y del ligando. El protocolo de *docking* requiere los archivos PDB de las proteínas y las restricciones de interacción ambiguas, y se compone de tres etapas: (i) la asignación al azar de orientaciones y minimización de la energía de cuerpo rígido (EM), (ii) alineación semirrígido de ángulos de torsión en el espacio (TAD-SA), y (iii) el refinamiento final disolvente explícito ((Domiguez *et al*, 2003; Vries *et al*, 2007).

Durante el TAD y el refinamiento de agua a los aminoácidos en la interfaz (cadenas laterales y el esqueleto de la proteína) se les permiten moverse para optimizar la interfaz de embalaje. Aunque no se producen cambios estructurales significativos durante la etapa de refinamiento de agua, es útil para la mejora energética de la interfaz. Las estructuras finales se agrupan utilizando el RMSD de los emparejamientos analizados de acuerdo con sus energías de interacción promedio (suma de E_{elec} , E_{vdw} , E_{AIR}) y su área media de superficie. El procedimiento de acoplamiento se realiza automáticamente.

SwarmDock

SwarmDock es un servidor web que genera un conjunto de aproximadamente 120 posiciones iniciales uniformemente espaciados alrededor de la proteína receptor (Torchala *et al*, 2013a; Torchala *et al*, 2013b; Torchala *et al*, 2014). El proceso de acoplamiento se repite cuatro veces en cada posición de partida y la mejor estructura encontrada durante la optimización se mantiene durante la etapa de postprocesamiento final (**Figura 1-20**). El acoplamiento en sí se lleva a cabo mediante la optimización de un vector de búsqueda. La optimización se lleva a cabo mediante un algoritmo híbrido que consiste en la optimización del 'enjambre' de partículas (PSO) y una búsqueda local; después de cada iteración del algoritmo PSO, el miembro con la menor energía se somete a una optimización local. Por último, estas estructuras se agrupan y se devuelven al usuario.

Figura 1-20: Esquema general del algoritmo de SwarmDock. Tomado de Moal & Bates, 2010.



Autodock

AutoDock es una suite de herramientas automatizadas disponible de forma gratuita para ser descargada en sistemas operativos Windows, Linux y Mac Os. Está diseñado para predecir cómo pequeñas moléculas, tales como substratos o candidatos a fármacos, puede unirse a una enzima o a un receptor con estructura 3D conocida (Morris *et al*, 2009). El primer paso es eliminar moléculas interferentes y átomos sueltos en cada una de las proteínas con las que se va a realizar el *docking*. Luego de esto se hace un enrejado en donde se buscará la mejor conformación de interacción entre el receptor y el ligando; esta mejor interacción es la que posee menos energía libre. Autodock proporciona un método interactivo para definir un “árbol” de ángulos de torsión en un ligando y receptor dado. En primer lugar, el programa elige un “átomo de raíz”, que actuará como el centro de rotación durante la transformación de coordenadas en la simulación de acoplamiento. Para encontrar el átomo óptimo, se evalúa el número de átomos en cada “rama”, y se elige el

átomo de raíz que reduce al mínimo el tamaño de la rama más grande. En algunos casos, el usuario puede desear limitar la flexibilidad del ligando.

Autodock ofrece dos opciones para hacer esta tarea de forma automática. Una opción selecciona el conjunto de grados de libertad de torsión que moverán el mayor número de átomos de torsiones (cerca de la raíz), el otro agrega torsiones progresivamente a partir de las hojas, moviendo el menor número de átomos y dejando el núcleo de la molécula rígido. El puntaje que se obtiene luego de realizar el *docking* es un puntaje de afinidad expresado en Kcal/mol.

2. Materiales y métodos

2.1 Materiales:

Equipos y software:

Este estudio se llevó a cabo en dos computadores diferentes, según el software utilizado: para realizar el *docking* mediante Autodock se utilizó un computador core i5 de segunda generación de 4 núcleos, RAM 8GB y sistema operativo Linux. Mientras que para la realización del *docking* mediante servidores online se utilizó un computador Asus con sistema operativo Windows 10, procesador Intel® Celeron ® CPU 1007U @ 1.50 Ghz, sistema operativo x64 y RAM 4 GB.

En cuanto a software se utilizaron los siguientes programas:

- **Autodock:**
URL de descarga: <http://autodock.scripps.edu/>
Desarrolladores: The Scripps Research Institute - Olson Laboratory.
Descarga gratuita.
- **Discovery Studio® Visualizer**
URL de descarga: <http://accelrys.com/products/collaborative-science/biovia-discovery-studio/visualization-download.php>
Desarrolladores: Accelrys & Biovia.
Descarga gratuita.
- **PyMol:**
URL de descarga: <https://www.pymol.org/>
Desarrolladores: Schrödinger
Descarga gratuita.

Se utilizaron los siguientes servidores online:

- **HADDOCK:**
URL: <http://haddock.science.uu.nl/services/HADDOCK2.2/haddockserver-prediction.html>
Desarrolladores: Utrecht University (BonvinLab)
Gratuito
- **SwarmDock:**
URL: <http://bmm.crick.ac.uk/~SwarmDock/>
Desarrolladores: The Francis Crick Institute
Gratuito
- **ClusPro:**
URL: <https://cluspro.bu.edu/login.php>
Desarrolladores: Boston University
Gratuito
- **Molprobit**
URL: <http://molprobit.biochem.duke.edu/>
Desarrolladores: Duke University
Gratuito
- **SuperPose**
URL: <http://wishart.biology.ualberta.ca/SuperPose/>
Desarrolladores: University of Alberta
Gratuito
- **EMBOSS Water**
URL: http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_water/
Desarrolladores: EMBL-EBI
Gratuito

2.2 Métodos:

2.2.1 Búsqueda y recopilación de estructuras

Las estructuras 3D de las moléculas utilizadas en el presente estudio (glargina, receptor IR, y receptor IGF1R) se buscaron en la base de datos “*Protein Data Bank*” (PDB) (Berman *et al*, 2000), seleccionando aquellas que presentaran la mejor resolución y el ectodominio con la mayor extensión posible, las que finalmente fueron descargadas en formato PDB.

2.2.2 Evaluación de la calidad estructural de las moléculas utilizadas

Una vez descargados los archivos con los datos estructurales, se analizó la calidad estructural mediante *MolProbity* (Davis et al, 2007). *MolProbity* es un servidor en línea que provee una evaluación de los modelos 3D obtenidos por cristalografía de rayos X y espectrometría de NMR, de proteínas y ácidos nucleicos. Molprobity se basa en el análisis de colocación de átomos de hidrógeno y el análisis de contacto de todos los átomos, complementado con versiones actualizadas de los criterios de geometría y torsión de ángulos. Algunas de las correcciones locales se pueden realizar automáticamente en MolProbity y todos los diagnósticos se presentan en forma de gráficos que ayudan a guiar la reconstrucción manual. La cristalografía de rayos X proporciona una gran cantidad de datos de estructuras tridimensionales de biomoléculas, sin embargo, a pesar de que el campo de la cristalografía ha avanzado y se han desarrollado muchas mejoras, existen errores en las biomoléculas que pueden afectar a la interpretación biológica mostrando por ejemplo valores atípicos en el gráfico de Ramachandran y desplazamientos erróneos de cadenas laterales. Debido a esto, fue de suma importancia diagnosticar y corregir este tipo de errores en las estructuras descargadas.

MolProbity es muy empleado por su fácil uso y su eficacia en determinar la calidad de las coordenadas geométricas de las estructuras contenidas en PDB. Aunque existen varias formas de análisis en *MolProbity*, se escogió el análisis más importante, (el análisis estérico y de Geometría), que incluye evaluaciones de rotámeros, de los enlaces y ángulos de la cadena principal y de Ramachandran.

Para realizar el análisis *Molprobity* primero se seleccionó la opción de análisis de estructura resuelta por medio de cristalografía de rayos-x, luego se insertó el código PDB de cada una de las estructuras y el servidor realizó la carga de la estructura mostrando la información de la resolución, número de cadenas, número de residuos presentes, presencia de la cadena principal y cadenas laterales, la presencia de átomos de hidrógeno y los resultados del refinamiento realizado por los autores que reportan la estructura a PDB (Berman et al, 2000). En seguida el servidor ubicó y analizó la posición de todos los átomos de hidrógeno. Finalmente analizó la orientación y geometría. El servidor permitió elegir opciones de evaluación como: el gráfico de Ramachandran, evaluación de rotámeros y desviaciones del C β .

2.2.3 Preparación de las estructuras

Específicamente, se realizó asignación de átomos y enlaces faltantes por distancia, eliminación de las moléculas de agua y de algunos iones, asignación de átomos de hidrógeno y de cargas formales y se realizó de nuevo el análisis mediante *MolProbity* para corroborar que mejoró la calidad de la molécula.

2.2.4 Docking

Este trabajo se enfoca en el 'sitio 1' de unión de ligando, debido a que es el único cristalizado para ambos receptores IR e IGF1R.

El *docking* se realizó mediante cuatro herramientas computacionales, tres de estas seleccionadas por ser los servidores de *docking* proteína-proteína con los mejores resultados de acuerdo a lo descrito por la comunidad de expertos *CAPRI* (Lensink & Wodak, 2013) y una cuarta reportada como el software más utilizado para realizar *docking molecular* (*Autodock*) (Morris *et al*, 2009). En resumen estas herramientas fueron:

ClusPro

Para la realización del docking mediante clusPro se creó una cuenta para acceder al servidor online con un usuario y contraseña. Luego de acceder al servidor web se procedió a subir al servidor el archivo en formato pdb tanto del receptor como del ligando. El análisis se limitó a la región más próxima al bolsillo de unión del receptor para lo cual se tomó como base el sitio 1 de unión de insulina al receptor IR y el sitio 1 de unión de IGF1 a IGF1R. Con el programa PyMol 1.3r1 edu (*The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.5.0.4 Schrödinger, LLC*) se removieron secuencias de residuos pertenecientes a dominios que no pertenecen al sitio 1 de unión de cada uno de los receptores. Finalmente se dejó trabajando el servidor durante dos semanas, luego de las cuales se recibieron los resultados vía correo electrónico.

HADDOCK

Para la realización del docking mediante HADDOCK se creó una cuenta para acceder al servidor online con un usuario y contraseña. Se utilizó el servicio de predicción de interfase

de HADDOCK para proteínas indicando el nombre de cada estructura como ligando o receptor. En seguida se procedió a subir los archivos en formato pdb de cada molécula. HADDOCK permite seleccionar los residuos activos del sitio de unión de cada receptor. Para cada uno de los receptores se seleccionaron los residuos del 'sitio 1' de unión para insulina e IGF1 de sus respectivos receptores, según lo indicado en las secciones 1.3.1 y 1.3.2 del marco teórico.

Para el ligando glargina se cambió la notación de la cadena B debido a que el servidor no acepta que se repita la numeración de los residuos, así estos se encuentren en cadenas diferentes; por lo tanto, la cadena A se mantuvo su numeración habitual del residuo 1 al 21, pero en la cadena B los residuos se renumeraron del 30 al 50. Finalmente se realizó el docking y un link para acceder a los resultados en formato pdb fue recibido vía correo electrónico dos semanas después.

Swarmdock

Para la realización del *docking* mediante *swarmdock* no hubo necesidad de crear una cuenta; el servidor pide un correo al cual envía el link para verificar el progreso del trabajo y luego envía otro link cuando los resultados están disponibles. Se subieron los archivos en formato pdb de cada molécula y se utilizaron los parámetros por defecto para el número de movimientos normales. Se eligió la opción de escoger los residuos del sitio 1 de unión de cada receptor. Como se mencionó antes, para cada uno de los receptores se seleccionan los residuos del sitio de unión del ligando descritos en las secciones 1.3.1 y 1.3.2 del marco teórico. Finalmente, los resultados del *docking* fueron recibidos dos semanas después vía correo electrónico.

Autodock

Para realizar el docking mediante *Autodock* (Morris *et al*, 2009) fue necesario descargar el programa de forma gratuita para Windows junto con MGLTools (Sanner, 1999). Primero se realizó una preparación de cada una de las proteínas incluyendo la eliminación de las moléculas de agua, iones, la asignación de átomos de hidrógeno y cargas formales y se guardó el archivo en formato pdbqt.

A continuación, se generó una caja de cribado o "*Grid Box*" con dimensiones específicas centrada en la superficie de contacto para cada receptor y se creó un archivo de texto con

estas coordenadas. Luego, por medio de la consola de comandos de “Windows cmd” se escribieron las órdenes en donde se incluyeron los archivos de glargina, del receptor, y el archivo de texto con las coordenadas de la caja de cribado. El espaciado (*Grid Box*) fue de 1 Å, la exhaustividad de 10 y el número de resultados por Docking fue de 5 en todos los casos. Los resultados que arroja Autodock Vina en formato pdbqt fueron visualizados en Autodock v.1.5.4. Y corresponden a las mejores poses (configuración y orientación) con valores de energía de unión más bajos en Kcal/mol, junto con los valores de la desviación de la media cuadrática o RMSD (*root-mean-square deviation*) entre conformaciones.

2.2.5 Criterios de selección de modelos finales

Debido a que cada plataforma computacional arrojó muchos modelos, fue necesario establecer ciertos criterios para poder seleccionar los modelos más apropiados.

Dada la similitud estructural que se espera entre los ligandos insulina, glargina e IGF1 por un lado y entre los receptores IR e IGF1R por otro lado, es razonable pensar que los complejos glargina-receptor IR y glargina-receptor IGF1R tendrán también similitud estructural con el complejo insulina-receptor IR cuya estructura 3D se conoce y probablemente también con el complejo IGF1-IGF1R, aunque en este caso no se tiene la estructura 3D del complejo, pero existen datos bioquímicos de algunos residuos que participan en la interacción ligando-receptor. En consecuencia, los criterios de selección de modelos fueron los siguientes:

1. Orientación (posicionamiento) del ligando en el receptor. Se supone que glargina presentará una orientación similar a la que adquiere insulina en el receptor IR, (sección 1.3.1 del marco teórico).
2. Residuos interactuantes conservados. Suponemos que algunos residuos conservados en glargina también formarán parte de la interacción con el receptor en el complejo con glargina.

En relación con este último punto, consideramos apropiado recordar nuevamente los residuos interactuantes en el sitio 1 de unión del ligando, algo que ya fue mencionado en marco teórico:

Para el receptor IR (Interacción con insulina):

Residuos del dominio L1: Leu36, Leu37, Phe39, Phe64 y Arg65

Residuos del Dominio α CT: His710, Asn711, Phe714 y Val715.

Para el receptor IGF1R (interacción con IGF1) se conocen los siguientes residuos:

Residuos interactuantes del dominio L1: Tyr28, His30, Leu33, Tyr54, Phe58, Arg59, Leu81, Phe82, Tyr83, Asn84, Phe90, Arg112.

Residuos interactuantes del dominio CR: Phe241, Ile255, Ser260, Ser261, Glu264, Gly265, Phe266, Gln275, Glu276 (Keyhanfar *et al*, 2007; Harish & Cameron, 2010 y Whittaker *et al*, 2001).

2.2.6 Visualización de estructuras

Todas las estructuras descargadas del banco de datos de proteínas, así como todos los modelos computacionales construidos, fueron visualizados con el programa PyMol 1.3r1 edu (*The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.5.0.4 Schrödinger, LLC*). Adicionalmente, para escoger los modelos de acuerdo con los criterios de selección descritos en la sección anterior, se realizó la visualización de la interfaz de contacto de todas las interacciones utilizando el software PyMol 1.3r1 edu (*The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.5.0.4 Schrödinger, LLC*), y en seguida se realizó un análisis de las interacciones de los modelos escogidos mediante *Discovery Studio® Visualizer* (Accelrys Software Inc, 2007) y *Autodock*.

2.2.7 Comparación de los modelos obtenidos

Se realizó una comparación de la pose u orientación del ligando en todos los modelos obtenidos para los complejos glargina-IR y glargina-IGF1R. También se realizó el cálculo de las constantes de disociación relativas (K_d') de cada complejo de acuerdo con la fórmula $\Delta G = RT \ln K$ y se compararon.

2.2.8 Superposición de estructuras 3D

Se calculó el porcentaje de identidad y similitud mediante la plataforma *EMBOSS Water* (McWilliam *et al*, 2013; Li *et al*, 2015) del EMBL-EBI (Rice *et al*, 2000). El análisis de superposición de las estructuras 3D se llevó a cabo utilizando Discovery studio visualizaer y la plataforma SuperPose (Maiti *et al*, 2004). Para calcular el porcentaje de identidad y similitud se copió la secuencia de las cadenas A y B de la glargina en formato FASTA y cada una fue comparada por separado con la secuencia de la proinsulina y la secuencia del IGF1 mediante la herramienta *EMBOSS Water* utilizando un alineamiento local con una matriz BLOSUM65. Por otro lado, la estructura 3D de la glargina se comparó con las estructuras 3D conocidas tanto de la insulina como del IGF1 utilizando *Discovery Studio® Visualizer* y la herramienta superpose, la cual fue alimentada con los archivos PDB de cada una de las estructuras utilizando como punto de corte de similitud $<2.0 \text{ \AA}$ y de diferencia $>2.0 \text{ \AA}$ para el cálculo del RMSD, inmediatamente arrojó como resultado un modelo de cada superposición en formato pdb y su correspondiente cálculo RMSD. Los resultados fueron visualizados utilizando *Discovery Studio® Visualizer* (Accelrys Software Inc, 2007).

3.RESULTADOS

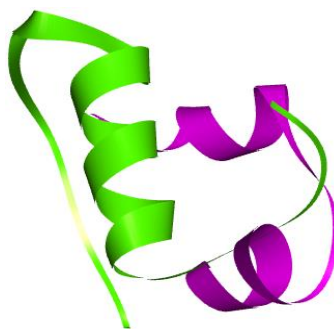
3.1 Moléculas utilizadas en el estudio.

En primer lugar se procedió a buscar las estructuras tridimensionales de cada una de las moléculas a utilizar en el estudio, esto se hizo en la base de datos PDB (Berman *et al*, 2000).

Glargina:

Para la Glargina se encontraron dos estructuras reportadas por el mismo grupo (Barba de la Rosa *et al*, 2013), cuyas identidades en la base de datos fueron 4IYF con una resolución de 1.80 Å y 4IYD con una resolución de 1.66 Å. La estructura de glargina seleccionada para el estudio fue la 4IYD (**Figura 3-1**) ya que a pesar de que su secuencia y estructura es igual a 4IYF, tiene una mejor resolución. Es importante resaltar que ambas estructuras corresponden al metabolito M2 de la glargina que fue mostrado previamente en la sección 1.3 de marco teórico en la **Figura 1-7**.

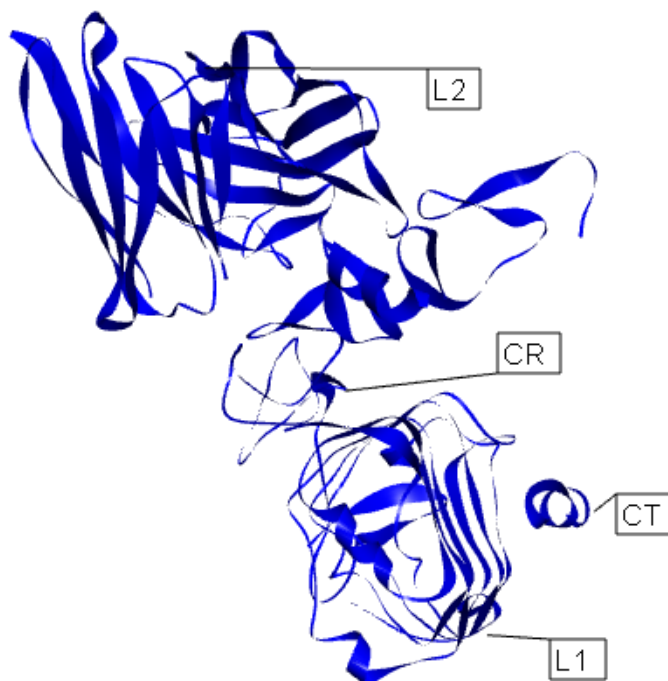
Figura 3-1: Estructura 3D de la glargina (PDB: 4IYD). Cadena A en color magenta, cadena B en color verde. Tomado de Barba de la Rosa, 2013



Receptor IR:

Al momento de realizar la búsqueda de la estructura del receptor IR en la base de datos de proteínas (PDB), se encontraron 28 estructuras reportadas del ectodominio de IR, y sólo cinco contenían el segmento α CT (códigos: 3LOH de 3.80 Å, 3W12 de 4.30 Å, 3W11 de 3.90 Å, 3W13 de 4.3 Å, 4XST de 3.00 Å). Se escogió la estructura 3W11 reportada por Menting *et al* (2013) ya que además de presentar el sitio 1 de unión, se encuentra en formando parte de un complejo con el insulina humana y presenta una de las mejores resoluciones reportadas (**Figura 3-2**).

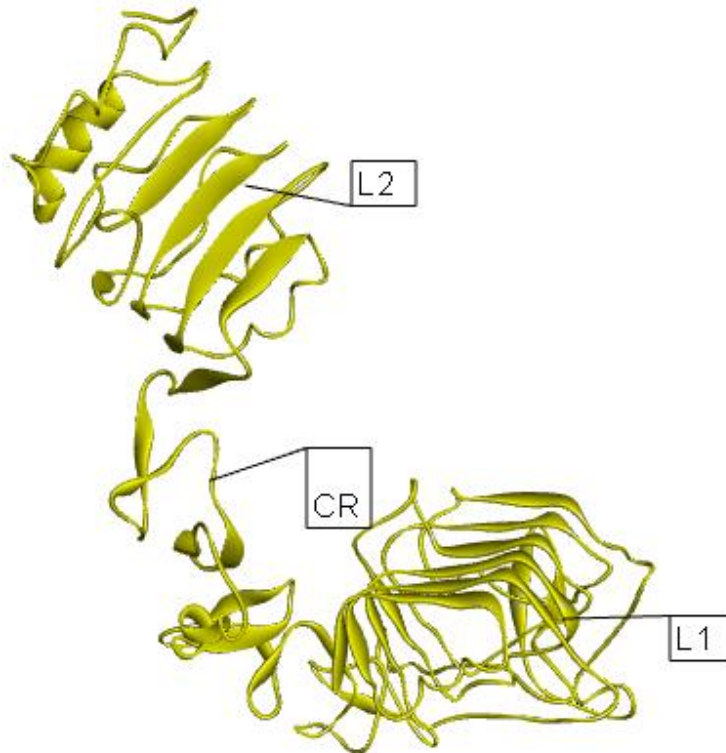
Figura 3-2: Estructura 3D receptor IR. PDB ID: 3W11. Tomado de Menting *et al*, 2013.

**Receptor IGF1R:**

Para el receptor IGF1R se encontraron 19 estructuras reportadas en PDB, de las cuales se escogió la que presentó el ectodominio con la mayor extensión (300 aa) y el 'sitio 1' de

unión, esta estructura corresponde al código PDB 1IGR y con una resolución de 2.60 Å (Garrett *et al*, 1998) (**Figura 3-3**).

Figura 3-3: Estructura 3D receptor IGF1R PDB: 1IGR. Tomado de Garrett *et al*, 1998.



3.2 Evaluación de la Calidad de las estructuras 3D utilizadas.

Para tener una idea de la calidad de las estructuras, a continuación se decidió realizar un análisis mediante el programa (o servidor) Molprobability.

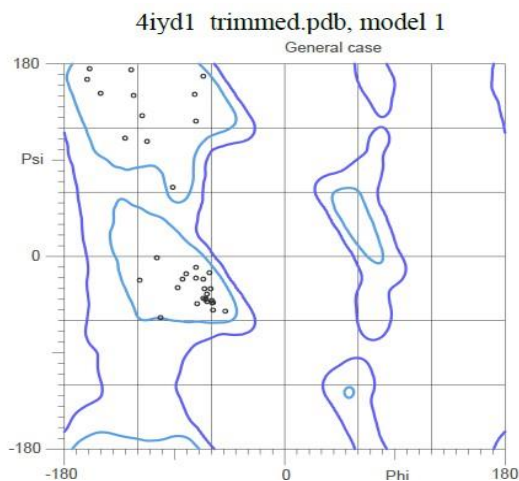
Glargina

Para Glargina el análisis mediante *Molprobit* reveló que todos sus residuos cumplen con los criterios geométricos y estructurales permitidos (**Tabla 3-1**). El 100% de los residuos se encontraron en regiones favorecidas y en regiones permitidas (**Figura 3-4**).

Tabla 3-1: Análisis geométricos y de torsión de la glargina (PDB: 4IYD) mediante Molprobit.

Poor rotamers	0	0.00%	Goal: <1%
Ramachandran outliers	0	0.00%	Goal: <0.05%
Ramachandran favored	46	100.00%	Goal: >98%
C β deviations $\geq 0.25\text{\AA}$	0	0.00%	Goal: 0
Bad backbone bonds:	0 / 198	0.00%	Goal: 0%
Bad backbone angles:	0 / 244	0.00%	Goal: <0.1%

Figura 3-4: Gráfico de Ramachandran para Glargina (4IYD). 100% (46/46) de los residuos se encontraron en regiones favorecidas (>98%), 100% (46/46) de los residuos se encontraron en regiones permitidas (>99.8%). Realizado con MolProbit.



Receptor de Insulina:

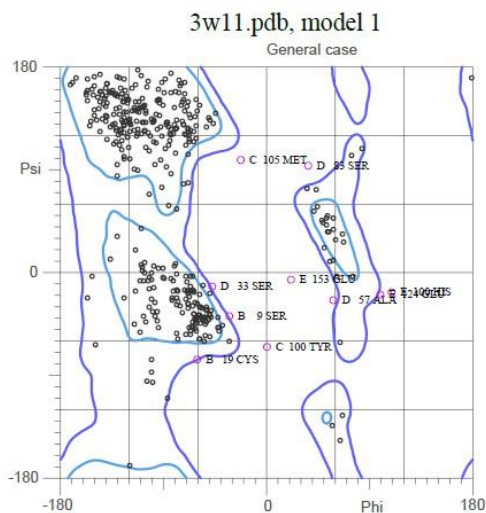
En cuanto al receptor de insulina, al realizar el análisis con *Molprobit* se encontró que 13 residuos (2,5%) tienen una configuración espacial no permitida (**Tabla 3-2**), aunque

ninguno está localizado en el sitio 1 de unión. Por otro lado, el gráfico de ramachandran (**Figura 3-5**) muestra que el 91.3% (503/551) de los residuos se encontraron en regiones favorecidas y 97.8% (539/551) se encontraron en regiones permitidas. Adicionalmente, las desviaciones $c\beta$ 5,49%, muestran que no existe un error alto en la geometría de la molécula (**Tabla 3-2**).

Tabla 3-2: Análisis geométricos y de torsión del receptor de la insulina IR (PDB: 3W11) mediante Molprobit.

Poor rotamers	13	2.54%	Goal: <1%
Ramachandran outliers	12	2.18%	Goal: <0.05%
Ramachandran favored	503	91.29%	Goal: >98%
C β deviations >0.25Å	29	5.49%	Goal: 0
Bad backbone bonds:	0 / 2260	0.00%	Goal: 0%
Bad backbone angles:	7 / 2811	0.25%	Goal: <0.1%

Figura 3-5: Grafico de Ramachandran para IR (3W11), 91.3% (503/551) de los residuos se encontraron en regiones favorecidas (98%), 97.8% (539/551) de los residuos se encontraron en regiones permitidas (>99.8%). Realizado con MolProbit.



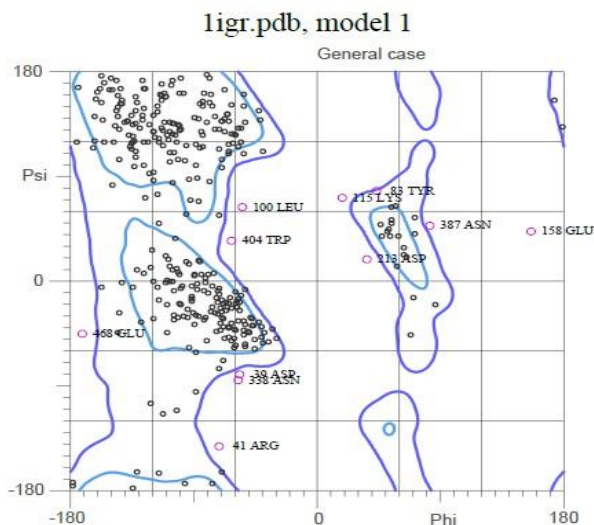
IGF1R:

Para IGF1R, el análisis con *Molprobit* reveló que 71 residuos (17,5%) tienen una configuración espacial no permitida (**Tabla 3-3**). El gráfico de ramachandran muestra que el 84,8% (396/467) de los residuos se encontraron en regiones favorecidas y 97.6% (456/467) se encontraron en regiones permitidas (**Figura 3-6**); las desviaciones $c\beta$ 1,1%, muestran que existe un error bajo en la geometría de la molécula.

Tabla 3-3: Análisis geométricos y de torsión del IFG1R (PDB: 1IGR) mediante Molprobit.

Poor rotamers	71	17.53%	Goal: <1%
Ramachandran outliers	11	2.36%	Goal: <0.05%
Ramachandran favored	396	84.80%	Goal: >98%
C β deviations >0.25Å	5	1.14%	Goal: 0
Bad backbone bonds:	2 / 1882	0.11%	Goal: 0%
Bad backbone angles:	57 / 2349	2.43%	Goal: <0.1%

Figura 3-6: Gráfico de Ramachandran para IGF1R (1IGR), 84.8% (396/467) de los residuos se encontraron en regiones favorecidas (98%), 97.6% (456/467) de los residuos se encontraron en regiones permitidas (>99.8%). Realizado con MolProbit.



De acuerdo a los resultados obtenidos con *Molprobit*, se tiene: la estructura de Glargina presenta una geometría óptima. En cuanto a las estructuras de los receptores IR e IGF1R se encontraron fallas en su geometría. Sin embargo, pero al analizar los residuos importantes del 'sitio 1' de unión de cada receptor en la tabla de residuos del gráfico de ramachandran se observa que para IR todos los residuos se encuentran en regiones favorecidas y permitidas (**Tabla 3-2**) y que para IGF1R ocurre lo mismo en casi todos excepto con el residuo Tyr83 que se encuentra aislado de las regiones permitidas en el gráfico de ramachandran (**Tabla 3-4**). Debido a esto, se ejecutó un refinamiento de la estructura mediante la adición de átomos faltantes, reparación por cercanía de la unión de los átomos no unidos en el receptor IGF1R y la inclusión de cargas formales por medio de *Autodock* y se realizó de nuevo el análisis del gráfico de ramachandran. En este nuevo análisis se observó que todos los residuos del 'sitio 1' de unión, incluyendo el residuo Tyr83, aparecían ahora en regiones permitidas y favorecidas, mejorando así la geometría de la molécula (**Tabla 3-5**). Por lo tanto, estas estructuras de ambos receptores fueron utilizadas para realizar el estudio.

Tabla 3-4: Residuos del "sitio 1" de unión del IR y su resultado de acuerdo a Ramachandran plot.

Número residuo	Residuo	Resultado Ramachandran
36	LEU	Favorecido
37	LEU	Favorecido
39	PHE	Favorecido
64	PHE	Favorecido
65	ARG	Favorecido
710	HIS	Favorecido
711	ASN	Permitido
714	PHE	Favorecido

Tabla 3-5: Análisis geométrico y de torsión del IFG1R mediante Molprobit después del refinamiento de la estructura.

Poor rotamers	0	0.00%	Goal: <0.3%
Ramachandran outliers	6	2.34%	Goal: <0.05%
Ramachandran favored	217	84.77%	Goal: >98%

En resumen, se obtuvieron listas las estructuras necesarias para la realización del *docking* proteína-proteína.

3.3 Interacción Glargina-Receptor de insulina (IR)

La interacción molecular (*docking*) entre la glargina y el receptor IR se estudió mediante cuatro programas bioinformáticos, según se indicó en la sección de materiales y métodos. El análisis de *docking* arrojó un total de 637 modelos: 104 modelos obtenidos con ClusPro, 154 con SwarmDock, 374 con HADDOCK y 5 con AutoDock (**Tabla 3-6**). Luego de analizar todos los modelos y de aplicar los criterios de selección indicados previamente en Materiales y métodos, se descartaron 635 modelos, quedándonos finalmente con sólo dos modelos seleccionados.

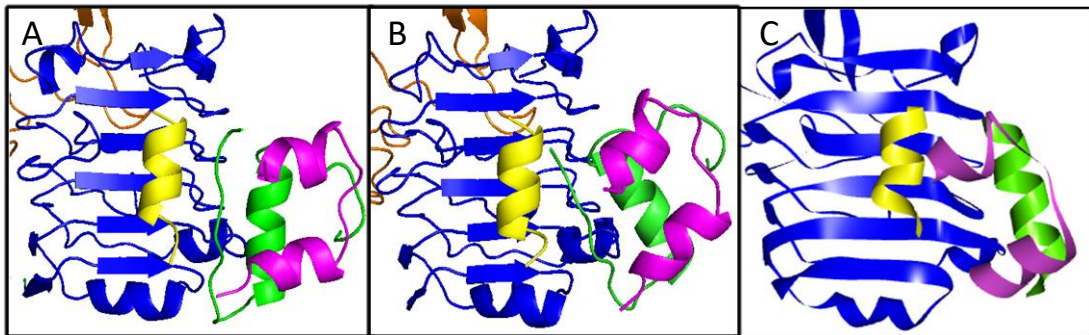
Tabla 3-6: Modelos computacionales de la interacción glargina-Receptor IR.

Servidor/software	Modelos obtenidos	Modelos seleccionados
ClusPro	104	1
SwarmDock	154	1
HADDOCK	374	0
AutoDock	5	0
TOTAL	637	2

La **Figura 3-7** muestra la estructura 3D de los dos modelos finales seleccionados: modelo 004.09 de ClusPro (**Figura 3-7A**) y modelo 7d de SwarmDock (**Figura 3-7B**), y también la estructura cristalográfica conocida del complejo insulina-receptor IR para comparación (**Figura 3-7C**). Si se comparan los dos modelos teóricos (004.09 y 7d), se observa que la pose del ligando respecto al receptor IR en el modelo 7d es más similar a la pose que se observa en el complejo conocido insulina-IR.

Llama la atención que en los modelos teóricos 004.09 y 7d se observa una cola con los residuos del extremo C-terminal de la cadena B de la glargina, que no es vista en la estructura del complejo insulina-IR cristalizado y esto es debido a que los autores de ese trabajo no lograron resolver dicho segmento.

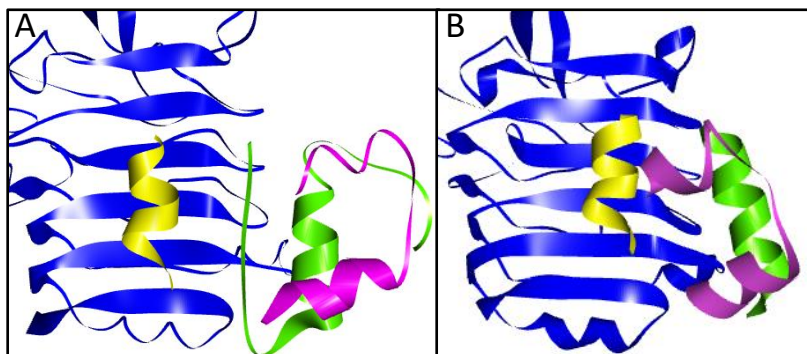
Figura 3-7: Modelos computacionales finales propuestos para el complejo Glargina-IR **A.** Modelo 004.09 obtenido con ClusPro. **B.** Modelo 7d obtenido con SwarmDock. **C.** Complejo insulina-IR (Menting et al, 2013). Glargina Cadena A en color Magenta, cadena B en color verde, α CT en color Amarillo, L1 en color Azul y CR en color Naranja.



▪ **Modelo 004.09:**

La **Figura 3-8** muestra nuevamente el modelo 004.09 de ClusPro para el complejo glargina-IR y la estructura conocida del complejo insulina-receptor IR para comparación. Aunque ambas estructuras se asemejan, se observan diferencias en el posicionamiento de uno y otro ligando al receptor.

Figura 3-8: Modelo glargina-IR (ClusPro modelo 004.09). **A.** Modelo 004.09 del complejo teórico glargina-IR. **B.** Estructura 3D del complejo insulina-IR de (Menting et al, 2013). Glargina Cadena A (Magenta), cadena B (verde), α CT (Amarillo), L1 (Azul).



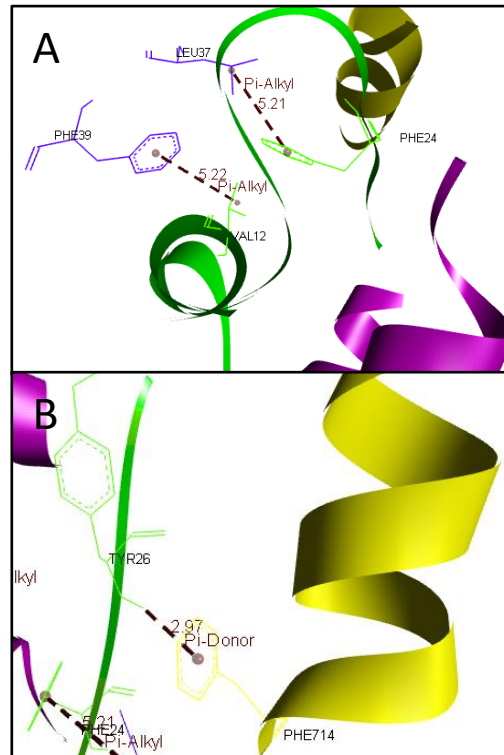
La **tabla 3-7** resume las interacciones observadas en el modelo 004.09 de ClusPro. Se encontraron 18 interacciones totales entre la glargina y el receptor IR. Tres de ellas han sido observadas también en el complejo cristalográfico insulina-IR homólogo (Menting et al, 2013). Y son las que nos referimos como “compartidas” en la **tabla 3-7**.

Tabla 3-7: Interacciones del complejo glargina-receptor IR (modelo 004.09 de ClusPro). En negrita se encuentran marcados los residuos del receptor IR, los residuos no marcados corresponden a glargina.

Modelo	Interacciones compartidas con Insulina-IR	Interacciones exclusivas de Glargina-IR
004.09 (ClusPro)	Phe39 -ValB12	Asn15 -TyrB16
		Asn15 -GlyB20
	Leu37 -PheB24	Arg65 -GlyB8
		Arg65 -SerB9
		Arg65 -GluB13
		Glu706 -TyrB26
	Phe714 -TyrB26	Asp707 -LysB29
		His710 -ProB28
	Phe714 -PheB25	

La **Figura 3-9** muestra la superficie de contacto del modelo glargina-IR, centrada en los residuos que forman parte de las interacciones compartidas.

Figura 3-9: Superficie de contacto en el modelo glargina-IR (ClusPro modelo 004.09). **A.** Interacciones con L1: Phe 39-ValB12 y Leu37-PheB24. **B.** Interacciones con α CT: Phe714-TyrB26. Glargina (Cadena A Magenta, cadena B verde), α CT (Amarillo), L1 (Azul).



De las 18 interacciones, doce son mediadas por puente hidrógeno y seis por enlaces hidrofóbicos (**Tabla 3-8**). La energía libre (ΔG) para este complejo fue de -948,9 kcal/mol.

Es interesante destacar que en el modelo teórico 004.09 se observan interacciones que incluyen al residuo TyrB26 de la glargina (**Figura 3-9**). El residuo equivalente de insulina (TyrB26) participa también en la interacción con el receptor IR en la estructura cristalizada (Menting *et al*, 2014). Este residuo ha sido descrito como importante para el reconocimiento de la Insulina.

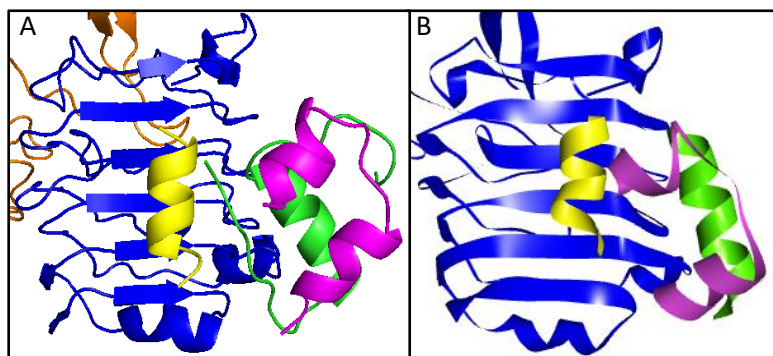
Tabla 3-8: Resumen interacciones modelo 004.09.

Name	Distance	Category	Type
IR:ARG65:HH11 - B:GLU13:OE1	2,30159	Hydrogen Bond;Electrostatic	Salt Bridge;Attractive Charge
IR:ARG65:HH12 - B:GLU13:OE1	2,26753	Hydrogen Bond;Electrostatic	Salt Bridge;Attractive Charge
B:LYS29:HZ2 - CT:ASP707:OD2	1,80017	Hydrogen Bond;Electrostatic	Salt Bridge;Attractive Charge
B:LYS29:HZ3 - CT:ASP707:OD1	1,89247	Hydrogen Bond;Electrostatic	Salt Bridge;Attractive Charge
IR:ASN15:HD21 - B:GLY20:O	2,11534	Hydrogen Bond	Conventional Hydrogen Bond
IR:LYS40:HZ1 - B:TYR16:OH	1,98819	Hydrogen Bond	Conventional Hydrogen Bond
IR:LYS40:HZ3 - B:TYR16:OH	2,0237	Hydrogen Bond	Conventional Hydrogen Bond
IR:ARG65:HH11 - B:SER9:O	1,89605	Hydrogen Bond	Conventional Hydrogen Bond
IR:ARG65:HH21 - B:GLY8:O	1,87513	Hydrogen Bond	Conventional Hydrogen Bond
B:TYR16:HH - IR:ASN15:O	1,98019	Hydrogen Bond	Conventional Hydrogen Bond
B:TYR26:HH - CT:GLU706:OE1	2,70555	Hydrogen Bond	Conventional Hydrogen Bond
B:TYR26:HN - CT:PHE714	2,96748	Hydrogen Bond	Pi-Donor Hydrogen Bond
CT:PHE714 - B:PHE25	5,299	Hydrophobic	Pi-Pi T-shaped
B:VAL12:C,O:GLU13:N - IR:PHE39	4,1175	Hydrophobic	Amide-Pi Stacked
IR:PHE39 - B:VAL12	5,21719	Hydrophobic	Pi-Alkyl
CT:HIS710 - B:PRO28	5,30386	Hydrophobic	Pi-Alkyl
B:TYR16 - IR:LYS40	5,33826	Hydrophobic	Pi-Alkyl
B:PHE24 - IR:LEU37	5,20522	Hydrophobic	Pi-Alkyl

- **Modelo 7d:**

El segundo modelo final obtenido fue el modelo 7d de SwarmDock (**Figura 3-10**).

Figura 3-10: Modelo glargina-IR (SwarmDock modelo 7d). A. Interacción glargina-IR modelo 7d B. Interacción insulina-IR (Menting et al, 2013). Glargina Cadena A (Magenta), cadena B (verde), α CT (Amarillo), L1 (Azul).



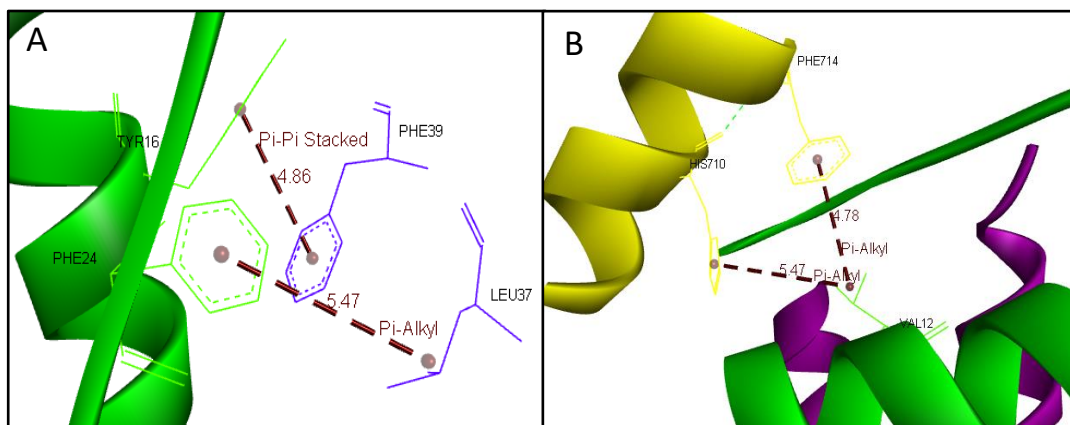
Este modelo sería estabilizado por 16 interacciones en total, de las cuales cuatro se encuentran presentes también en el complejo homólogo insulina-receptor IR (Menting *et al*, 2013). Las interacciones se resumen en la **tabla 3-9**.

Tabla 3-9: Interacciones del complejo glargina-IR (modelo 7d de SwarmDock). En negrita se encuentran marcados los residuos del receptor IR, los residuos no marcados corresponden a glargina.

Modelo	Interacciones compartidas con Insulina-IR	Interacciones exclusivas de Glargina-IR.
7d (SwarmDock)	His 710-ValB12	Lys 40-GluB21
		Arg 65-SerB9
	Phe714-ValB12	Arg 65-HisB10
		Arg 65-GluB13
		Glu 97-SerB9
	Phe39-TyrB16	Glu 706-GlyB8
		Glu 706-SerB9
Tyr 67-GluB13		
Leu37-PheB24	Asn 707-LysB29	
	Asn 711-LysB29	

La **Figura 3-11** muestra la superficie de contacto enfocada en las cuatro interacciones compartidas entre el modelo teórico 7d y el complejo binario homólogo cuya estructura se conoce (insulina-IR).

Figura 3-11: Superficie de contacto del modelo glargina-IR (SwarmDock modelo 7d) **A.** Interacciones con L1: Phe39-TyrB16, Leu 37-PheB24. **B.** Interacciones con α CT: His 710-ValB12, Phe714-ValB12. Glargina Cadena A (Magenta), cadena B (verde), α CT (Amarillo), L1 (Azul).



De las 16 interacciones, diez son mediadas por puentes de hidrógeno, dos por enlaces electrostáticos (Arg65-HisB10 y Arg65-GluB13) y cuatro por enlaces hidrofóbicos (**Tabla 3-10**). El ΔG de este modelo fue de -20,89 Kcal/mol.

Tabla 3-10: Resumen de interacciones del modelo 7d.

Name	Distance	Category	Type
IR:ARG65:NH1 - B:GLU13:OE2	4,40922	Electrostatic	Attractive Charge
IR:ARG65:NH1 - B:HIS10	4,12515	Electrostatic	Pi-Cation
IR:LYS40:NZ - B:GLU21:O	2,75285	Hydrogen Bond	Conventional Hydrogen Bond
IR:ARG65:NH1 - B:SER9:OG	2,7514	Hydrogen Bond	Conventional Hydrogen Bond
IR:TYR67:OH - B:GLU13:OE1	2,80525	Hydrogen Bond	Conventional Hydrogen Bond
B:SER9:N - CT:GLU706:OE1	3,04905	Hydrogen Bond	Conventional Hydrogen Bond
B:SER9:OG - IR:GLU97:OE2	2,73832	Hydrogen Bond	Conventional Hydrogen Bond
B:SER9:OG - CT:GLU706:OE1	2,94095	Hydrogen Bond	Conventional Hydrogen Bond
B:LYS29:N - CT:ASP707:OD1	3,23669	Hydrogen Bond	Conventional Hydrogen Bond
B:LYS29:NZ - CT:ASN711:OD1	2,72081	Hydrogen Bond	Conventional Hydrogen Bond
B:GLY8:CA - CT:GLU706:OE2	3,575	Hydrogen Bond	Carbon Hydrogen Bond
IR:ARG65:NH2 - B:GLU13:OE1	3,08439	Hydrogen Bond;Electrostatic	Salt Bridge
IR:PHE39 - B:TYR16	4,85661	Hydrophobic	Pi-Pi Stacked
CT:HIS710 - B:VAL12	5,46924	Hydrophobic	Pi-Alkyl
CT:PHE714 - B:VAL12	4,77564	Hydrophobic	Pi-Alkyl
B:PHE24 - IR:LEU37	5,46971	Hydrophobic	Pi-Alkyl

3.4 Interacción glargina-Receptor IGF1R

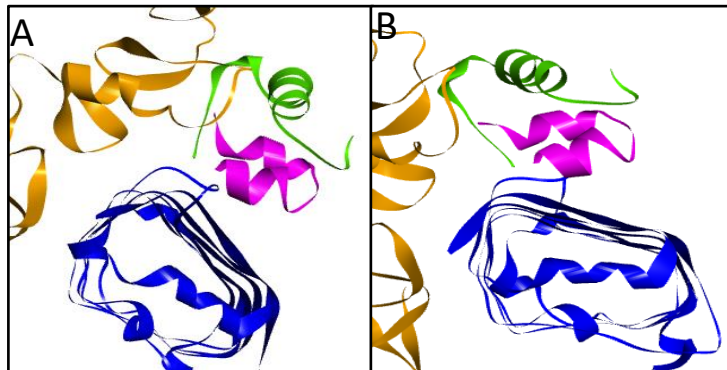
El análisis de *docking* para el complejo glargina-receptor IGF1R mediante los cuatro programas bioinformáticos arrojó un total de 807 modelos: 70 modelos con ClusPro, 343 con SwarmDock, 389 con HADDOCK y 5 con AutoDock 5 (**Tabla 3-11**).

Tabla 3-11: Selección de modelos de la interacción glargina-Receptor IGF1R.

Servidor/software	Modelos obtenidos	Modelos seleccionados
ClusPro	70	0
SwarmDock	343	2
HADDOCK	389	0
AutoDock	5	0
TOTAL	807	2

Luego de analizar todos los modelos, se descartaron 805 según los criterios de selección descritos en metodología, lo que nos permitió llegar a un total de dos modelos finales seleccionados, cuyas estructuras 3D se muestran en la **Figura 3-12**.

Figura 3-12: Modelos computacionales seleccionados para el complejo Glargina-Receptor IGF1R. **A.** Modelo teórico 38a de SwarmDock **B.** Modelo teórico 55b de SwarmDock. Glargina Cadena A color Magenta, cadena B color verde, L1 color Azul y CR color Naranja.



A continuación un análisis más detallado de estos dos modelos teóricos obtenidos para el complejo glargina-receptor IGF1R.

- **Modelo 38a:**

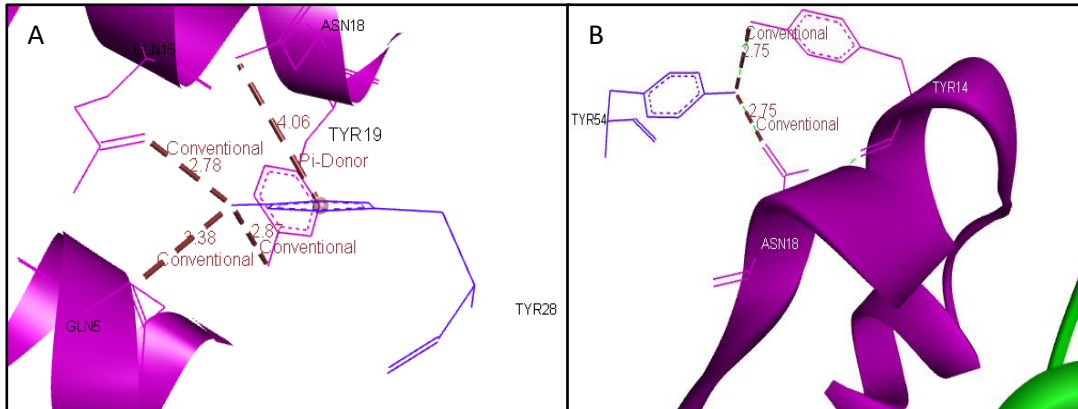
El modelo 38a contiene 23 Interacciones en total. La **Tabla 3-12** resume los residuos de la superficie de contacto correspondientes este modelo. Algunos residuos del receptor IGF1R que interactúan con glargina también han sido descritos estar formando parte de las interacciones en el complejo homólogo del receptor con IGF1.

Tabla 3-12: Interacciones en el modelo glargina-IGF1R (modelo 38a de SwarmDock). En negrita se encuentran marcados los residuos del receptor IGF1R, los residuos no marcados corresponden a glargina.

Modelo	Interacciones compartidas con IGF1-IGF1R	Interacciones exclusivas de glargina-IGF1R
38a (SwarmDock)	Tyr54 -TyrA14 Tyr54 - AsnA18 Gln275 -PheB24 Gln275 -TyrB26 Tyr28 -GlnA5 Tyr28 -GlnA15 Tyr28 -AsnA18 Tyr28 -TyrA29 Glu276 -GlyB23	Gly4 -GlyA1 Pro5 -LysB19 Gly6 -GlyA1 Ser257 - LysB29 Asp262 -SerB9 Ser279 -GluB21 Lys300 -TyrB16 Lys80 -CysA20 Leu256 -PorB28 Glu259 -LysB29 Glu259 -TyrB26

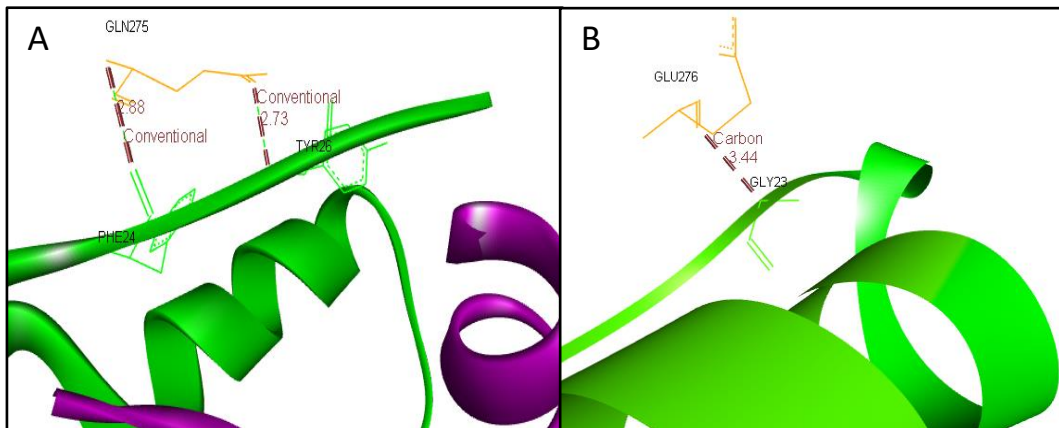
En la **Figura 3-13** se muestra la superficie de contacto del dominio L1 del receptor, que involucra a los residuos Tyr28 y Tyr54 en la interacción con glargina.

Figura 3-13: Superficie de contacto involucrando el dominio L1 de IGF1R en el modelo con glargina (Swarmdock 38a). **A.** Interacciones: Tyr28-GlnA5, Tyr28-GlnA15, Tyr28-AsnA18 y Tyr28-TyrA19. **B.** Interacciones Tyr54-TyrA14 y Tyr54-AsnA18: Glargina Cadena A en color Magenta, cadena B en color verde y L1 en color Azul.



Por otro lado, la **Figura 3-14** muestra la superficie de contacto del dominio CR del receptor, donde se encontrarían los residuos Gln275 y Glu276 interactuando con la glargina.

Figura 3-14: Superficie de contacto del dominio CR de IGF1R en el modelo con glargina (Swarmdock 38a). **A.** Interacciones: Gln275-PheB24 y Gln275-TyrB26. **B.** Interacción Glu276-GlyB23. Glargina Cadena A en color Magenta, cadena B en color verde y CR en color Naranja.



De las 23 interacciones observadas en el complejo glargina-IGF1R, veinte son por puentes hidrógeno, una por interacciones electrostáticas (Glu259-LysB29) y dos por enlaces hidrofóbicos (**Tabla 3-13**). La energía libre (ΔG) para este complejo fue de -16.85 Kcal/mol.

Tabla 3-13: Resumen interacciones modelo 38a.

Name	Distance	Category	Type
B:LYS29:NZ - CR:GLU259:OE1	5,34611	Electrostatic	Attractive Charge
L1:TYR28:OH - A:GLN5:OE1	3,38048	Hydrogen Bond	Conventional Hydrogen Bond
L1:TYR28:OH - A:GLN15:OE1	2,77847	Hydrogen Bond	Conventional Hydrogen Bond
L1:TYR28:OH - A:TYR19:OH	2,87218	Hydrogen Bond	Conventional Hydrogen Bond
L1:TYR54:OH - A:TYR14:OH	2,75495	Hydrogen Bond	Conventional Hydrogen Bond
L1:TYR54:OH - A:ASN18:OD1	2,75249	Hydrogen Bond	Conventional Hydrogen Bond
L1:LYS80:NZ - A:ASN18:O	2,71867	Hydrogen Bond	Conventional Hydrogen Bond
CR:GLN275:N - B:PHE24:O	2,88435	Hydrogen Bond	Conventional Hydrogen Bond
CR:SER279:N - B:GLU21:O	2,7384	Hydrogen Bond	Conventional Hydrogen Bond
CR:SER279:OG - B:GLU21:O	2,76438	Hydrogen Bond	Conventional Hydrogen Bond
A:GLY1:N - L1:GLY4:O	2,79481	Hydrogen Bond	Conventional Hydrogen Bond
A:GLY1:N - L1:GLY6:O	3,04554	Hydrogen Bond	Conventional Hydrogen Bond
B:TYR16:OH - CR:LYS300:OXT	2,94626	Hydrogen Bond	Conventional Hydrogen Bond
B:TYR26:N - CR:GLN275:OE1	2,73081	Hydrogen Bond	Conventional Hydrogen Bond
B:TYR26:OH - CR:GLU259:OE2	2,96216	Hydrogen Bond	Conventional Hydrogen Bond
B:LYS29:NZ - CR:SER279:OG	2,65315	Hydrogen Bond	Conventional Hydrogen Bond
L1:PRO5:CD - B:LYS29:O	3,53801	Hydrogen Bond	Carbon Hydrogen Bond
L1:LYS80:CE - A:CYS20:O	3,45821	Hydrogen Bond	Carbon Hydrogen Bond
B:SER9:CB - CR:ASP262:OD2	3,59848	Hydrogen Bond	Carbon Hydrogen Bond
B:GLY23:CA - CR:GLU276:O	3,43691	Hydrogen Bond	Carbon Hydrogen Bond
A:ASN18:ND2 - L1:TYR28	4,06245	Hydrogen Bond	Pi-Donor Hydrogen Bond
B:PRO28 - CR:LEU256	5,4489	Hydrophobic	Alkyl
A:TYR19 - L1:PRO5	5,45622	Hydrophobic	Pi-Alkyl

▪ **Modelo 55b:**

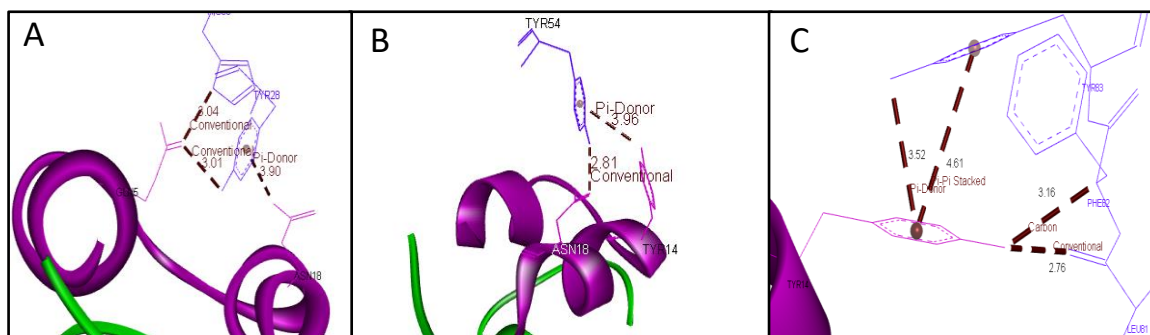
El modelo 55b contiene 18 Interacciones en total. La **Tabla 3-14** resume los residuos que interactúan en el modelo 55b.

Tabla 3-14: Residuos de contacto del complejo glargina-IGF1R (modelo 55b de SwarmDock). En negrita se encuentran marcados los residuos del receptor IGF1R, los residuos no marcados corresponden a glargina.

<i>Modelo</i>	<i>Interacciones compartidas con IGF1-IGF1R</i>	<i>Interacciones exclusivas de glargina-IGF1R</i>
55b <i>(SwarmDock)</i>	Tyr54 -TyrA14	Pro5 -LysB19
	Tyr54 -AsnA18	Pro5 -TyrA19
	Phe241 -PheB25	Gly6 -GlyA1
	Tyr28 -GlnA5	Gly6 -TyrA14
	Tyr28 -GlnA15	Arg18 -GluA4
	Tyr28 -AsnA18	Lys80 -Asn18
	His30 -GlnA5	Lys80 - CysA20
	His30 -GlnA15	Lys80 -GlyA21
	Leu81 -TyrA14	Glu259 -LysB29
	Phe82 -TyrA14	Glu259 -ProB28
	Tyr83 -TyrA14	Gln275 -PheB24
Glu276 -GlyB23	Gln275 -TyrB26.	

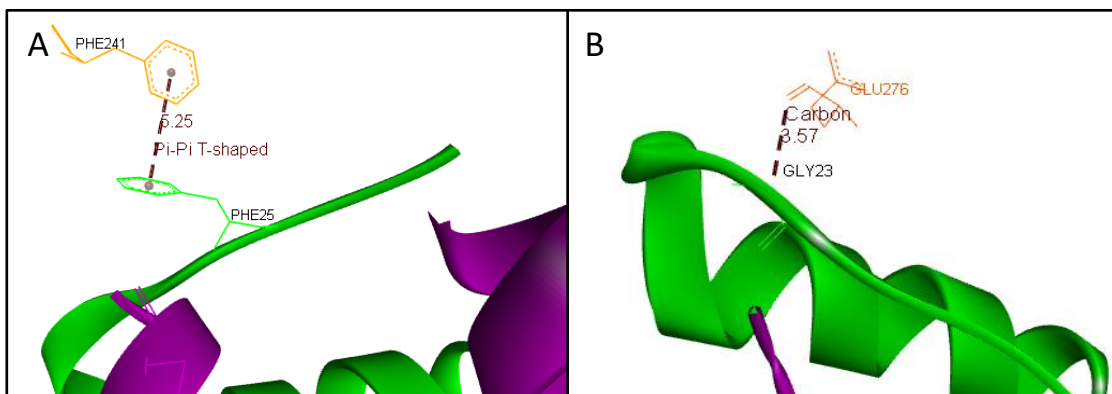
La **Figura 3-15** muestra la superficie de contacto del dominio L1 del receptor IGF1R, donde participan los residuos Tyr28, His30, Tyr54, Leu81, Phe82 y Tyr83 del receptor formando parte de la interacción con glargina.

Figura 3-15: Superficie de contacto del dominio L1 de IGF1R en complejo con glargina (Swarmdock 55b). **A.** Interacciones Tyr28-GlnA5, Tyr28-AsnA18 y His30-GlnA5. **B.** Interacciones Tyr54-TyrA14 y Tyr54-AsnA18. **C.** Interacciones Leu81-TyrA14, Phe82-TyrA14 y Tyr83-TyrA14. Glargina Cadena A en color Magenta, cadena B en color verde y L1 en color Azul.



La **Figura 3-16** por su parte, muestra la superficie de contacto del dominio CR del receptor IGF1R, donde se aprecian los residuos Phe241 y Glu276 formando parte de la interacción con glargina.

Figura 3-16: Superficie de contacto del dominio CR de IGF1R en complejo con glargina (Swarmdock 55b). **A.** Interacción Phe241-PheB25. **B.** Interacción Glu276-GlyB23. Glargina Cadena A en color Magenta, cadena B en color verde y L1 en color Azul.



De las 25 interacciones observadas en este modelo, 19 son por puentes de hidrógeno, tres por enlaces electrostáticos (Arg18-GluA4, Lys80-GlyA21 y Glu259-LysB29) y tres por enlaces hidrofóbicos (**Tabla 3-15**). La energía libre (ΔG) de este complejo fue de -14.0 Kcal/mol.

Tabla 3-15: Resumen interacciones modelo 55b.

Name	Distance	Category	Type
L1:ARG18:NH1 - A:GLU4:OE1	4,92577	Electrostatic	Attractive Charge
L1:LYS80:NZ - A:GLY21:O	4,90801	Electrostatic	Attractive Charge
B:LYS29:NZ - CR:GLU259:OE1	5,56797	Electrostatic	Attractive Charge
L1:GLY6:N - A:TYR19:OH	2,80248	Hydrogen Bond	Conventional Hydrogen Bond
L1:TYR28:OH - A:GLN5:OE1	3,01224	Hydrogen Bond	Conventional Hydrogen Bond
L1:TYR28:OH - A:GLN15:OE1	2,72233	Hydrogen Bond	Conventional Hydrogen Bond
L1:HIS30:ND1 - A:GLN5:OE1	3,03993	Hydrogen Bond	Conventional Hydrogen Bond
L1:TYR54:OH - A:ASN18:OD1	2,81069	Hydrogen Bond	Conventional Hydrogen Bond
L1:LYS80:NZ - A:ASN18:O	2,69221	Hydrogen Bond	Conventional Hydrogen Bond
L1:LYS80:NZ - A:CYS20:O	2,76745	Hydrogen Bond	Conventional Hydrogen Bond
CR:GLN275:N - B:PHE24:O	2,91151	Hydrogen Bond	Conventional Hydrogen Bond
A:GLY1:N - L1:GLY6:O	2,73522	Hydrogen Bond	Conventional Hydrogen Bond
A:TYR14:OH - L1:LEU81:O	2,76134	Hydrogen Bond	Conventional Hydrogen Bond
B:TYR26:N - CR:GLN275:OE1	2,75455	Hydrogen Bond	Conventional Hydrogen Bond
L1:PRO5:CD - B:LYS29:O	3,62806	Hydrogen Bond	Carbon Hydrogen Bond
L1:HIS30:CE1 - A:GLN15:OE1	3,24545	Hydrogen Bond	Carbon Hydrogen Bond
L1:PHE82:CA - A:TYR14:OH	3,16055	Hydrogen Bond	Carbon Hydrogen Bond
B:GLY23:CA - CR:GLU276:O	3,56733	Hydrogen Bond	Carbon Hydrogen Bond
B:PRO28:CD - CR:GLU259:OE2	3,48034	Hydrogen Bond	Carbon Hydrogen Bond
L1:TYR83:OH - A:TYR14	3,51699	Hydrogen Bond	Pi-Donor Hydrogen Bond
A:TYR14:OH - L1:TYR54	3,95846	Hydrogen Bond	Pi-Donor Hydrogen Bond
A:ASN18:ND2 - L1:TYR28	3,90026	Hydrogen Bond	Pi-Donor Hydrogen Bond
L1:TYR83 - A:TYR14	4,61142	Hydrophobic	Pi-Pi Stacked
CR:PHE241 - B:PHE25	5,24986	Hydrophobic	Pi-Pi T-shaped
A:TYR19 - L1:PRO5	4,73147	Hydrophobic	Pi-Alkyl

Entre los dos modelos finales 38a y 55b se observan interacciones (Tyr54-TyrA14, Tyr54-AsnA18, Tyr28-GlnA5, Tyr28-GlnA15, Tyr28-AsnA18, Glu276-GlyB23) que involucran residuos de IGF1R que han sido descritos como formar parte interacciones con IGF1 en su respectivo complejo homólogo.

Adicionalmente, en ambos modelos teóricos seleccionados, se observan tres interacciones que serían exclusivas para el complejo glargina-receptor IGF1R: Pro5-LysB19, Lys80-CysA20 y Glu259-LysB29, y las proponemos como interacciones importantes para la unión glargina-receptor IGF1R.

Por otro lado, los residuos PheB25 y ProB28 presentes tanto en glargina como en IGF1, interactúan de forma diferente con el receptor IGF1R; en el modelo con glargina, el residuo PheB25 interactúa con los residuos Phe241 y Glu259 del receptor, mientras que en el complejo con IGF1, este mismo residuo (PheB25) interactúa con los aminoácidos Phe82 y Tyr83 del receptor, y ProB28 lo hace con los residuos del receptor IGF1R Leu81, Tyr83 y Asp84 en el complejo glargina-receptor IGF1R (Harish & Cameron, 2010).

3.5 Diferencias y similitudes estructurales entre los modelos obtenidos.

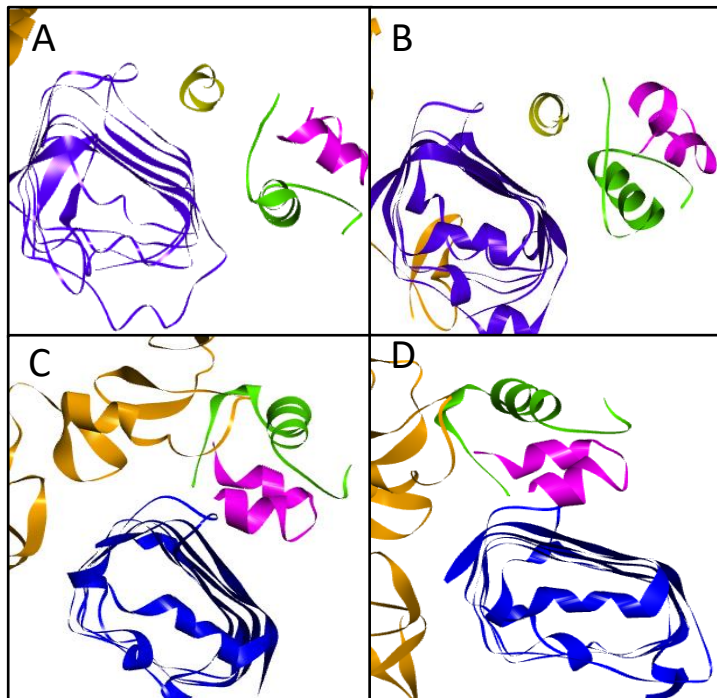
Para efectos comparativos, en la **Figura 3-17** se presenta un resumen de los modelos computacionales obtenidos para los complejos glargina-IR (**Figura 3-17A y B**) y glargina-IGF1R (**Figura 3-17C y D**).

Si se compara el posicionamiento de glargina en el receptor de insulina en los dos modelos teóricos propuestos (**Figura 3-17**, comparar **A** con **B**), se observa que la pose de este ligando respecto al receptor es diferente en los dos modelos. En el modelo 004.09 (**Figura 3-17A**), se aprecia que glargina presenta una ligera rotación hacia la derecha (en el sentido de movimiento de los punteros del reloj) comparado con su pose en el modelo 7d (**Figura 3-17B**).

En cuanto la pose de glargina en el receptor IGF1R (**Figura 3-17**, comparar **C** con **D**), se observa que el posicionamiento del ligando es ligeramente diferente en ambos modelos teóricos propuestos.

Por otro lado, si se compara el posicionamiento de glargina entre uno y otro receptor (IR versus IGF1R) (**Figura 3-17A, B** versus **Figura 3-17C y D**), se observa que glargina adopta orientaciones distintas entre uno y otro receptor (IR vs IGF1R), y estas diferencias son más drásticas que las diferencias de orientación observadas para los dos modelos de un mismo receptor.

Figura 3-17: Resumen de modelos teóricos 3D obtenidos. Se muestran los complejos para glargina-IR (**A**. Modelo 004.09 de clusPro; **B**. Modelo 07d de SwarmDock) y glargina-IGF1R (**C**. Modelo 38a de SwarmDock; **D**. Modelo 55b de SwarmDock). Glargina cadena A en color magenta, cadena B en color verde, CR en color naranja, L1 en color azul y α CT en color amarillo.



La **Tabla 3-16** muestra un resumen de los valores de energía libre de Gibbs relativa (ΔG) que los programas computacionales entregaron para todos los modelos finales seleccionados. La tabla muestra también los valores de la constante de disociación (K_d) teóricos que calculamos a partir de dicho valores para cada complejo, suponiendo una temperatura de 25°C, y utilizando la ecuaciones (3.2) que relaciona los cambios en la energía libre de Gibbs (ΔG) con la constante de equilibrio del complejo ligando-receptor:

$$\Delta G = RT(\text{Ln}K_d) \quad (3.1)$$

$$K_d = e^{-\Delta G^\circ/RT} \quad (3.2)$$

Donde:

ΔG = Energía libre de Gibbs

R = Constante de los gases (Relación entre energía, la temperatura y la cantidad de materia).

T = Temperatura

Ln = Logaritmo natural

K_d = constante de disociación (constante de equilibrio de la disociación del complejo)

Dado que las funciones matemáticas utilizadas para los cálculos energéticos varían de un programa a otro, los valores energéticos obtenidos con diferentes plataformas no son comparables. Así, para poder realizar una comparación de estos datos, fue necesario enfocarnos únicamente en los diferentes modelos obtenidos por un mismo programa (SwarmDock) ya que el valor de ΔG que arrojó ClusPro para el modelo 004.09 no es comparable con los valores ΔG de estos modelos (**Tabla 3-16**).

Tabla 3-16: Valores de ΔG y K_d de todos los modelos 3D finales obtenidos.

	Modelo	ΔG°	K_d
complejo glargina-IR	004.09 (ClusPro)	-948,9 kcal/mol	*
	7d (SwarmDock)	-20,89 kcal/mol	$4,2 \times 10^{-16}$
complejo glargina-IGF1R	38a (SwarmDock)	-16,85 kcal/mol	$3,9 \times 10^{-13}$
	55b (SwarmDock)	-14,0 kcal/mol	$4,9 \times 10^{-11}$

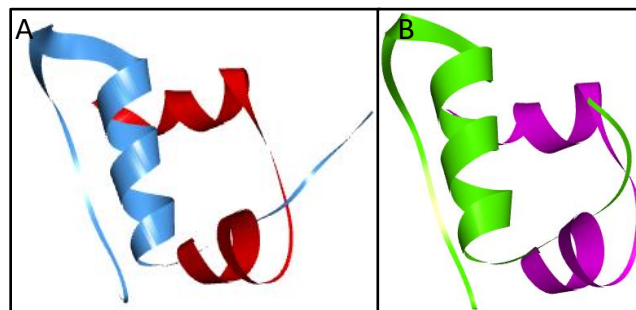
Este datos muestran que en nuestros modelos computacionales la afinidad de glargina por el receptor IR es aproximadamente tres órdenes de magnitud superior a la afinidad que presenta por el receptor IGF1R.

3.6 Superposición de estructuras

Dado que nuestra hipótesis de trabajo se fundamentó en la similitud estructural existente entre los ligandos de los receptores estudiados, y también entre los receptores mismos, a continuación, se decidió a confirmar este punto a través de un análisis comparativo de sus estructuras 3D.

La **Figura 3-18** muestra las estructuras conocidas tanto de insulina humana (**Figura 3-18A**) como de glargina (**Figura 3-18B**). En general, se aprecia que ambas estructuras presentan similitud en términos de su estructura secundaria y terciaria.

Figura 3-18: Estructuras 3D de insulina y de glargina. **A.** Insulina Humana PDB: 3W7Y (Sakabe et al, 2013). **B.** Estructura 3D glargina PDB: 4IYD (Barba de la Rosa, 2013). Insulina Cadena A en color rojo, cadena B en color azul y Glargina Cadena A en color magenta, cadena B en color verde. Imágenes tomadas de PDB.



Mediante la plataforma *EMBOSS Water* se realizó un alineamiento local entre insulina y glargina enfocado exclusivamente en el análisis de cada una de las cadenas por separado, el cual reveló que la insulina y glargina presentan un 100% de identidad y de similitud en 20 residuos de la cadena A y un 100% de identidad y de similitud en 21 residuos de la

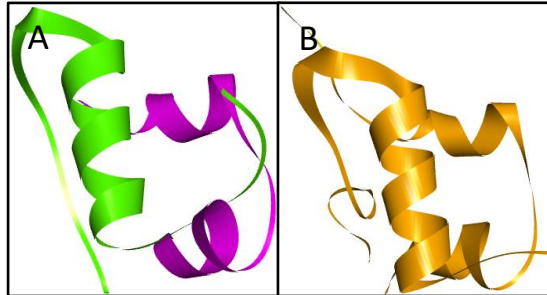
cadena B. Adicionalmente, se realizó un análisis comparativo de superposición de las estructuras 3D de glargina e insulina utilizando *Discovery Studio®* y la plataforma SuperPose. El resultado de este análisis (**Figura 3-19**) muestra que las estructuras 3D de glargina e insulina son altamente superponibles, con un valor RMSD de 1.5 Å, indicando alta similitud estructural. El mismo resultado de RMSD se observan cuando el análisis se realiza con la plataforma SuperPose.

Figura 3-19: Superposición de las estructuras 3D de insulina y glargina. El análisis se hizo con las estructuras de insulina humana (**PDB: 3W7Y**) y glargina (**PDB: 4IYD**). Realizado mediante *Discovery Studio®*. Insulina Cadena A (rojo), cadena B (azul) y Glargina Cadena A (magenta), cadena B (verde).



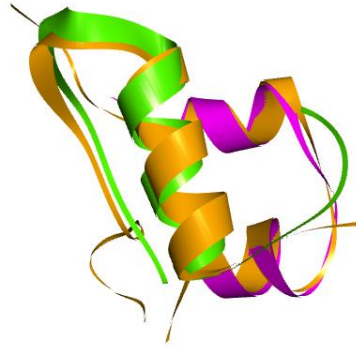
Adicionalmente, se decidió comparar la estructura de la glargina con la del factor de crecimiento IGF1, que es un ligando de alta afinidad por el receptor IGF1R. La **Figura 3-20** muestra las estructuras conocidas de glargina (**Figura 3-20A**) y de IGF1 (**Figura 3-20B**), se observa que las estructuras 3D también presentan alta similitud en términos de sus estructuras secundaria y terciaria.

Figura 3-20: Estructuras 3D de glargina y del factor de crecimiento IGF1. **A.** Estructura 3D de glargina, (PDB: 4IYD) (Barba de la Rosa, 2013). **B.** Estructura 3D de IGF1, (PDB: IGZR) (Brzozowski et al, 2002). Cadena A en magenta, cadena B en verde y el IGF1 en color naranja.



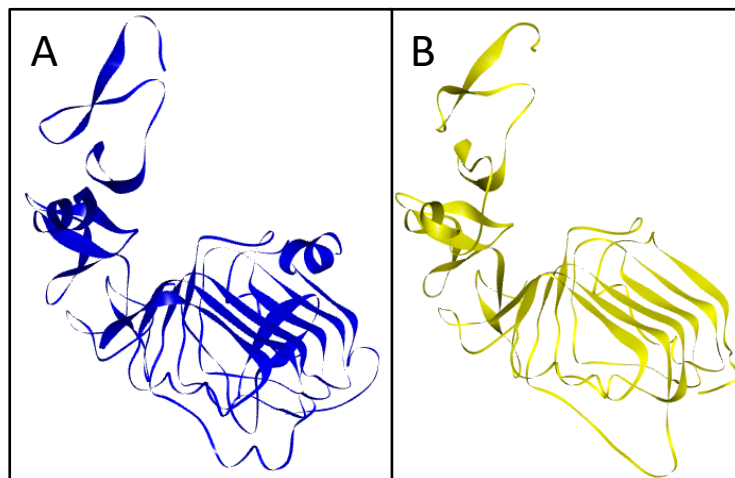
Adicionalmente, se realizó un análisis de alineamiento local entre glargina y el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF1) IGF1 mediante la plataforma *EMBOSS Water*, utilizando las cadenas A y B de glargina por separado para realizar este análisis. El análisis reveló una identidad del 55% y una similitud del 70% entre la cadena A de glargina e IGF1, mientras que para la cadena B de la glargina se observa una identidad del 61,9% y una similitud del 85.7%. También se realizó un análisis comparativo de superposición de las estructuras 3D utilizando la plataforma SuperPose, a partir del cual se observa que ambos ligandos de IGF1R son altamente superponibles (**Figura 3-21**), ya que ambas estructuras contienen tres hélices alfa totalmente superpuestas y además con un valor RMSD de 1.2 Å, indicando alta similitud estructural.

Figura 3-21: Superposición de las estructuras 3D de glargina e IGF1. Realizado mediante SuperPose (Maiti *et al*, 2004). Glargina Cadena A en color magenta, cadena B en color verde y el IGF1 en naranja.



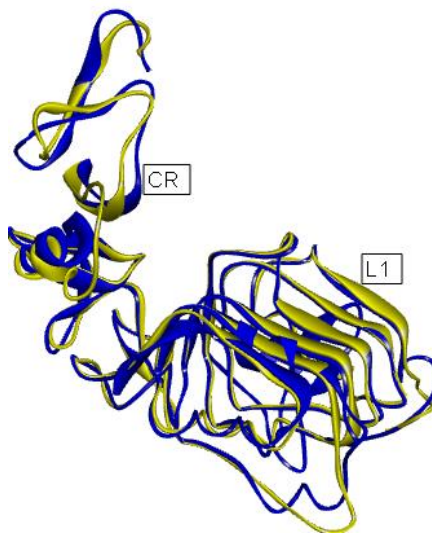
Por otro lado, y dado que la estructura 3D del receptor IR (**Figura 3-22A**) es similar a la del receptor IGF1R (**Figura 3-22B**), también se decidió realizar un análisis comparativo de alineamiento local de sus estructuras 3D centrados únicamente en los respectivos dominios que conforman el sitio 1 de unión del ligando. De acuerdo a la plataforma *EMBOSS Water*, se encontró una identidad del 57.5% y una similitud del 73.3%.

Figura 3-22: Estructuras 3D del receptor IR y del receptor IGF1R. **A.** Estructura 3D receptor IR (PDB: 3W11) (Barba de la Rosa, 2013). **B.** Estructura 3D del receptor IGF1, (PDB: 1IGR) (Garrett *et al*, 1998). Receptor IR en color azul y receptor IGF1R en color amarillo.



El análisis comparativo de superposición de ambas estructuras 3D utilizando la plataforma SuperPose mostró que son altamente superponibles (**Figura 3-23**), con un valor RMSD calculado de 1.97 Å.

Figura 3-23: Superposición de las estructuras 3D del receptor IR y el receptor IGF1R.



En resumen, los resultados muestran que el porcentaje de similitud e identidad entre la glargina e insulina, entre la glargina e IGF1 y entre los receptores IR e IGF1R son altos y por lo tanto, la hipótesis de trabajo y las suposiciones realizadas para el establecimiento de los criterios de selección se proponen como válidas.

4. Discusión

El presente estudio se planteó con el fin de intentar conocer la hipotética estructura y potenciales determinantes estructurales de la interacción ligando-receptor que involucra al análogo de insulina glargina y a los receptores IR e IGF1R, complejos cuyas estructuras 3D desconocen, siendo que esas fisiológica y patológica, y de esta manera poder intentar explicar observaciones previas de otros autores. Aunque el abordaje experimental ideal para este problema implicaría obtener cristales de ambos complejos y realizar estudios de difracción de rayos X, esto significaría un procedimiento largo y difícil porque la realización de estudios cristalográficos en esta familia de receptores ha resultado ser difícil, al extremo que los estudios con el receptor IGF1R se encuentran retrasados debido a la imposibilidad de cristalizar el receptor IGF1R en complejo con IGF1. En sistemas complejos como estos, los métodos de predicción computacionales pueden proporcionar pistas importantes hacia la comprensión de tales interacciones (Liu *et al*, 2013; Bharathi *et al*, 2014; Loyau *et al*, 2015).

Con base en lo anterior, se decidió realizar un acercamiento computacional al problema mediante un análisis de *Docking proteína-proteína* que nos proporcionara hipotéticos modelos estructurales 3D relacionados con la interacción ligando-receptor, específicamente del sistema glargina-IR y glargina-IGF1R.

Consideramos importante destacar que nuestros datos constituyen el primer trabajo enfocado en el estudio estructural de la interacción de glargina con estos receptores. En este sentido, se trata de un trabajo novedoso en el campo porque nos estamos moviendo en la línea de frontera del conocimiento en este sistema biológico, y podría servir de base para el diseño de nuevos estudios.

El trabajo inició con la búsqueda y selección de las estructuras necesarias para realizar el *docking*. En cuanto al receptor IR, en la base de datos de proteínas se encontró reportada la estructura del complejo insulina-IR (*holo* Receptor), con insulina fijada en el sitio 1 de unión (Menting *et al*, 2013). En cuanto al receptor IGF1R, no se ha reportado la estructura del *holo* receptor con el ligando IGF1, pero si se encontró reportada la estructura 3D del receptor vacío (*apo* Receptor). La complejidad y numerosas glicosilaciones de los receptores IR e IGF1R dificulta la cristalización y por lo tanto la mayoría de estructuras reportadas corresponden a fragmentos del receptor y en algunos casos presentan baja resolución, por lo tanto el uso de herramientas bioinformáticas se constituye en una ayuda valiosa, permitiendo seleccionar regiones claves de interacción y realizar acoplamientos que son de gran importancia para el acercamiento al conocimiento de las interacciones en este tipo de proteínas. En cuanto al ligando glargina, recientemente ha sido reportada la estructura 3D de glargina y corresponde únicamente al metabolito M2, que es uno de los dos metabolitos activos en el plasma sanguíneo. Ante esto, en nuestro estudio empleó la estructura del metabolito M2 que se diferencia de la glargina original en solo tres residuos, como se mostró en el marco teórico.

Las plataformas usadas para la predicción de las interacciones (*docking*) de los complejos glargina-receptor IR y glargina-receptor IGF1R nos permitieron obtener un total de 1444 modelos computacionales de los complejos glargina-receptor IR y glargina-receptor IGF1R, de los cuales finalmente se escogieron cuatro modelos, dos modelos para cada complejo.

Los criterios de selección de potenciales modelos finales se basaron en la hipotética alta homología estructural entre los ligandos (insulina, glargina, IGF1), especialmente entre insulina y glargina, y también entre los receptores (IR e IGF1R), especialmente en el 'sitio 1' de unión de ligando, del cual se conocen detalles estructurales a partir de técnicas cristalográficas (Garrett *et al*, 1998; Menting *et al* 2013). En contraste, poco se sabe del sitio 2 así que el presente estudio se centró exclusivamente en el 'sitio 1' de de ambos receptores. Con la idea de analizar la validez de nuestros supuestos, se realizó un análisis estructural comparativo de los ligandos y de los receptores. Los resultados dicho análisis nos permiten decir con cierto grado de confiabilidad, que nuestra hipótesis de trabajo y las suposiciones realizadas para el establecimiento de los criterios de selección son válidas,

ya que el porcentaje de similitud e identidad entre la glargina e insulina y entre la glargina e IGF1 son altos. Adicionalmente, también se observa los receptores IR e IGF1R comparte una alta identidad y similitud en el sitio 1 de unión, lo cual también valida nuestro análisis. No obstante, no podemos descartar la posibilidad de que los modelos planteados sean diferentes respecto a lo real. Futuros estudios deberían ayudarnos en este sentido.

Por regla general, este tipo de estudios computacionales seleccionan modelos con base a los menores puntajes de energía libre (ΔG) calculada teóricamente, ya que biológicamente se supone que el complejo más estable es el que posee la menor energía libre. Aunque cada plataforma computacional calcula un puntaje de energía para los diferentes modelos generados, estos valores no fueron tenidos en cuenta en nuestros criterios de selección, ya que los modelos que correspondían a dichos puntajes de menor energía mostraban interacciones con residuos que no correspondían al 'sitio 1' de unión de cada receptor. La presencia de estos complejos diferentes a lo esperado se debe a que los algoritmos que realizan la búsqueda de la superficie de contacto son limitados y la energía libre de asociación es altamente dependiente del sistema particular (Vajda & Camacho, 2004; Zhen *et al*, 2012; Moal *et al*, 2013). Por lo tanto, en algunos complejos no es un criterio confiable de selección y es necesario tener en cuenta la información que se conoce a cerca de las proteínas con las que se quiere realizar la interacción (Karaka & Bonvin, 2013; Rodrigues *et al*, 2013; Loyau *et al*, 2015).

Un hecho interesante de la realización del *docking* es que aunque se alimentaron los servidores (SwarmDock y HADDOCK) con los residuos activos del 'sitio 1' reportados en la literatura tanto para IR como para IGF1R, sólo algunos de estos residuos resultaron formando parte de la superficie de contacto en los modelos finales seleccionados, y en muchos casos las interacciones involucraron residuos diferentes a los que se introdujeron en el servidor. Esto puede deberse a que SwarmDock y HADDOCK utilizan la información con la que se alimenta el servidor de forma diferente: SwarmDock utiliza la información únicamente para realizar una pre-orientación del *docking*, y la optimización y el refinamiento se llevan a cabo sin ninguna contribución de estos datos; HADDOCK, por su parte, utiliza la información durante todo el protocolo de *docking* incluyendo la fase de refinamiento.

En este estudio computacional se observaron interacciones involucrando a los residuos PheB24 y PheB25 de glargina similares a las reportadas por Menting *et al* (2014) para el complejo homólogo con insulina. Para ese complejo tales autores proponen que podría darse una posible reubicación del extremo C-terminal de la cadena B de glargina, ocupando un espacio entre el α CT y L1. En los modelos 004.09 y 7d se observa un posicionamiento de la cadena B entre α CT y L1 muy parecido al observado por Menting *et al* (2014). En el modelo 7d, la cadena lateral del residuo PheB24 está anclada en un bolsillo hidrofóbico delimitada por los residuos ValB12, LeuB15, TyrB16, y CysB19 de la cadena B, y se encuentra interactuando directamente con Leu37 (**Figura 1 anexo A**).

A diferencia de lo observado por Menting *et al* (2014), quienes proponen que las cadenas laterales de PheB25 y TyrB26 de insulina interactúan con Val715 y se encuentran cerca del residuo Arg14 sin contacto aparente, en nuestro modelo 004.09 con glargina se observa que ambas cadenas laterales de la glargina interactúan con el residuo Phe714 y no se encuentran cerca de Arg14 (**Figura 2 anexo A**).

El posicionamiento de la cadena B de glargina observado en los modelos 004.09 y 7d concuerda con el 'modelo de desprendimiento' propuesto para la interacción insulina-receptor IR, que supone un cambio conformacional cuando la hormona se une al receptor, en donde el C-terminal de la cadena B (residuos B24-B30) de insulina se desplazaría desde el núcleo helicoidal exponiendo sus residuos no polares por medio de una torsión de los residuos B20-B23 (Derewenda *et al*, 1991; Hua *et al*, 2009).

En los dos modelos presentados en este trabajo para la interacción glargina-IGF1R, los tres aminoácidos PheB24-PheB25-TyrB26 están formando parte de interacciones con el receptor (Gln275-PheB24 y Gln275-TyrB26 para el modelo 38a; Phe241-PheB25 para el modelo 55b). Esto podría sugerir que la conservación de estos tres residuos es importante para el reconocimiento del receptor.

La presencia de diferentes interacciones en cada uno de los modelos escogidos pueden llegar a ser parte de una compleja coreografía de cambios conformacionales que puede

darse durante la etapa de reconocimiento y unión al receptor, lo que conduciría a la activación del dominio tirosin-quinasa del receptor y podrían conducir a múltiples salidas de señalización desde los receptores. Cabe resaltar que los análogos utilizados para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo I en su mayoría poseen modificaciones en la cadena B que producen un cambio en su perfil farmacocinético; por lo tanto, el entendimiento de estas interacciones de los residuos de la cadena B con otros receptores como el receptor IGF1R podría producir conocimiento importante para el diseño de nuevos análogos de insulina.

Por último, lo que nos llevó a la realización de este trabajo fue la posibilidad planteada por diferentes autores de que glargina podría estimular vías mitogénicas a través de la activación de receptores como el IGF1R (Drejer, 1992; Sliker *et al*, 1997; Kurtzhals *et al*, 2000; Ciaraldi *et al.*, 2001; Vajo *et al.*, 2001; Rakatzi *et al.*, 2003; Jensen and De Meyts, 2009; Siacca *et al*, 2012). Una posibilidad que pudiese explicar esto es que la unión de glargina a IGF1R pudiese ser de mayor afinidad que la unión al receptor IR. Sin embargo, los datos obtenidos con nuestro estudio son opuestos a dicha posibilidad, puesto que en nuestros modelos la afinidad teórica de glargina por el receptor IR ($K_d= 4,2 \times 10^{-16}$) fue mayor que por el receptor IGF1R ($K_d= 3,9 \times 10^{-13}$ y $K_d= 4,9 \times 10^{-11}$). Si bien es cierto que las constantes de equilibrio teóricas calculadas a partir de los valores de energía libre de los programas de Docking no siempre se relacionan con las medidas experimentales, en nuestro caso encontramos alguna coincidencia con un trabajo experimental publicado. En efecto, en células Saos-2 en cultivo, Sommerfeld *et al* (2010) ha observado que el metabolito M2 de glargina (el mismo empleado en nuestro estudio) interactúa con IR con una afinidad aproximadamente 400 veces superior a del receptor IGF1R, lo que coincide bien con nuestros datos. Aunque esto no parece sustentar la hipótesis de que glargina actuaría más por la vía de IGF1R, si parecería dar sustento a nuestro estudio teórico computacional, porque los datos de nuestro estudio parecen coincidir con datos experimentales publicados en relación con la afinidad relativa de glargina por estos receptores.

Finalmente, los resultados presentados en este trabajo pueden servir de base para la realización de estudios experimentales posteriores, que validarían o descartarían la

información teórica propuesta en este trabajo, tal como ha ocurrido con trabajos publicados por diferentes autores (Venkatesan *et al*, 2015; Wu *et al*, 2016). Por lo pronto, el presente trabajo nos presenta unos pocos modelos estructurales hipotéticos para la interacción de glargina con los receptores IR e IgF1R.

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

1. Se logró proponer dos modelos estructurales 3D para el complejo glargina receptor IGF1R mediante cuatro plataformas bioinformáticas.
2. Los dos modelos propuestos para glargina-IR presentan similitud con la estructura conocida del complejo Insulina- receptor IR.
3. Los modelos obtenidos para glargina-IR muestran varias interacciones diferentes con la estructura conocida del complejo Insulina- receptor IR.
4. Los modelos obtenidos para glargina-IGF1R muestran interacciones con residuos diferentes a la información conocida del complejo IGF1-IGFIR.
5. La afinidad relativa de glargina por el receptor IR es mayor que su afinidad relativa por el receptor IGF1R.

5.2 Recomendaciones

1. Realizar estudios de dinámica molecular con el fin de establecer otras posibles similitudes y diferencias de la estabilidad de la interacción entre glargina y los receptores IR e IGF1R.
2. Realizar estudios experimentales bioquímicos de las interacciones entre los glargina y los receptores IR e IGF1R para conocer con precisión las bases estructurales de dicha interacción y como estas podrían o no afectar la proliferación celular.
3. Enfocar la información teórica y experimental futura hacia el diseño de nuevos fármacos análogos de insulina.

A. Anexo: Figuras

Figura A-1 Similitud entre el modelo glargina- receptor IR vs interacción insulina-receptor IR. **A.** Posicionamiento de la cadena lateral del residuo PheB24 anclada al bolsillo hidrofóbico delimitada por los residuos de la cadena B ValB12, LeuB15, TyrB16, y CysB19 y su interacción con leu37 en la estructura insulina-IR de Menting et al, 2014. **B.** Posicionamiento de la cadena lateral del residuo PheB24 anclada al bolsillo hidrofóbico delimitada por los residuos de la cadena B ValB12, LeuB15, TyrB16, y CysB19 y su interacción con leu37 del modelo glargina-IR 7d.

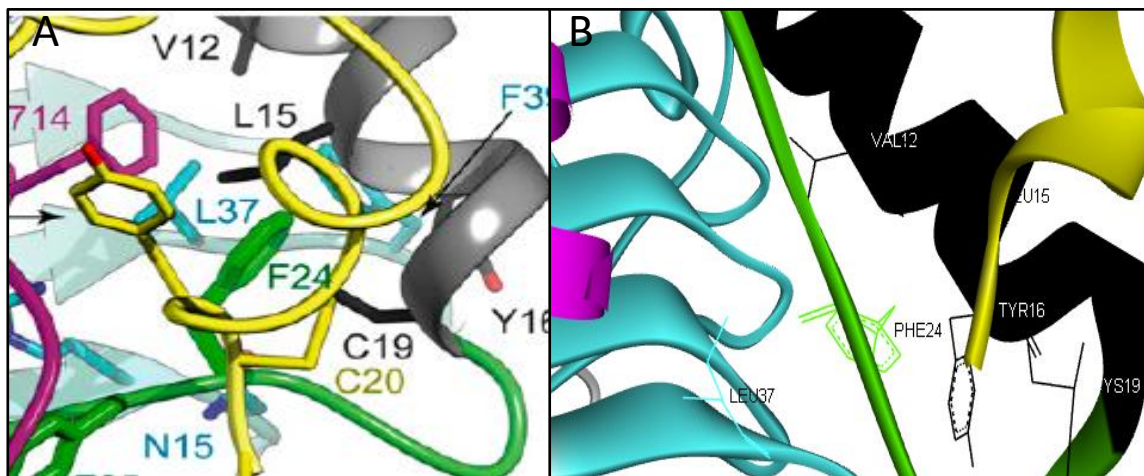
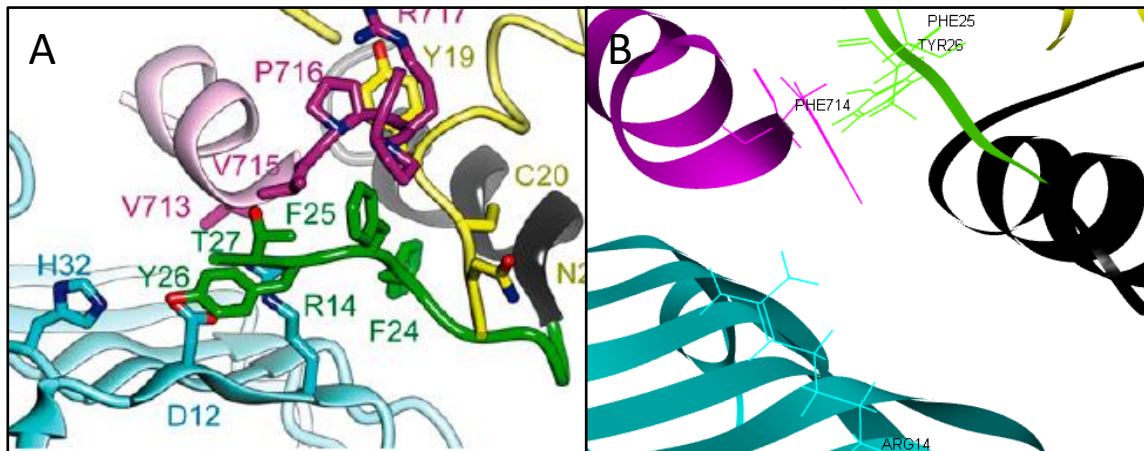


Figura A-2 Diferencia entre el modelo glargina- receptor IR vs interacción insulina-receptor IR **A.** Posicionamiento de la cadena lateral de los residuos PheB25 y TyrB26 y su interacción con Phe714 en la estructura insulina-IR de Menting et al, 2014. **B.** Posicionamiento de la cadena lateral de los residuos PheB25 y TyrB26 y su interacción con Phe714 en el modelo glargina-IR 004.09.



Bibliografía

Abel JJ. (1926). Crystalline insulin. Proc Natl Acad Sci.12:132–136.

Accelrys Software Inc. (2007). Discovery Studio Modeling Environment, Release v4 1.0.14169, San Diego: Accelrys Software Inc.

Annunziata M, Granata R, Ghigo E. (2011). The IGF system Acta Diabetol 48:1–9

Ardila-Muñoz, A.Y. (2014). Análogos de la insulina y su relación con cáncer: Revisión Sistemática. Tesis de Maestría, Universidad Nacional de Colombia.

Baker EN, Blundell TL, Cutfield JF, Cutfield SM, Dodson EJ, Dodson GG, Hodgkin DC, Hubbard RE, Isaacs NW, Reynolds CD, Sakabe K, Sakabe N, Vijayan M. (1988). The structure of 2 Zn pig insulin crystals at 1.5 Å resolution. Philos Trans R Soc London. B319:369–456.

Barba de la Rosa, A.P., Lara-Gonzalez, S., Montero-Moran, G.M., Escobedo-Moratilla, A., Perez-Urizar, J.T. (2013). Physicochemical and structural analysis of a biosimilar insulin glargine formulation and its reference. Journal: to be published. <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=4IYD>

Bastard K, Saladin A and Prévost C. (2011). Accounting for Large Amplitude Protein Deformation during in Silico Macromolecular Docking. Int. J. Mol. Sci. 12, 1316-1333.

Belfiore A, Frasca F, Pandini G, Sciacca L, Vigneri R. (2009). Insulin receptor isoforms and insulin receptor/insulin-like growth factor receptor hybrids in physiology and disease. *Endocr Rev.* Oct;30(6):586-623

Belfiore A & Malaguarnera R. (2011). Insulin receptor and cancer. *Endocrine Related Cancer* 18 R125–R147.

Berg J, Tymoczko J L., Stryer L. (2012). *Biochemistry seventh edition*. Editor: W. H. Freeman; Edición: 7th edition (20 de abril de 2011), New york, EE.UU. 1026 páginas.

Berman H.M, Westbrook J, Feng Z., Gilliland G., Bhat T.N., Weissig H., Shindyalov I.N., Bourne P.E. (2000) *The Protein Data Bank Nucleic Acids Research*, 28: 235-242.

Bharathi A, Roopan S.M, Vasavi C.S, Munusami P, Gayathri G. A, Gayathri M. (2014). In Silico Molecular Docking and In Vitro Antidiabetic Studies of Dihydropyrimido[4,5-a]acridin-2-amines. *Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International Volume 2014*, Article ID 971569, 10 pages.

Blundell TL, Cutfield JF, Cutfield SM, Dodson EJ, Dodson GG, Hodgkin DC, Mercola DA, Vijayan M. (1971). Atomic positions in rhombohedral 2-zinc insulin crystals. *Nature.* 231(5304): 506–11.

Blundell TL, Cutfield JF, Dodson EJ, Dodson GG, Hodgkin DC, Mercola DA. (1972). The crystal structure of rhombohedral 2 zinc insulin. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 36: 233–41.

Bonvin A. (2013). Coming to peace with protein complexes? 5th CAPRI evaluation meeting, April 17-19th, Utrecht. *Proteins.* Dec;81(12):2073-4.

Brzozowski, A.M., Dodson, E.J., Dodson, G.G., Murshudov, G., Verma, C., Turkenburg, J.P., De Bree, F.M., Dauter, Z. (2002). Structural Origins of the Functional Divergence of Human Insulin-Like Growth Factor-I and Insulin. *Biochemistry* 41: 9389-9397

Carlsson A, Karamihos E, Schroeder-Lang SM, Gunnarsson R. (2012). Determination of glargine and its metabolites M1 and M2 by using a combination of Mercodia insulin assays of different specificity. Mercodia Booth, ADA, Philadelphia, USA. June 8- 12

Chen V, W. Arendall B III, Jeffrey J. Headd, Daniel A. Keedy, Robert M. Immormino, Gary J. Kapral, Laura W. Murray, Jane S. Richardson and David C. Richardson. (2010) MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallographica D66*: 12-21.

CiprianiThorne E & Quintanilla A. (2010). Diabetes mellitus tipo 2 y resistencia a la insulina. *Revista Médica Herediana*, 21(3): 160-170.

Ciaraldi TP & Sasaoka T. (2011). Review on the in vitro interaction of insulin glargine with the insulin/insulin-like growth factor system: potential implications for metabolic and mitogenic activities. *Horm Metab Res*. 43: 1–10.

Colhoun HM. (2009). Use of insulin glargine and cáncer incidence in Scotland: a study from the Scottish Diabetes Research Network Epidemiology Group. *Diabetologia* 52: 1755–1765.

Comeau SR, Gatchell DW, Vajda S, Camacho CJ. (2004a). ClusPro: an automated docking and discrimination method for the prediction of protein complexes. *Bioinformatics*. Jan 1; 20 (1): 45-50.

Comeau SR, Gatchell DW, Vajda S, Camacho CJ. (2004b). ClusPro: a fully automated algorithm for protein-protein docking. *Nucleic Acids Res*. Jul 1; 32 (Web Server issue): W96-9.

Davis Ian W. Davis, Andrew Leaver-Fay, Vincent B. Chen, Jeremy N. Block, Gary J. Kapral, Xueyi Wang, Laura W. Murray, W. Bryan Arendall III, Jack Snoeyink, Jane S. Richardson and David C. Richardson. (2007). *Nucleic Acids Research* 35: W375-W383.

De Meyts P & Whittaker J. 2002. Structural biology of insulin and IGF1 receptors: implications for drug design. *Nat Rev Drug Discover.* 1: 769-783

De Meyts P. (2004). Insulin and its receptor: structure, function and evolution. *Bioessays* Dec;26(12):1351-62.

Derewenda U, Derewenda Z, Dodson EJ, Dodson GG, Bing X, Markussen J. (1991). X-ray analysis of the single chain B29-A1 peptide-linked insulin molecule. A completely inactive analogue. *J Mol Biol* 220(2): 425–433.

Discovery Studio® Visualizer, Accelrys Software Inc, (2007).

Dominguez C, Boelens R and. Bonvin A.M.J.J. (2003). HADDOCK: a protein-protein docking approach based on biochemical and/or biophysical information. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 1731-1737

Drejer, K. (1992). The bioactivity of insulin analogues from in vitro receptor binding to in vivo glucose uptake. *Diabetes Metab. Rev.* 8, 259–285.

Garrett, T.P., McKern, N.M., Lou, M., Frenkel, M.J., Bentley, J.D., Lovrecz, G.O., Elleman, T.C., Cosgrove, L.J., Ward, C.W. (1998). Crystal structure of the first three domains of the type-1 insulin like growth factor receptor. *Nature* 394: P: 395-399.

Garrett T, McKern N, Lou M, Elleman T, Adams T, Lovrecz G, Zhu H, Walker F, Frenkel M, Hoyne P, Jorissen R, Nice E, Burgess A, Ward C. (2002). Crystal Structure of a Truncated Epidermal Growth Factor Receptor Extracellular Domain Bound to Transforming Growth Factor α . *Cell*. Sep 20; 110 (6): 763-73.

Gasteiger E., Gattiker A., Hoogland C., Ivanyi I., Appel R.D., Bairoch A. (2003). ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis *Nucleic Acids Res.* 31:3784-3788.

Gauguin L1, Delaine C, Alvino CL, McNeil KA, Wallace JC, Forbes BE, De Meyts P. (2008). Alanine scanning of a putative receptor binding surface of insulin-like growth factor-I. *J Biol Chem*. Jul 25; 283(30): 20821-9.

Harish V & Cameron F. A. (2010). All-Atom Structural Models for Complexes of Insulin-Like Growth Factors IGF1 and IGF2 with Their Cognate Receptor. *J. Mol. Biol.* 400, 645– 658.

Hemkens LG, Grouven U, Bender R, Gunster C, Gutschmidt S, Selke GW & Sawicki PT. (2009). Risk of malignancies in patients with diabetes treated with human insulin or insulin analogues: a cohort study. *Diabetologia* 52 1732–1744.

Hilgenfeld R, Seipke G, Berchtold H, Owens D. (2014). The Evolution of Insulin Glargine and its Continuing Contribution to Diabetes Care. *Drugs*. Jun; 74(8):911-27.

Hua QX, Xu B, Huang K, Hu SQ, Nakagawa S, Jia W, Wang S, Whittaker J, Katsoyannis PG, Weiss MA. (2009). Enhancing the activity of a protein by stereospecific unfolding: Conformational life cycle of insulin and its evolutionary origins. *J Biol Chem* 284 (21):14586–14596.

Hubbard SR and Till JH. (2000). Protein tyrosine kinase structure and function. *Annu Rev Biochem.* 69: 373-98.

Jackson RM. Predicting the structure of protein-biomolecular interactions (2005). In: *Bioinformatics: Genes, Proteins & Computers*. Edited by Orengo CA, Jones DT, Thornton JM. BIOS Scientific Publishers Limited. pp 203-216.

Jensen, M., and De Meyts, P. (2009). Molecular mechanisms of differential intracellular signaling from the insulin receptor. *Vitam. Horm.* 80, 51–75.

Jonasson JM, Ljung R, Talback M, Haglund B, Gudbjornsdottir S & Steineck G. (2009). Insulin glargine use and short-term incidence of malignancies—a population based followup study in Sweden. *Diabetologia* 52 1745-1754.

Karaca E, Bonvin A. (2013). Advances in integrative modeling of biomolecular complexes *Methods* 59; 372–38.

Keiko U, Takayuki A, Kayoko H, Keiichi M, Taishi H, Fumitoshi H, Naomi O, James D. P, Kaneto U and Hidetoshi. (2011). Research Article: Effects of Selected Anionic β -Cyclodextrins on Persistence of Blood Glucose Lowering by Insulin Glargine after Subcutaneous Injection to Rats. *A Journal of Drug Delivery* p: 1-9.

Kenneth S, Polonsky, M. (2012). The Past 200 Years in Diabetes- *N Engl J Med*; 367:1332-1340 October 4.

Keyhanfar M, Booker G, Whittaker J, Wallace J and Forbes B. (2007). Precise mapping of an IGF-I-binding site on the IGF-1R *Biochem. J.* 401, 269–277.

Kavran J, McCabe J, Byrne P, Connacher M, Wang Z, Ramek A, Sarabipour S, Shan Y, Shaw D, Hristova K, Cole P, Leahy D. (2014). How IGF-1 activates its receptor. *eLife*; 3:e03772 P: 1-28.

Kuerzel GU, Shukla U, Scholtz HE, Pretorius S, Wessels DH, Venter C, Potgieter MA, Lang AM, Koose T, Bernhardt E. (2003). Biotransformation of insulin glargine after subcutaneous injection in healthy subjects. *Current Medical Research & Opinion* 19:34–40.

Kurtzhals, P., Schaffer, L., Sorensen, A., Kristensen, C., Jonassen, I. Schmid, C., and Trub, T. (2000). Correlations of receptor binding and metabolic and mitogenic potencies of insulin analogs designed for clinical use. *Diabetes* 49, 999–1005.

Kwok SC, Steiner DF, Rubenstein AH, Tager HS. (1983). Identification of a point mutation in the human insulin gene giving rise to a structurally abnormal insulin (insulin Chicago). *Diabetes*. 32(9): 872–5.

Laurie A.T.R & Jackson R. M. (2005). Q-SiteFinder: an energy-based method for the prediction of protein–ligand binding sites. *Bioinformatics*. May 1; 21(9): 1908-16.

Lensink MF & Wodak SJ. (2013). Docking, scoring, and affinity prediction in CAPRI. *Proteins: Structure, Function, Bioinformatics*. 81(12): 2082-2095.

Lensink M.F, Velankar, Kryshtafovych A, Wodak j. (2014). CAPRI Round 30 CASP-11 Assessment of predicted protein complexes. EMBL-EBI, Wellcome Genome Campus, Hinxton, Cambridgeshire, CB10 1SD, UK. Recuperado De: http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/capri/round30/CAPRI_R30_v20141224.SW.pdf

Leis S & Zacharias M. (2011). Efficient inclusion of receptor flexibility in grid-based protein–ligand docking. *J Comput Chem*. 2011 Dec; 32(16): 3433-9.

Li W, Cowley A, Uludag M, Gur T, McWilliam H, Squizzato H, Park Y.M, Buso N and Lopez R. (2015). The EMBL-EBI bioinformatics web and programmatic tools framework. *Nucl. Acids Res.* 43 (W1) :W580-4.

Liu a, Li b, Lin a, Fan a, Liang b, Heemann c. (2011). High dose human insulin and insulin glargine promote T24 bladder cancer cell proliferation via PI3K-independent activation of Akt. *Diabetes research and clinical practice* 91; p177– 182.

Liu a, Yip b, Song c, Feng d, Liu d, Lai d, Zhang b, Huang. (2013). Inhibiting enzymatic starch digestion by the phenolic compound diboside A: A mechanistic and in silico study. *Food Research International* 54; 595–600

Loyau J, Didelot G, Malinge P, Ravn U, Magistrelli G, Depoisier J-F, Pontini G, Poitevin Y, Kosco-Vilbois M, Fischer N, Thore S and Rousseau F. (2015). Robust Antibody–Antigen Complexes Prediction Generated by Combining Sequence Analyses, Mutagenesis, In Vitro Evolution, X-ray Crystallography and In Silico Docking. *J Mol Biol* 427, 2647–2662

Lucidi P, Porcellati F, Yki-Järvinen H, Riddle M, Candeloro P, Marinelli Andreoli A, Bolli G, and Fanelli C. (2015). Low Levels of Unmodified Insulin Glargine in Plasma of People With Type 2 Diabetes Requiring High Doses of Basal Insulin *Diabetes Care* 38:e96–e97

Maiti R, Domselaar G.V, Zhang H, and Wishart D. (2004). SuperPose: a simple server for sophisticated structural superposition. *Nucleic Acids Research*, Vol. 32, W590–W594

Menting J.G, Whittaker² J, Margetts M, Whittaker L.J, K.-W. Kong J, Smith B.J, Watson C.J, kova L, Kletvikova E, Jiracek J, Chan SJ, Steiner D.F, Dodson G.G, Brzozowski A.M, Weiss M.A, Ward C.W & Lawrence M.C. (2013). How insulin engages its primary binding site on the insulin receptor. *Nature*, 10 January, vol 493: 241-245.

Menting J, Yang Y, Chan SJ, Phillips NB., Smith BJ, Whittaker J, Wickramasinghe NP., Whittaker L J, Pandeyarajan V, Wan Z-li, Yadav S P., Carroll J M, Strokes N, Roberts CT, Jr.f,h, Beigi FI, Milewski W, Steiner D, Chauhan VS, Ward C, Weiss MA, and Lawrence

MC. (2014). Protective hinge in insulin opens to enable its receptor engagement. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Aug 19; 111(33): E3395-404.

McWilliam H, Li W, Uludag M, Squizzato S, Park YM, Buso N, Cowley AP, Lopez R. (2013). Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI. *Nucleic Acids Res*. Jul;41(Web Server issue):W597-600.

Moal I.H & Bates P.A. (2010). SwarmDock and the Use of Normal Modes in Protein-Protein Docking. *Int. J. Mol. Sci*. 11, 3623-3648.

Moal, Torchala M, Bates M and Recio J. (2013). The scoring of poses in protein-protein docking: current capabilities and future directions. *Bioinformatics* 14: 286: 2-15.

Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S. and Olson, A. J. (2009). Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. *J. Computational Chemistry* 16: 2785-91.

Nanjo K, Sanke T, Miyano M, Okai K, Sowa R, Kondo M, Nishimura S, Iwo K, Miyamura K, Given BD. (1986). Diabetes due to secretion of a structurally abnormal insulin (insulin Wakayama). Clinical and functional characteristics of [LeuA3] insulin. *J Clin Invest*. 77(2): 514-9.

Newsholme EA, Dimitriadis G. (2001). Integration of biochemical and physiologic effects of insulin on glucose metabolism. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 109 Suppl 2: S122-34.

Pullen RA, Lindsay DG, Wood SP, Tickle IJ, Blundell TL, Wollmer A, Krail G, Brandenburg D, Zahn H, Gliemann J, Gammeltoft S. (1976). Receptor-binding region of insulin. *Nature*. 259 (5542): 369-73.

The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8 Schrödinger, LLC.

Rakatzi, I., Ramrath, S., Ledwig, D., Dransfeld, O., Bartels, T., Seipke, G., and Eckel, J. (2003). A novel insulin analog with unique properties: LysB3, GluB29 insulin induces prominent activation of insulin receptor substrate 2, but marginal phosphorylation of insulin receptor substrate 1. *Diabetes* 52, 2227–2238.

Rice P, Longden I, Bleasby A. (2000). EMBOSS: the European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends Genet.* Jun;16(6):276-7.

Rodrigues, A. Melquiond S. J. Karaca E, Trellet M. van Dijk M, van Zundert G. C. P, Schmitz C, de Vries S. J., Bordogna A, Bonati L, Kastritis P. L, and Bonvin A. (2013). Defining the limits of homology modeling in information-driven protein docking. *Proteins* 81:2119–2128

Ruiter R, Visser LE, van Herk-Sukel MP, Coebergh JW, Haak HR, Geelhoed-Duijvestijn PH, Straus SM, Herings RM & Stricker BH. (2012). Risk of cancer in patients on insulin glargine and other insulin analogues in comparison with those on human insulin: results from a large population-based followup study. *Diabetologia* 55: 51–62.

Saltiel A, Pessin J. (2002). Insulin signaling pathways in time and space. *Trends in Cell Biology* Volume 12, Issue 2, p65–71.

Sakabe, N., Sakabe, K., Sasaki, K., Murayoshi, M. (2013). 0.92Å structure of 2Zn human insulin at 100K. Journal: To be published:
<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3w7y>

Sanner. M. (1999). Python: A Programming Language for Software Integration and Development. *J. Mol. Graphics Mod.*, Vol 17, February. pp57-61

Sansone S MP. (2006). Análogos de insulina: ¿qué son, por qué, y cómo usarlos en la práctica médica? *RevMedUrug.* 22: 266-276.

Sciacca L, Le Moli R, Vigneri R. (2012). Insulin analogs and cáncer. *Front. Endocrinol.* Vol 3; 21:1-9.

Seino S, Seino M, Nishi S, and Bellg. (1989). Structure of the human insulin receptor gene and characterization of its promoter (alternative splicing/tyrosine kinase/Alu sequence). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 86, pp. 114-118.

Shashank R. Joshi, Rakesh M. Parikh, A. K. Das. (2007). Insulin History, Biochemistry, Physiology and Pharmacology. *J Assoc Physicians India.* Jul; 55 Suppl: 19-25.

Sheldon, Jones and Wright. (2008). Insulin analogues: an example of applied medical science. *Diabetes, Obesity and Metabolism* Volume 11, Issue 1, pages 5–19.

Slieker, L. J., and Sundell, K. (1991). Modifications in the 28–29 position of the insulin B-chain alter binding to the IGF-I receptor with minimal effect on insulin receptor binding. *Diabetes* 40 (Suppl. 1), 168A.

Smith G R. & Sternberg M.J.E. (2002). Prediction of protein–protein interactions by docking methods. *Curr Opin Struct Biol.* Feb; 12 (1): 28-35.

Smith BJ, Huang K, Kong G, Chan SJ, Nakagawa S, Menting JG, Hu SQ, Whittaker J, Steiner DF, Katsoyannis PG, Ward CW, Weiss MA, Lawrence MC. (2010). Structural resolution of a tandem hormone-binding element in the insulin receptor and its implications for design of peptide agonists. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Apr 13; 107 (15): 6771-6.

Sommerfeld MR, Müller G, Tschank G, Seipke G, Habermann P. (2010). In Vitro Metabolic and Mitogenic Signaling of Insulin Glargine and Its Metabolites. *PLoS ONE* 5(3): e9540: 1-9.

Suckale J and Solimena M. (2008). Pancreas islets in metabolic signaling – focus on the β -cell. *Front Biosci.* May 1; 13: 7156-71

Suissa S, Azoulay L, Dell'Aniello S, Evans M, Vora J & Pollak M (2011) Long-term effects of insulin glargine on the risk of breast cancer. *Diabetologia.* Sep; 54(9): 2254-2262.

Taniguchi CM, Emanuelli B, and Kahn C. R. (2006). Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7, 85-96 (February).

Torchala, I. H. Moal, R. A. G. Chaleil, J. Fernandez-Recio, P. A. Bates. (2013a). 'SwarmDock: a server for flexible proteinprotein docking', *Bioinformatics* 29, 807-809.

Torchala, I. H. Moal, R. A. G. Chaleil, R. Agius, P. A. Bates. (2013b). 'A Markov-chain model description of binding funnels to enhance the ranking of docked solutions'. *Proteins.* Dec; 81(12):2143-9.

Torchala, P. A. Bates. (2014). 'Predicting the Structure of Protein-Protein Complexes. Using the SwarmDock Web Server', *Methods Mol Biol.* 1137: 181-97.

Vajda S and Camacho C J. (2004). Protein–protein docking: is the glass half-full or half-empty?. *Trends Biotechnol.* Mar; 22(3):110-6.

Vajo, Z., Fawcett, J., and Duckworth, W. C. (2001). Recombinant DNA technology in the treatment of diabetes: insulin analogs. *Endocr. Rev.* 22, 706–717.

Varewijck A.J., Goudzwaard J.A., Brugts M.P, Lamberts S.W.J., Hofland L.J., Janssen J.A.M.J.L. (2010). Insulin glargine is more potent in activating the human IGF-I receptor than human insulin and insulin detemir. *Growth Hormone & IGF Research* 20; 427–431.

Varewijck A.J. & Janssen J.A.M.J.L. (2012). Insulin and its analogues and their affinities for the IGF1 receptor. *Endocrine-Related Cancer* 19 F63–F75

Vardanyan R & Hruby V. (2006). *Synthesis of Essential Drugs*. Elsevier, 2006. University of Arizona, Tucson, AZ, USA. ISBN 008046212X, 9780080462127

Vries S.J, van Dijk A.D.J., Krzeminski M., van Dijk M., Thureau A., Hsu V., Wassenaar T. and Bonvin A.M.J.J. (2007). HADDOCK versus HADDOCK: New features and performance of HADDOCK2.0 on the CAPRI targets. *Proteins: Struc. Funct. & Bioinformatic* 69, 726-733.

Wang F, Carabino JM, Vergara CM. (2003). Insulin Glargine: A Systematic Review of a Long-Acting Insulin Analogue. *Chin Tnev*: 25:1541-1577

Ward CW, Garrett TPJ, Lou M, et al. (2003). The Structure of the Type 1 Insulin-Like Growth Factor Receptor. *Madame Curie Bioscience Database [Internet]*. Austin (TX): Landes Bioscience; 2000-2013.

Whittaker J, V. Groth A, Mynarcik D, Pluzek L, Gadsbøll V, and Whittaker L. (2001). Alanine Scanning Mutagenesis of a Type 1 Insulin-like Growth Factor Receptor Ligand Binding Site. *J Biol Chem*. Nov 23; 276(47):43980-6.

Williams PF, Mynarcik DC, Yu GQ, Whittaker J. (1995). Mapping of an NH₂-terminal ligand binding site of the insulin receptor by alanine scanning mutagenesis. *J Biol Chem*. Feb 17; 270(7):3012-6.

Zacharias, M. (2010). *Scoring and Refinement of Predicted Protein-Protein Complexes; Protein-Protein Complexes. Analysis, Modeling and Drug Design*; World Scientific, Technische Universität München, Germany. ISBN 184816338X, 9781848163386. pp 390.

Zheng W1, Schafer NP, Davtyan A, Papoian GA, Wolynes PG. (2012). Predictive energy landscapes for protein-protein association. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Nov 20; 109(47): 19244-9.

Zhuo Fu, Elizabeth R. Gilbert, and Dongmin Liu. (2013). Regulation of Insulin Synthesis and Secretion and Pancreatic Beta-Cell Dysfunction in Diabetes. *Curr Diabetes Rev.* Jan 1; 9(1):25-53.