

Artículo de investigación

La mutación T878A del receptor de andrógenos podría ser activada por esteroides endógenos debido a pérdida de selectividad

T878A androgen receptor mutation could be activated by endogenous steroids due to loss of selectivity

¹David De la Mora González , ¹Fausto Rojas Durán , ¹Gonzalo Emiliano Aranda Abreu ,
²Fernando Rafael Ramos-Morales , ^{3*}Abraham Vidal-Limón , ^{1*}Jorge Suárez-Medellín 

¹Instituto de Investigaciones Cerebrales, Universidad Veracruzana, Xalapa-Enríquez, Ver. ²Instituto de Química Aplicada, Universidad Veracruzana, Xalapa-Enríquez, Ver. ³Instituto de Ecología, A.C., Xalapa-Enríquez, Ver.

Este artículo está disponible en: <https://eneurobiologia.uv.mx/index.php/eneurobiologia/article/view/2622>

*Correspondencia: Jorge Suárez Medellín. Instituto de Investigaciones Cerebrales, Universidad Veracruzana. Dr. Luis Castelazo Ayala s/n, Col. Industrial Ánimas, C.P. 91190. Xalapa-Enríquez, Ver. Correo electrónico: josuarez@uv.mx
Abraham Vidal-Limón. Instituto de Ecología, A.C., Carretera Antigua a Coatepec #351, Col. El Haya, C.P. 91073. Xalapa-Enríquez, Ver. Correo electrónico: abraham.vidal@inecol.mx

Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de la [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) (CC BY). Se permite el uso, distribución o reproducción en otros medios, siempre que se acredite al autor y se cite la publicación original en esta revista, de acuerdo con la práctica académica aceptada.

Descargo de responsabilidad: Las opiniones expresadas por los autores no necesariamente reflejan la postura del editor de la publicación.

Resumen

Los andrógenos son hormonas esteroideas involucradas en el crecimiento y desarrollo de la próstata actuando a través del receptor de andrógenos, un receptor nuclear que funciona como factor de transcripción dependiente de ligando del cual se conoce la estructura cristalográfica del dominio de unión a ligando. En etapas avanzadas del cáncer de próstata existen mutaciones que pueden contribuir al surgimiento de la etapa resistente a la castración, como la mutante T878A; además, hay evidencia de que a pesar del bloqueo androgénico existe activación del receptor que puede estar mediada por esteroidogénesis intratumoral y que las mutaciones en el receptor pueden hacer que se active por otros andrógenos debido a pérdida de la selectividad que conlleva a una promiscuidad de ligandos. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue recopilar las estructuras químicas de andrógenos u otras hormonas esteroideas presentes en el microambiente tumoral y evaluar si la presencia de la mutante T878A afecta su afinidad por el receptor, lo cual se llevó a cabo mediante un análisis *in silico* de acoplamiento molecular por conglomerado para calcular cambios en la energía libre de acoplamiento de la formación del complejo ligando-receptor. Se encontró que la presencia de la mutación aumenta de manera significativa la afinidad de los ligandos dehidroepiandrosterona, androsterona, progesterona, cortisol y 17-hidroxipregnenolona, por lo que es posible que debido a la mutación el receptor esté siendo activado por esteroides endógenos, lo que no ocurría en condiciones fisiológicas.

Palabras clave: Acoplamiento molecular, receptor de andrógenos, cáncer de próstata, afinidad, promiscuidad.

Abstract

Androgens are steroid hormones involved in prostate growth and development via activation of the androgen receptor, a nuclear receptor and ligand-dependent transcription factor for which the crystallographic structure of the ligand-binding domain is known. Some mutations in advanced prostate cancer are known to drive the disease into a castration-resistant stage, such as the T878A mutation; furthermore, there is evidence that intratumoral steroidogenesis-mediated androgen receptor activation exists despite androgen blockade and receptor mutations may contribute to its activation by other androgens due to a loss of selectivity leading to ligand promiscuity. Therefore, the aim of this work was to collect the chemical structures of androgens or other steroid hormones known to be present in the tumoral microenvironment and to evaluate whether mutant T878A affects the affinity for their receptor. In order to do that, ensemble molecular docking was performed to calculate changes on the free binding energy of ligand-receptor complex formation. We found that the mutant significantly increased the affinity of some ligands such as dehydroepiandrosterone, androsterone, progesterone, cortisol and 17-hydroxypregnenolone. Thus, it is possible that this mutant receptor is being activated by endogenous steroids rather than those that activate it under physiological conditions.

Keywords: Molecular docking, androgen receptor, prostate cancer, affinity, promiscuity.

I. Introducción

Los esteroides son moléculas orgánicas de naturaleza lipídica con una estructura química derivada del ciclopentanoperhidrofenantreno que pueden funcionar como hormonas. Existen los esteroides producidos por las glándulas adrenales, los glucocorticoides y los mineralocorticoides, que son responsables de la regulación del metabolismo de los carbohidratos, del manejo del estrés y del balance de sales en el cuerpo; y los esteroides gonadales, encargados del desarrollo y mantenimiento de la función reproductiva.¹ Los andrógenos son hormonas esteroideas involucrados principalmente en la diferenciación sexual masculina y en el origen y mantenimiento de sus características sexuales primarias y secundarias, además de estar involucrados en el desarrollo, crecimiento y mantenimiento de la próstata.²

La señalización de las hormonas sexuales, incluyendo a los andrógenos, está regulada por el eje hipotalámico-pituitario-gonadal (HPG). En el hipotálamo, la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) es liberada por neuronas hacia la circulación portal-hipofisiaria donde alcanza la hipófisis anterior y libera otras dos hormonas: la luteinizante (LH) y la folículo estimulante (FSH). En machos, la LH actúa en los testículos y estimula a las células de Leydig para producir testosterona, la cual actúa de manera retroactiva para regular el eje HPG, inhibiendo la secreción de GnRH para regular sus niveles.^{3,4} En la circulación, la testosterona se encuentra predominantemente unida a globulinas de unión a hormonas sexuales y a albúmina, y únicamente la forma libre es la que es capaz de entrar a las células de la próstata, donde es convertida en dihidrotestosterona (DHT) por acción de la 5 α -reductasa para producir sus efectos biológicos a través de su unión con el receptor de andrógenos (AR).^{4,5}

Una vez dentro de la célula los andrógenos actúan a través del AR, un factor de transcripción dependiente de ligando, cuyo gen se localiza en el cromosoma X en la posición Xq11e1. Consiste en 8 exones que codifican una proteína de 920 aminoácidos con un peso de 110 kDa conformado por tres dominios funcionales: el N-terminal (NTD), que alberga un primer motivo de activación funcional (AF1); el de unión a DNA (DBD), que es responsable de las interacciones del AR con secuencias específicas de DNA; y el de unión a ligando (LBD), que contiene el segundo motivo funcional de activación, es responsable de las actividades del AR y contiene el bolsillo de unión a ligando (LBP) donde se dan las interacciones con todos sus ligandos.^{4,6} El receptor es capaz de acomodar ligandos diferentes al modificar el volumen de su LBP cambiando la orientación de las cadenas laterales de sus aminoácidos.⁶

El AR se encuentra en el citoplasma unido a proteínas chaperonas y de choque térmico en una conformación competente para la unión a ligando, tras lo cual se produce un cambio en la conformación del AR, se da la disociación de las chaperonas del complejo y la formación de un homodímero, el cual, en la vía genómica clásica, se trasloca hacia el núcleo donde se une a regiones promotoras de genes conocidas como elementos de respuesta a andrógenos (ARE) para promover la transcripción de genes blanco a través del reclutamiento de correguladores que modulan la acción del AR. Los andrógenos y su receptor están involucrados de manera fisiológica en el desarrollo y mantenimiento de la glándula prostática, por lo tanto, también lo están en el desarrollo y progresión de ciertas patologías como el cáncer de próstata (CaP), por lo que existe el interés de investigar aspectos relacionados con estos procesos y con el desarrollo de tratamientos que permitan su regulación.^{4,6}

En México, el CaP es el tipo de cáncer más común y la primera causa de mortalidad por cáncer en hombres, de acuerdo con información del Instituto Nacional de Salud Pública. En los tratamientos utilizados para enfrentar esta enfermedad el principal objetivo es la reducción de los niveles de andrógenos de manera quirúrgica o farmacológica; sin embargo, aunque hay un descenso del 90-95% de los niveles de testosterona séricos tras la orquiectomía, la DHT intraprostática se reduce únicamente en un 50%, lo que indica la presencia de una vía de síntesis de DHT que no requiere testosterona testicular.² Además, los niveles de dehidroepiandrosterona (DHEA) – el andrógeno adrenal más abundante en el tejido del CaP,⁷– se mantienen constantes tras el bloqueo androgénico, demostrándose la expresión de enzimas capaces de sintetizar andrógenos dentro de la próstata⁸ y sugiriendo que los andrógenos remanentes aún se pueden encontrar disponibles para la síntesis de testosterona y DHT con la consiguiente activación del AR.⁷ Esto podría explicar el hecho de que, incluso tras la regresión inicial que ocurre tras el retiro o bloqueo de andrógenos, surja posteriormente una etapa de la enfermedad conocida como cáncer de próstata resistente a la castración (CaPRC).⁶⁻⁹

Diversos mecanismos se han implicado en la progresión de la enfermedad hacia la reactivación del AR e incluyen: sobreexpresión del AR, mutaciones del AR, aumento en la transducción de las señales del AR, alteraciones en el reclutamiento de cofactores, activación del receptor independiente de la unión de ligando, activación por precursores androgénicos de origen adrenal y esteroideogénesis intratumoral.^{5,9} Respecto a las mutaciones, se ha identificado a la mutación T878A en la línea celular LNCaP,¹⁰ la cual ha sido encontrada también de manera frecuente en pacientes humanos (en un estudio se

observó en 5 de 16 pacientes),⁶ permitiendo la activación del AR por otras hormonas esteroideas así como ciertos antagonistas como la hidroxiflutamida.^{3,11}

Otro mecanismo para el desarrollo de CaPRC es la promiscuidad de ligandos como resultado de mutaciones en el AR que causan sustituciones de aminoácidos en el LBD, disminuyendo su especificidad y selectividad hacia los ligandos, con lo que incluso otras hormonas esteroideas como glucocorticoides o mineralocorticoides – aunque no exista información de que estén directamente involucrados en la proliferación y señalización de CaP– podrían estar funcionando como agonistas del AR.¹²

Con base en lo anterior y considerando que la mutación T878A suele surgir en la etapa CaPRC, existe el interés de conocer si el hecho de que esté presente esta mutación resulta en cambios en la afinidad de otros andrógenos o esteroides hacia el AR, considerando que en el microambiente tumoral se encuentran presentes estos compuestos. Es posible determinar la afinidad mediante métodos *in silico* que permitan calcular este parámetro para diferentes moléculas y así realizar comparaciones y evaluar cómo se da la formación del complejo ligando-receptor. Uno de estos métodos es el análisis por acoplamiento molecular.¹³

Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue evaluar, por medio de análisis de acoplamiento molecular por conglomerado, los cambios en la afinidad que pueden ocurrir en la mutación T878A respecto al AR de fenotipo silvestre (WT) de diferentes ligandos de naturaleza esteroidea, principalmente andrógenos que se sabe que se encuentran en el microambiente tumoral y que podrían estar activando al receptor, incluso en condiciones de bloqueo androgénico y en la etapa de CaPRC, aun cuando estos ligandos no activan al receptor en condiciones fisiológicas.

2. Materiales y métodos

2.1 Selección y preparación de ligandos

Se seleccionaron doce ligandos potenciales a partir de una revisión bibliográfica de compuestos de naturaleza esteroidea encontrados en el torrente sanguíneo y otros de interés.¹⁴ Los metabolitos elegidos para este estudio (Fig. 1) fueron: testosterona (1), dihidrotestosterona (2),

dehidroepiandrosterona (3), androsterona (4), progesterona (5), estradiol (6), cortisol (7), aldosterona (8), pregnenolona (9), 17-hidroxipregnenolona (10), colesterol (11) y calcitriol (12).

Todos los ligandos fueron descargados de la base de datos PubChem y su geometría fue optimizada mediante el complemento Open Babel de la paquetería Avogadro2 (versión 1.97.0).¹⁵

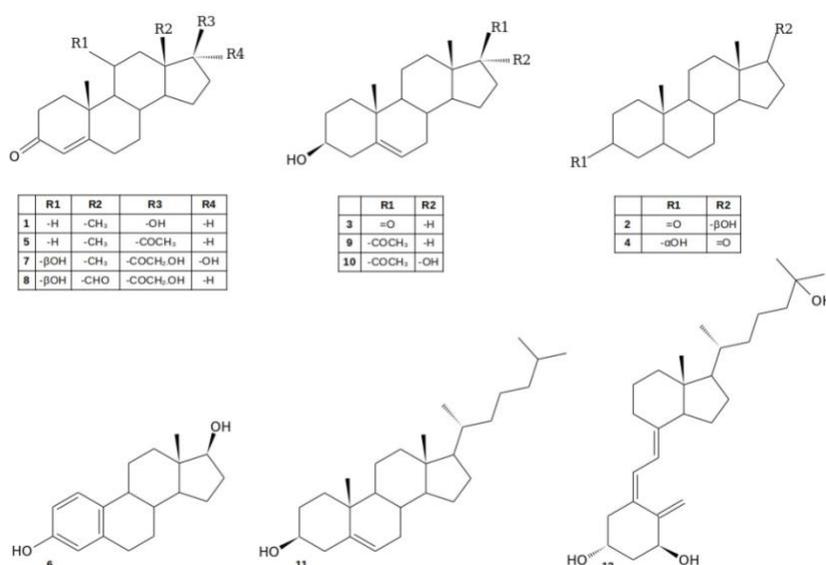


Figura 1. Metabolitos de naturaleza esteroidea utilizados como ligandos potenciales del receptor de andrógenos de fenotipo silvestre y de la mutante T878A: testosterona (1), dihidrotestosterona (2), dehidroepiandrosterona (3), androsterona (4), progesterona (5), estradiol (6), cortisol (7), aldosterona (8), pregnenolona (9) 17-hidroxipregnenolona (10), colesterol (11) y calcitriol (12).

2.2 Obtención de las estructuras tridimensionales del AR

Se utilizó la estructura cristalográfica del Protein Data Bank (PDB) de código 5JJM, que corresponde al LBD del AR acoplado a DHT, y se seleccionó la cadena A. Este sistema corresponde a la proteína de fenotipo silvestre o *Wild Type* (WT) y se utilizó la

herramienta de mutagénesis de PyMol¹⁶ para crear la mutante T878A.

Los campos de fuerza ff19Sb y GAFF de *tleap* del software AmberTools¹⁷ se utilizaron para las proteínas y el ligando, respectivamente. Los sistemas fueron solvatados en una caja de 15.0 Å de agua TIP3P. Primero, se añadieron iones Cl⁻ para neutralizar las cargas; posteriormente, se

añadieron iones Na^+ y Cl^- de manera aleatoria para alcanzar una concentración salina de 150 mM.

Las simulaciones de dinámica molecular se llevaron a cabo con AMBER18.¹⁷ Los sistemas fueron minimizados en dos pasos: primero, se minimizó el solvente utilizando el método de *steepest descent* (2500 pasos), seguido del de *conjugate gradient* hasta alcanzar un gradiente de 0.05 kcal/mol con una restricción en la proteína de 500 kcal/mol; segundo, se repitió el mismo proceso sin restricciones en el sistema. El recocido simulado consistió en varios pasos hasta alcanzar una temperatura de 310 K con restricción en la proteína de 10 kcal/mol en un ensamble NVT. El equilibrado consistió en dos pasos: primero, se aplicó una restricción a la proteína de 10 kcal/mol por 0.5 ns a 310 K y a 1.0 atm en un ensamble NPT; posteriormente, no se aplicaron restricciones por 5 ns bajo las mismas condiciones. La simulación convencional de dinámica molecular se llevó a cabo durante 200 ns bajo las mismas condiciones calculadas cada 2 fs. Los fotogramas se almacenaron cada 15000 pasos. Las simulaciones de dinámica molecular acelerada fueron a lo largo de 500 ns con un *boost* diédrico y de la energía potencial calculado a partir de las dinámicas convencionales y se llevaron a cabo en un ensamble NVT. Tres simulaciones independientes, partiendo desde la estructura cristalográfica, fueron producidas para cada uno de los sistemas.

Cada simulación generó 16,666 fotogramas, los cuales fueron concatenados para dar un total de 49998 por sistema. Se realizó entonces un análisis de componentes principales utilizando el software Bio3d¹⁸ de R a partir de los carbonos alfa de las proteínas, en los que –utilizando la proyección de los componentes principales 1 y 2– se seleccionaron tres conformeros de los fotogramas centrales de las

agrupaciones obtenidas, que corresponden a las estructuras más representativas de las trayectorias de la dinámica molecular.

2.3. Acoplamiento molecular

El análisis de acoplamiento molecular se llevó a cabo utilizando el programa AutoDock VINA.¹⁹ Los archivos de parámetros fueron generados para cada conformero en la paquetería Autodock Tools 1.5.6, utilizando DHT como ligando de prueba. Se identificó el sitio de unión a ligando a partir de los residuos N706 y (T/A)878 para los conformeros del receptor de fenotipo silvestre o mutante, tomando en cuenta dimensiones del Grid Box de 15.75 Å por lado. Las interacciones ligando/receptor fueron analizadas mediante la herramienta en línea PoseView.²⁰

2.4. Análisis estadístico

Mediante una prueba de Shapiro-Wilk se determinó que los datos obtenidos no cumplen con el supuesto de normalidad, por lo que se utilizó una prueba de Kruskal-Wallis para detectar la existencia de diferencias estadísticamente significativas atribuibles al ligando, así como un test de Wilcoxon-Mann-Whitney para las diferencias relacionadas con el tipo de proteína sobre la energía libre de acoplamiento calculada. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando la interfaz de usuario Rcmdr (versión 2.8-0) en el lenguaje de programación R (versión 4.1.2), considerando valores de $p < 0.01$ como estadísticamente significativos.²¹

3. Resultados

A partir de la simulación de dinámica molecular, se identificaron y seleccionaron tres conformeros representativos para el AR de fenotipo silvestre (WT) y tres para la mutante (T878A). En la Tabla 1 se resumen las diferencias en términos de Raíz de la Desviación Cuadrática Media (RMSD) de los

carbonos alfa entre cada uno de los confórmers obtenidos cuando se sobrepone entre sí para mostrar el grado de similitud entre ambas estructuras, lo cual demuestra que las estructuras seleccionadas son diferentes entre sí, resultando más parecidos los confórmers 1 de los sistemas WT y T878A, y el de mayor diferencia estructural respecto a los demás el confórmer 3 del sistema T878A.

El uso de tres confórmers distintos por cada mutante del AR estudiada permite explorar la flexibilidad conformacional del sistema, brindando resultados más robustos durante el análisis de acoplamiento molecular.^{13,22} La energía libre de acoplamiento calculada para cada sistema ligando-receptor se resume en la Tabla 2.

	RMSD (Å)					
	WT_1	WT_2	WT_3	T878A_1	T878A_2	T878A_3
WT_1	0	2.56	2.75	1.67	2.48	3.46
WT_2	2.56	0	2.86	2.60	2.84	3.61
WT_3	2.75	2.86	0	2.80	2.88	3.53
T878A_1	1.67	2.60	2.80	0	2.50	3.54
T878A_2	2.48	2.84	2.88	2.50	0	3.40
T878A_3	3.46	3.61	3.53	3.54	3.40	0

Tabla 1. Comparación del RMSD (en Å) de cada uno de los tres confórmers del fenotipo silvestre (WT) y la mutante (T878A).

Ligando	Energía libre de acoplamiento (kcal/mol)	
	WT	T878A
Testosterona (1)	-5.376 ± 1.809	-6.258 ± 3.605
Dihidrotestosterona (2)	-6.100 ± 1.957	-7.142 ± 3.828
Dehidroepiandrosterona (3)	-5.843 ± 1.824	-8.671 ± 1.846
Androsterona (4)	-5.360 ± 1.628	-8.558 ± 1.745
Progesterona (5)	-2.670 ± 4.137	-6.588 ± 5.476
Estradiol (6)	-5.681 ± 1.427	-6.133 ± 4.044
Cortisol (7)	-3.211 ± 2.864	-6.157 ± 4.371
Aldosterona (8)	-4.125 ± 3.038	-3.200 ± 6.081
Pregnenolona (9)	-3.823 ± 3.586	-1.269 ± 9.429
17-OH-pregnenolona (10)	-1.529 ± 4.351	-6.490 ± 4.691
Colesterol (11)	-3.920 ± 3.477	-1.381 ± 4.993
Calcitriol (12)	-2.772 ± 3.682	0.050 ± 7.631

Tabla 2. Energía libre de acoplamiento calculada para cada uno de los sistemas ligando-receptor. Los resultados están expresados como la media ± la desviación estándar (kcal/mol) de los datos obtenidos de los tres confórmers.

Los valores de energía libre de acoplamiento calculados para el AR de fenotipo silvestre (WT) y la mutante (T878A) fueron comparados mediante una prueba Wilcoxon-Mann-Whitney, y se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos ($p < 0.01$). Los valores calculados para la mutante T878A son menores que los del fenotipo silvestre (Fig. 2), sugiriendo una

mayor afinidad en promedio con el conjunto de ligandos de naturaleza esteroidea estudiados, lo cual es consistente con los reportes previos de una mayor actividad androgénica asociada con la mutación T878A.

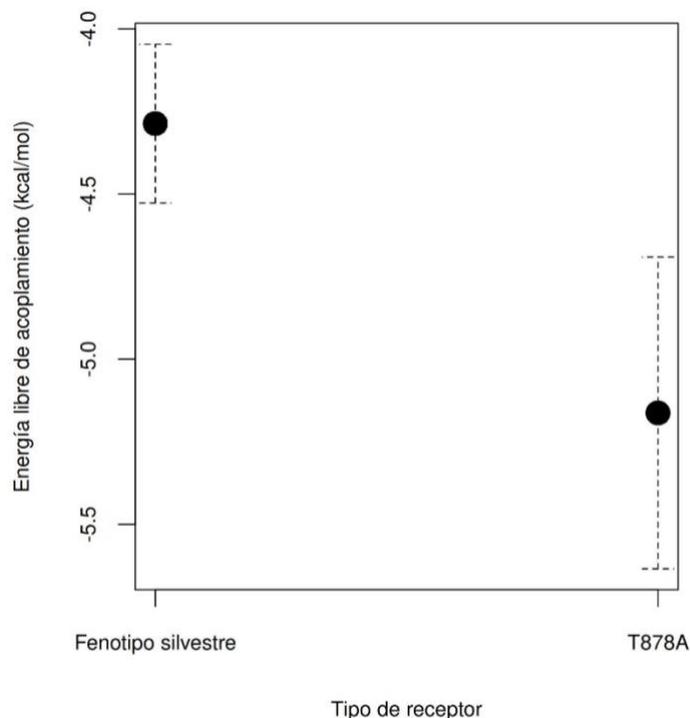


Figura 2. Energía libre de acoplamiento (kcal/mol) promedio calculada para todos los ligandos del fenotipo silvestre y la mutante T878A. Las barras de error indican el error estándar.

Por su parte, el test de Kruskal-Wallis permitió determinar que el efecto del ligando sobre la energía libre de acoplamiento es también estadísticamente significativo ($p < 0.01$). Mientras que los ligandos naturales del AR como la testosterona (1) y la DHT (2) no presentaron diferencias de afinidad importantes entre la

mutante T878A y el fenotipo silvestre, otros metabolitos entre los que se encuentran la dehidroepiandrosterona (3), androsterona (4), progesterona (5), cortisol (7) y 17-hidroxipregnenolona (10) mostraron una mayor afinidad por la T878A (Figura. 3).

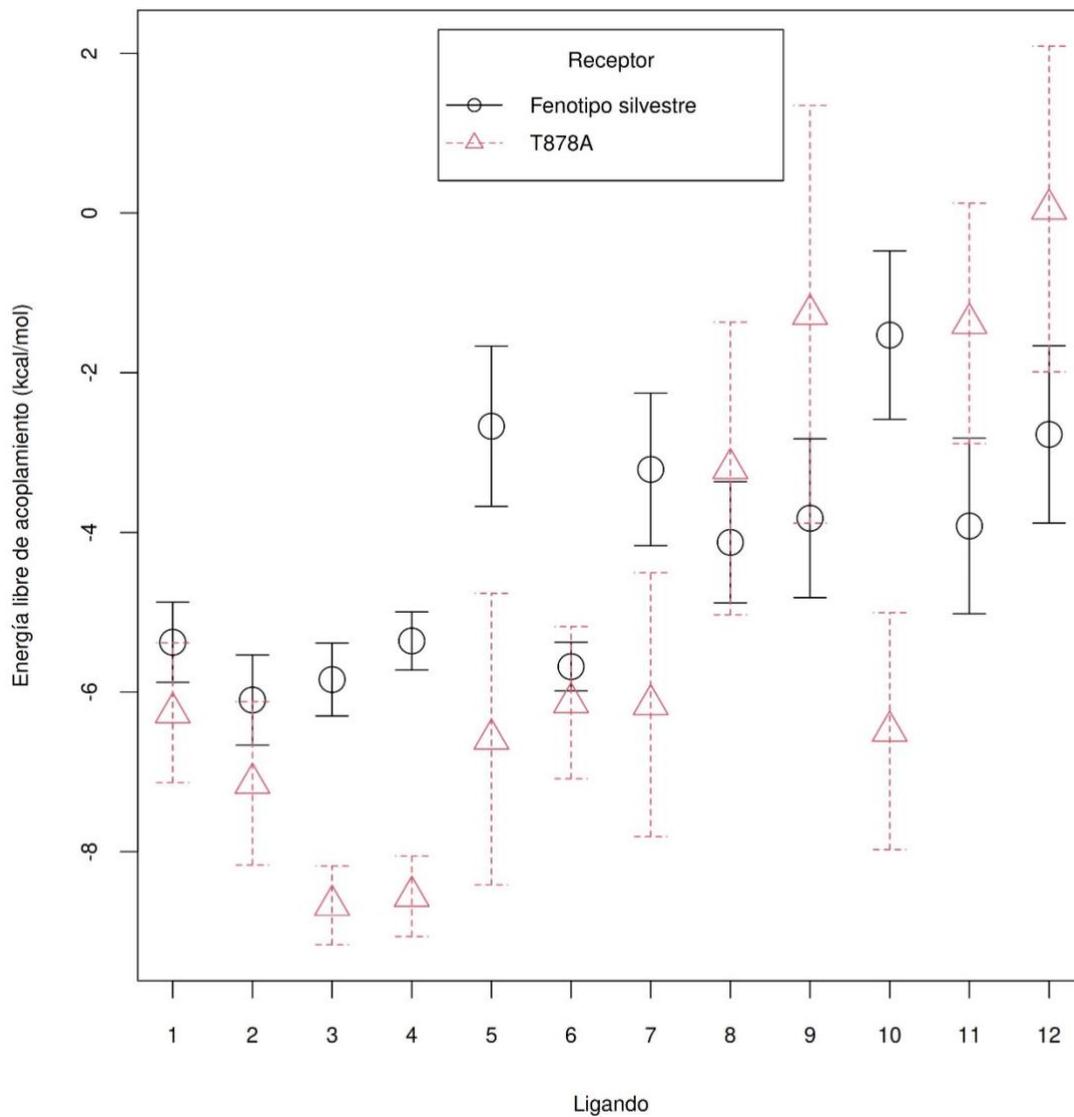


Figura 3. Energía libre de acoplamiento (en kcal/mol) promedio calculado para cada ligando respecto a cada proteína: testosterona (1), dihidrotestosterona (2), dehidroepiandrosterona (3), androsterona (4), progesterona (5), estradiol (6), cortisol (7), aldosterona (8), pregnenolona (9) 17-hidroxipregnenolona (10), colesterol (11) y calcitriol (12). Las barras de error indican el error estándar.

4. Discusión

A pesar de que la testosterona (1) es el principal andrógeno en circulación, el ligando con mayor afinidad hacia el AR de fenotipo silvestre es la DHT (2).^{4,5} En ese sentido, es interesante notar que es precisamente la DHT el ligando con menor energía libre de acoplamiento calculada

para dicho receptor (-6.100 ± 1.957 kcal/mol). Se sabe que el modo de unión característico entre la DHT y el AR de fenotipo silvestre implica la formación de un enlace de hidrógeno entre el grupo hidroxilo presente en C17 de la DHT y la T878,^{13,23,24} el cual fue posible detectar en nuestro estudio (Figura. 4).

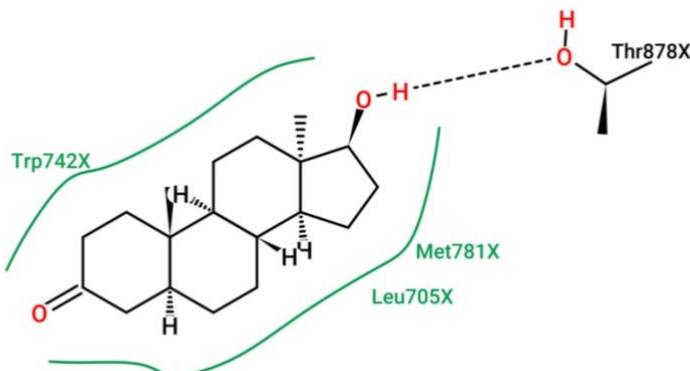


Figura 4. Mapa de interacciones entre DHT (2) y el AR de fenotipo silvestre. Las líneas verdes indican interacciones hidrofóbicas y la línea punteada representa un enlace de hidrógeno entre el hidroxilo de la posición C17 y la T878, característica común en diversos ligandos con actividad agonista sobre el AR.

Ni la testosterona (1) ni la DHT (2) presentan diferencias estadísticamente significativas con respecto a su afinidad con el AR de fenotipo silvestre y la mutante T878A; sin embargo, otros metabolitos potencialmente presentes en el microambiente tumoral como dehidroepiandrosterona (3), androsterona (4), progesterona (5), cortisol (7) y 17-hidroxipregnenolona (10) muestran una menor energía libre de acoplamiento calculada para la mutante T787A respecto a la proteína de fenotipo silvestre, lo cual indica una mayor afinidad hacia la mutación.

Dichos metabolitos provienen de la esteroidogénesis, la cual inicia cuando el colesterol (11) es transferido desde la membrana externa de la mitocondria hacia la membrana interna por medio de la enzima StAR (steroidogenic acute regulatory

protein), donde es convertido a pregnenolona (9) por la enzima CYP11A1 (también se le conoce como P450sc) y posteriormente a 17-hidroxipregnenolona (10) por la enzima CYP17A1; esta misma enzima la convierte en dehidroepiandrosterona o DHEA (3) que es liberada y es el precursor androgénico adrenal más abundante en circulación.³ DHEA puede ser convertido a su vez en androstenediona y en androstenediol, compuestos androgénicos que, sin embargo, poseen poca afinidad hacia su receptor (Fig. 3) y por lo tanto poseen una débil actividad androgénica, aunque pueden ser metabolizados a andrógenos más potentes en tejidos periféricos que posean la maquinaria enzimática requerida y así generar respuestas fisiológicas.^{2,4,5,9,25} Estos compuestos pueden ser convertidos a

testosterona (1), la cual es el principal andrógeno en circulación y es producida en mayor parte por las células de Leydig en los testículos y, en menor proporción, por las glándulas adrenales.⁴ La testosterona libre en circulación puede entrar a las células en tejidos blanco, como la próstata, donde es convertida a dihidrotestosterona (2) por medio de la 5 α -reductasa.^{4,5} También se puede producir DHT sin requerir testosterona como precursor, sino que la androsterona (4), producida por un número de reacciones a partir de la progesterona (5), sirve como el sustrato androgénico intermediario.⁹

Se cree también que surge una esteroidogénesis *in situ* como respuesta adaptativa al tratamiento del bloqueo de andrógenos, permitiendo la supervivencia de células de CaPRC en un ambiente con una baja concentración de andrógenos exógenos, manteniéndose las concentraciones de estos compuestos en el tejido por síntesis intratumoral, ya sea por captura y conversión de andrógenos

adrenales o vía esteroidogénesis *de novo*.²⁶ En un modelo celular de esteroidogénesis dependiente de precursores se observó que tras la administración de pregnenolona (9), progesterona (5) y sus derivados 17-hidroxilados se generaban metabolitos como DHEA (3).¹⁴

Así, la DHEA (3) y la androsterona (4) no son sólo dos de los precursores androgénicos más comunes en el organismo, sino también los ligandos que muestran una mayor reducción en la energía libre de acoplamiento calculada al unirse a la mutante T878A. En el caso de la DHEA (Figura. 5), el modo de unión con el AR de fenotipo silvestre es prácticamente igual que con T878A, presentando un enlace de hidrógeno característico entre el hidroxilo unido a C3 y N706. La diferencia principal entre ambas proteínas radica en un mayor número de interacciones hidrofóbicas entre el ligando y el LBP de T878A, que pueden ser resultado de la pérdida del grupo hidroxilo de la T878.

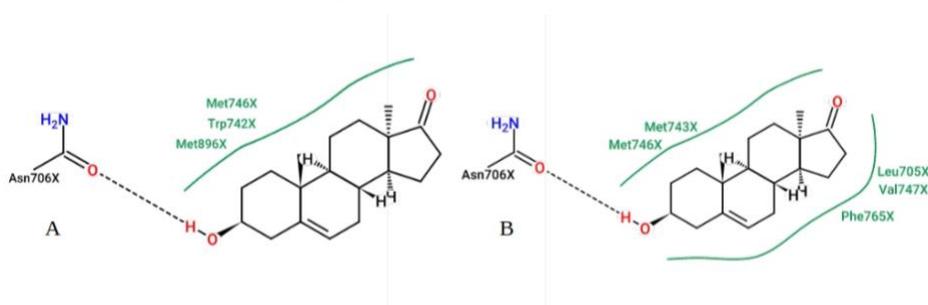


Figura 5. Mapa de interacciones de la DHEA (3) unida al AR de fenotipo silvestre (A) y a la mutante T878A (B). Nótese como en ambos casos el modo de unión es muy similar, presentando un enlace de hidrógeno entre el hidroxilo unido a C3 y N706.

Por su parte, en el caso de la androsterona (Fig. 6), el modo de unión entre el ligando y el receptor es radicalmente distinto en la mutante T878A y en el receptor de fenotipo silvestre, lo cual podría explicar las diferencias de afinidad entre ambos,

siendo este ligando más afín hacia la mutante posiblemente por una estabilización dada por el mayor número de interacciones hidrofóbicas, a pesar de la pérdida del enlace de hidrógeno causado por la sustitución T/A.

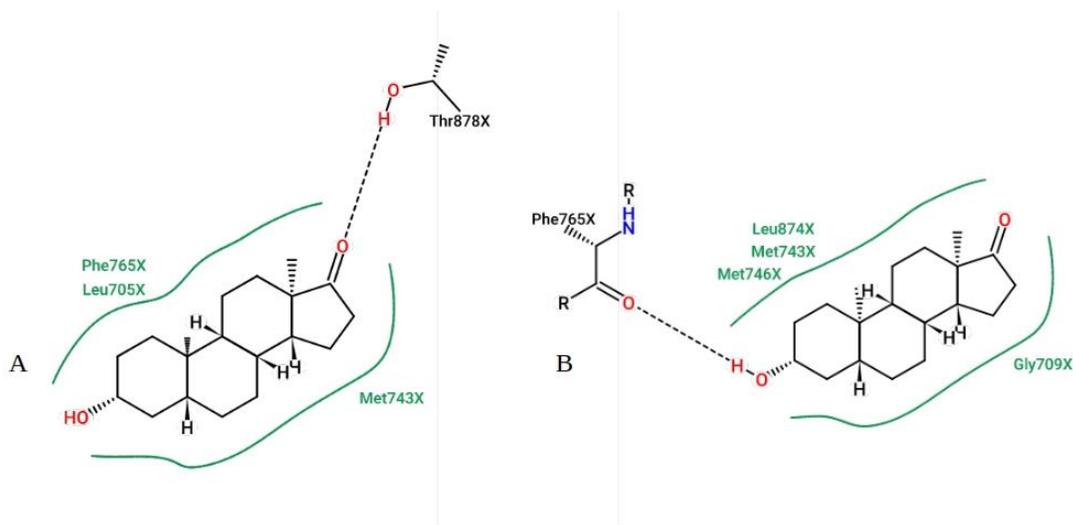


Figura 6. Mapa de interacciones de la androsterona (**4**) unida al AR de fenotipo silvestre (A) y a la mutante T878A (B). Para el receptor de fenotipo silvestre, el enlace de hidrógeno se da entre el carbonilo C17 y T878, mientras que para T878A ocurre entre el hidroxilo de C3 y F765. Por su parte, las interacciones hidrofóbicas involucran a F765, L705 y M743 en el caso del fenotipo silvestre, y a L874, M743, M746 y G709 en T878A.

Mención aparte merece el cortisol (**7**) que, al ser un ligando específico del receptor de glucocorticoides, no se espera que se una al AR de fenotipo silvestre. No obstante, existen reportes experimentales que indican que sí es capaz de unirse al receptor mutante T878A en células LNCaP,²⁷ considerándose como uno de los mecanismos involucrados en la progresión al CaPRC.²⁸ El mapa de interacciones entre el cortisol y los dos sistemas del receptor de andrógenos se presenta en la Figura 7 y

muestra que, aunque los mismos residuos están involucrados en la formación de enlaces de hidrógeno, lo hacen con otras regiones del ligando. Las interacciones hidrofóbicas también difieren entre ambas proteínas, pero la energía libre de acoplamiento es menor hacia la mutante, posiblemente debido al tamaño mayor del LBP a causa de la presencia de la A878 que, por su menor tamaño, permite que la cadena lateral del cortisol se acomode de mejor manera.

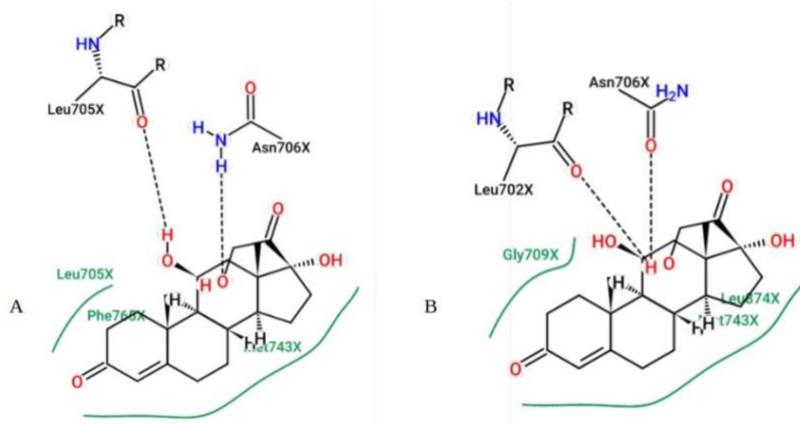


Figura 7. Mapa de interacciones del cortisol (**7**) unido al AR de fenotipo silvestre (A) y a la mutante T878A (B). Nótese que, en el receptor de fenotipo silvestre, el oxígeno del grupo hidroxilo unido a C21 forma un enlace de hidrógeno con el grupo amino de N706, mientras que el hidroxilo en C11 forma un enlace de hidrógeno con el carbonilo de L705. Por su parte, en la mutante T878A, ambos enlaces de hidrógeno ocurren entre el hidroxilo de C21 y los carbonilos de N706 y L702, respectivamente.

Finalmente, para el caso de la 17-hidroxipregnenolona (**10**), su modo de unión con ambas mutantes del AR implica la formación de dos enlaces de hidrógeno (Fig. **8**). Para el receptor de fenotipo silvestre, los puentes de hidrógeno ocurren entre el grupo hidroxilo de C3 y T878 y

entre el hidroxilo de C17 y S704. Por su parte, para la mutante T878A, el enlace de hidrógeno en la posición C3 es con M746 y el de C17 con N706, mientras que A878 se encuentra formando parte de las interacciones hidrofóbicas con el ligando.

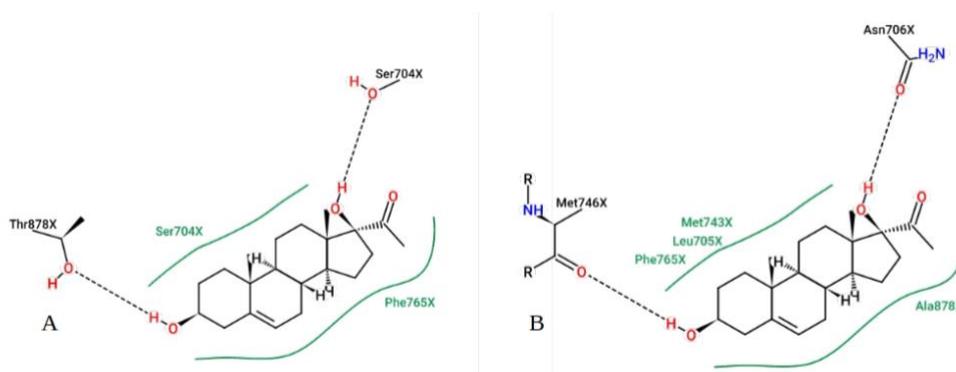


Figura 8. Mapa de interacciones de la 17-hidroxipregnenolona (**10**) unida al AR de fenotipo silvestre (A) y a la mutante T878A (B).

Cabe señalar que los resultados obtenidos en este estudio son consistentes con los reportes previos de que la mutación T878A causa una pérdida de selectividad que, si bien no afectaría directamente a los

ligandos principales del receptor como la testosterona (**1**) y la DHT (**2**), sí podría aumentar su afinidad por otros ligandos que en condiciones fisiológicas serían menos importantes, como la DHEA (**3**) y el cortisol

(7), lo cual explicaría parcialmente la progresión al CaPRC. No obstante, es importante corroborar estos hallazgos experimentalmente con el uso de modelos tanto *in vitro*, como podría ser la línea celular LNCaP que posee esta mutación de interés o con el uso de una proteína recombinante que podrían permitir evaluar en qué medida los ligandos de interés generan un efecto androgénico en un contexto más cercano a la realidad biológica, así como con el uso de modelos *in vivo*, donde ratones transgénicos portadores de esta mutación podrían permitir observar el efecto que genera la mutación sobre la acción de estos ligandos en un sistema biológico más complejo. Aunque este estudio permitió observar cambios en la afinidad debido a la mutación con una metodología teórica y con miras de resultados predictivos, esto no es indicativo del efecto fisiológico que pudiera llegar a tener este cambio en un organismo donde hay una mayor cantidad de variables involucradas, lo cual es una limitante intrínseca de la metodología empleada. De igual manera, es importante tener en cuenta que el modelo empleado considera un limitado, aunque representativo, número de conformaciones donde el ligando ya se encuentra dentro del LBP, por lo que sería de utilidad contrastar los modos de unión aquí representados con lo que ocurriría a lo largo de una simulación de dinámica molecular, donde se considerarían también otros factores como la estabilidad de los ligandos dentro del LBP.

5. Conclusiones

En este trabajo se observó, mediante un análisis de acoplamiento molecular por conglomerado de varios ligandos de tipo esteroideo, que la afinidad de la dehidroepiandrosterona (3), androsterona (4), progesterona (5), cortisol (7) y 17-hidroxipregnenolona (10) aumenta

significativamente hacia la proteína mutante T878A del receptor de andrógenos respecto al fenotipo silvestre, lo que indica una pérdida de la selectividad del receptor de los confórmers muestreados. Esta pérdida de selectividad es consecuencia de una mutación puntual en la que cambian las características fisicoquímicas del bolsillo de unión a ligando del receptor de andrógenos y podría contribuir –junto con la esteroidogénesis tumoral– a la activación por promiscuidad del receptor, debida a otros metabolitos de la síntesis de esteroides que en condiciones fisiológicas no activaban la señalización androgénica. Este hallazgo posiblemente permite entender que la presencia de la mutación podría estar favoreciendo una mayor actividad del receptor de andrógenos al unirse con mayor afinidad un rango más amplio de ligandos que se encuentran presentes en el ambiente tumoral.

6. Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

7. Agradecimientos

Este trabajo fue financiado mediante la beca de posgrado CONAHcyT asignada a DJDG correspondiente al CVU 666759. Los autores agradecen al Centro Nacional de Supércomputo del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica los recursos computacionales para realizar esta investigación, bajo el proyecto "Estudio de las interacciones de mutantes del receptor de andrógenos humano con diversos agonistas y antagonistas, mediante simulaciones de dinámica molecular".

8. Referencias

1. Selvaraj, V., Stocco, D. M., & Clark, B. J. (2018). Current knowledge on the acute regulation of steroidogenesis. In *Biology of Reproduction* (Vol. 99, Issue 1, pp. 13–

- 26). Oxford University Press.
<https://doi.org/10.1093/biolre/ioy102>
2. Luu-The, V., Bélanger, A., & Labrie, F. (2008). Androgen biosynthetic pathways in the human prostate. *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*, 22(2), 207–221.
<https://doi.org/10.1016/j.beem.2008.01.008>
 3. Desai, K., McManus, J. M., & Sharifi, N. (2021). Hormonal therapy for prostate cancer. *Endocrine Reviews*, 42(3), 354–373.
<https://doi.org/10.1210/endrev/bnab002>
 4. Naamneh Elzenaty, R., du Toit, T., & Flück, C. E. (2022). Basics of androgen synthesis and action. In *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism* (Vol. 36, Issue 4). Bailliere Tindall Ltd.
<https://doi.org/10.1016/j.beem.2022.101665>
 5. Barnard, M., Mostaghel, E. A., Auchus, R. J., & Storbeck, K. H. (2020). The role of adrenal derived androgens in castration resistant prostate cancer. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 197.
<https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2019.105506>
 6. Tan, M. E., Li, J., Xu, H. E., Melcher, K., & Yong, E. L. (2015). Androgen receptor: Structure, role in prostate cancer and drug discovery. *Acta Pharmacologica Sinica*, 36(1), 3–23.
<https://doi.org/10.1038/aps.2014.18>
 7. Armandari, I., Hamid, A. R., Verhaegh, G., & Schalken, J. (2014). Intratumoral steroidogenesis in castration-resistant prostate cancer: a target for therapy. *Prostate International*, 2(3), 105–113.
<https://doi.org/10.12954/pi.14063>
 8. Cooper, L., & Page, S. (2014). Androgens and prostate disease. *Asian Journal of Andrology*, 16(2), 248.
<https://doi.org/10.4103/1008-682X.122361>
 9. Armstrong, C. M., & Gao, A. C. (2021). Dysregulated androgen synthesis and anti-androgen resistance in advanced prostate cancer. *American Journal of Clinical and Experimental Urology*, 9(4), 292–300.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34541028>
 10. Veldscholte, J., Berrevoets, C. A., Ris-Stalpers, C., Kuiper, G. G. J. M., Jenster, G., Trapman, J., Brinkmann, A. O., & Mulder, E. (1992). The androgen receptor in LNCaP cells contains a mutation in the ligand binding domain which affects steroid binding characteristics and response to antiandrogens. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 41(3–8), 665–669.
[https://doi.org/10.1016/0960-0760\(92\)90401-4](https://doi.org/10.1016/0960-0760(92)90401-4)
 11. Liu, H. L., Zhong, H. Y., Song, T. Q., & Li, J. Z. (2017). A molecular modeling study of the hydroxyflutamide resistance mechanism induced by androgen receptor mutations. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(9).
<https://doi.org/10.3390/ijms18091823>
 12. Snaterse, G., Visser, J. A., Arlt, W., & Hofland, J. (2017). Circulating steroid hormone variations throughout different stages of prostate cancer. *Endocrine-Related Cancer*, 24(11), R403–R420.
<https://doi.org/10.1530/ERC-17-0155>
 13. Vidal-Limon, A. M., Luna-Martinez, O. D., Rojas-Durán, F., Meza-Menchaca, T.,

- Hernández-Aguilar, M. E., Trigos, A., & Suárez-Medellín, J. (2017). Molecular Dynamics and Virtual Screening Analysis of Lanosterol Derivatives from Ganoderma Medicinal Mushrooms (Agaricomycetes) as Selective Ligands of Human Androgen Receptor. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 19(7), 595–605. <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushrooms.2017021162>
14. Deb, S., Pham, S., Ming, D. S., Chin, M. Y., Adomat, H., Hurtado-Coll, A., Gleave, M. E., & Tomlinson Guns, E. S. (2018). Characterization of precursor-dependent steroidogenesis in human prostate cancer models. *Cancers*, 10(10), 1–21. <https://doi.org/10.3390/cancers10100343>
15. Hanwell, M. D., Curtis, D. E., Lonie, D. C., Vandermeersch, T., Zurek, E., & Hutchison, G. R. (2012). Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *Journal of Cheminformatics*, 4(1), 17. <https://doi.org/10.1186/1758-2946-4-17>
16. The PyMOL Molecular Graphics System (Version 1.2r3pre). Schrödinger, LLC.
17. Case, D. A., Walker, R. C., Cheatham, T. E., Simmerling, C., Roitberg, A., Merz, K. M., Luo, R., Darden, T., Wang, J., Duke, R. E., Roe, D. R., LeGrand, S., Swails, J., Götz, A. W., Smith, J., Cerutti, D., Brozell, S. R., Luchko, T., Cruzeiro, V. W. D., ... Kollman, P. A. (2018). Amber 18. In University of California, San Francisco. 2018. <http://ambermd.org/doc12/Amber18.pdf>
18. Grant, B. J., Skjærven, L., & Yao, X. Q. (2021). The Bio3D packages for structural bioinformatics. *Protein Science*, 30(1), 20–30. <https://doi.org/10.1002/pro.3923>
19. Trott, O., & Olson, A. J. (2009). AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, 31(2). <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>
20. Stierand, K., Maaß, P. C., & Rarey, M. (2006). Molecular complexes at a glance: Automated generation of two-dimensional complex diagrams. *Bioinformatics*, 22(14), 1710–1716. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl150>
21. Fox, J., & Bouchet-Valat, M. (2022). Rcmdr: R Commander. <https://socialsciences.mcmaster.ca/jfox/Misc/Rcmdr/>
22. Celik, L., Lund, J. D. D., & Schiøtt, B. (2008). Exploring interactions of endocrine-disrupting compounds with different conformations of the human estrogen receptor α ligand binding domain: A molecular docking study. *Chemical Research in Toxicology*, 21(11), 2195–2206. <https://doi.org/10.1021/tx800278d>
23. Muñoz-Fonseca, M. B., Vidal-Limon, A., Fernández-Pomares, C., Rojas-Durán, F., Hernández-Aguilar, M. E., Espinoza, C., Trigos, A., & Suárez-Medellín, J. (2021). Ergosterol exerts a differential effect on AR-dependent LNCaP and AR-independent DU-145 cancer cells. *Natural Product Research*, 35(22), 4857–4860. <https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1737054>
24. Pereira de Jesús-Tran, K., Côté, P.-L., Cantin, L., Blanchet, J., Labrie, F., & Breton, R. (2006). Comparison of crystal structures of human androgen receptor ligand-binding domain complexed with

- various α -agonists reveals molecular determinants responsible for binding affinity. *Protein Science*, 15(5), 987–999. <https://doi.org/10.1110/ps.051905906>
25. Schiffer, L., Arlt, W., & Storbeck, K. H. (2018). Intracrine androgen biosynthesis, metabolism and action revisited. In *Molecular and Cellular Endocrinology* (Vol. 465, pp. 4–26). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.08.016>
26. Green, S. M., Mostaghel, E. A., & Nelson, P. S. (2012). Androgen action and metabolism in prostate cancer. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 360(1–2), 3–13. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.09.046>
27. Zhao, X. Y., Malloy, P. J., Krishnan, A. V., Swami, S., Navone, N. M., Peehl, D. M., & Feldman, D. (2000). Glucocorticoids can promote androgen-independent growth of prostate cancer cells through a mutated androgen receptor. *Nature Medicine*, 6(6), 703–706. <https://doi.org/10.1038/76287>
28. Feng, Q., & He, B. (2019). Androgen Receptor Signaling in the Development of Castration-Resistant Prostate Cancer. *Frontiers in Oncology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00858>.