

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Estudio *in silico* de la interacción entre la insulina glargina y el receptor híbrido IR/IGF1R

Luis Fernando Arévalo Corredor

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia
Bogotá D.C, Colombia
2023

Estudio *in silico* de la interacción entre la insulina glargina y el receptor híbrido IR/IGF1R

Luis Fernando Arévalo Corredor

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título
de:

Maestría en ciencias farmacéuticas

Director:

Claudio Jaime Gómez Alegría, Ph.D.

Codirector:

Martha Margarita González Beltrán, MSc.

Línea de Investigación:

Farmacología Molecular

Grupo de Investigación:

UNIMOL

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia

Bogotá D.C, Colombia

2023

Agradecimientos

En primera instancia, agradezco al todopoderoso por guiarme y darme la vitalidad necesaria para desarrollar mi objetivo e ir escalonando los peldaños de mis proyectos de vida tanto personales como profesionales. En segundo lugar, doy gracias a mí por ser perseverante y querer siempre seguir adelante con este inmenso propósito; así mismo, a mi familia, amigos, conocidos y colegas que aguantaron cada uno de mis desplantes, y a otros que me incentivaron a seguir adelante con este propósito.

Al mismo tiempo, agradezco inmensamente al profesor Claudio Gómez Alegría por su dedicación y guía durante todo el proceso, y sobre todo por su conocimiento, pues a través de él se llegó a la consolidación correcta de este proyecto. A la par, doy inmensas gracias a la profesora Martha Margarita Gonzales, ya que, con su dedicación y enseñanza, me permitió aprender a usar satisfactoriamente las herramientas bioinformáticas empleadas en el desarrollo de este proyecto.

Por último, doy un reconocimiento a la Universidad Nacional de Colombia, por brindar y permitir estos espacios académicos en pro de generar un mejor país.

Los grandes logros siempre suceden en el contexto de las grandes expectativas.

Charles Keittering, inventor prolífico.

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.

Nombre

Fecha 02/08/2023

Resumen

Estudio *in silico* de la interacción entre la insulina glargina y el receptor híbrido

IR/IGF1R

Introducción: La insulina glargina se une a receptores de la familia IR-IGF1R, incluyendo al receptor de insulina (IR) y de IGF1 (IGF1R) que regulan metabolismo, división y diferenciación celular. Las células también expresan receptores híbridos IR/IGF1R que se han asociado con efectos mitogénicos *in vitro*. Aunque existe bastante información de la estructura y mecanismo de activación de los receptores IR e IGF1R, se conoce muy poco del reconocimiento y activación de los receptores híbridos. **Objetivo:** Mediante acercamiento *In silico*, proponer un hipotético modelo estructural del receptor híbrido IR/IGF1R y estudiar la interacción glargina-receptor en dicho modelo. **Metodología:** Se utilizaron herramientas bioinformáticas (Swiss-model, ClusPro, LZerD y HADDOCK) para construir modelos computacionales del receptor híbrido. **Resultados:** Se obtuvo un total de 182 modelos computacionales del receptor híbrido IR/IGF1R, seleccionado finalmente un modelo del receptor libre (sin glargina o *Apo*-receptor) y otro del receptor con glargina unida (*Holo*-receptor), y se analizaron las interacciones ligando-receptor involucradas. Las afinidades teóricas calculadas (Kd) para el complejo glargina-receptor presentaron valores de 1.4 y 7.0 nM para los protómeros IR e IGF1R, respectivamente, lo que concuerda relativamente bien con datos experimentales reportados por otros autores. **Conclusiones:** Se proponen dos modelos computacionales de la estructura 3D del receptor híbrido IR/IGF1R, uno en su estado apo-y otro en su estado holo-receptor, describiendo las interacciones ligando-receptor encontradas.

Palabras clave: Glargina, Receptor Insulina, Receptor IGF1R, Docking molecular. Receptores.

Abstract

In silico study of the interaction between insulin glargine and the hybrid IR/IGF1R receptor

Introduction: Insulin glargine binds to the IR-IGF1R family of receptors, which include the insulin receptor (IR) and the IGF1 receptor (IGF1R) governing cell metabolism, cell division, and differentiation. Cells also express hybrid IR/IGF1R receptors that have been associated with mitogenic effects *in vitro*. Although there is considerable information on the structure and activation mechanism of IR and IGF1R receptors, very little is known about the recognition and activation of the hybrid receptors. **Aims:** Using an *in-silico* approach, to propose a hypothetical structural model of the hybrid IR/IGF1R receptor and to study the glargine-receptor interaction in this model. **Methods:** Bioinformatics tools (Swiss-model, ClusPro, LZerD and HADDOCK) were used to build computational models of the hybrid receptor. **Results:** A total of 182 computational models of the hybrid IR/IGF1R receptor were obtained, finally selecting a model of the free receptor without glargine (*Apo*-receptor) and another of the receptor with glargine bound (*Holo*-receptor), and the ligand-receptor interactions involved were analyzed. The calculated theoretical affinities (Kd) for the glargine-receptor complex presented values of 1.4 and 7.0 nM for the IR and IGF1R protomers, respectively, which agrees relatively well with experimental data reported by other authors. **Conclusions:** Two computational models for the 3D structure of the hybrid IR/IGF1R receptor are proposed, one for its *apo*-and the other for its *holo*-receptor state, and the ligand-receptor interactions are described in the occupied receptor.

Keywords: Insulin glargine, Insulin receptor, IGF1R receptor, Molecular Docking, Receptors.

Contenido

	Pág.
Resumen	7
Lista de figuras	11
Lista de tablas	12
Lista de símbolos y abreviaturas	13
1. Marco teórico	21
1.1 Diabetes mellitus	21
1.2 Insulina.....	23
1.3 Acciones de la insulina	25
1.4 Análogos de la insulina	27
1.4.1 Insulina glargina.....	29
1.5 Familia de receptores tirosina-quinasa (RTKs).....	30
1.5.1 Subfamilia IR - IGF1R.....	31
1.6 Modelamiento por homología	43
1.7 Acoplamiento molecular.....	45
1.7.1 Acoplamiento proteína-proteína	46
1.7.2 Puntaje de las predicciones	46
1.7.3 Refinado del acoplamiento	47
1.7.4 Evaluación de los métodos de acoplamiento molecular	48
1.7.5 Servidores en línea más utilizados para la realización de acoplamiento.	50
2. Materiales y Métodos	54
Materiales	54
Métodos.....	55
2.1 Selección de la secuencia de aminoácidos y verificación del porcentaje de identidad	55
2.2 Modelado por homología.....	56
2.3 Evaluación de la calidad estructural de los modelos obtenidos por homología	58
2.4 Acoplamiento	59
2.5 Criterios de selección de los modelos finales	61
2.6 Afinidades teóricas de los complejos receptor-glargina	62
2.7 Visualización de estructuras.....	63
3. Resultados	64
3.1 Modelado por homología.....	64
3.2 Análisis de las interacciones entre el ligando glargina y el receptor híbrido IR/IGF1R	77
4. Discusión	83

5. Conclusiones.....	93
6. Recomendaciones.....	93
ANEXOS.....	94
Bibliografía	97

Lista de figuras

Figura 1-1: Estructura y procesamiento de la insulina humana.....	24
Figura 1-2: Estructura 3D de la insulina humana.	25
Figura 1-3: Vía de señalización de la insulina.....	26
Figura 1-4: Estructura primaria de la insulina y sus análogos.	29
Figura 1-5: Representación topológica de las 20 subfamilias de RTK.	31
Figura 1-6: Dominios extracelulares del receptor de insulina.	33
Figura 1-7: Conformación en “V” invertida del ectodominio de IR.....	34
Figura 1-8: Identificación sitio 1 (1’) y 2 (2’) en el ectodominio del receptor IR (T-shaped).	35
Figura 1-9: Estructura del receptor de factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF1R).	37
Figura 1-10: Estructura del ectodominio del receptor IGF1R en complejo con IGF1.....	39
Figura 1-11: Esquema de interacción ligando-Receptor para distintos miembros de la familia de receptores Tirosina quinasa (TRKs).	41
Figura 1-12: Esquema de la organización espacial del receptor híbrido IRB/IGF1R.	42
Figura 1-13: Automatización para el desarrollo del modelamiento por homología.	44
Figura 1-14: Esquema general de los métodos de interacción del docking molecular. ...	46
Figura 2-1: Esquema general del procedimiento seguido para el modelamiento por homología del receptor híbrido en complejo con glargina.	58
Figura 3-1: Modelo del ectodominio del receptor híbrido IR/IGF1R en ausencia de ligando.	66
Figura 3-2: Gráfico Ramachandran del modelo.	68
Figura 3-3: Modelos hipotéticos del receptor híbrido en complejo con Glargina.	70
Figura 3-4: Gráfico Ramachandran del modelo 2.	72
Figura 3-5: Modelo del receptor híbrido IR/IGF1R con glargina unida (modelo 4).	74
Figura 3-6: Interacción de glargina con el receptor híbrido IR/IGF1R (protómero IR). ...	78
Figura 3-7: Interacción de glargina con el receptor híbrido IR/IGF1R (protómero IGF1R).	81

Lista de tablas

Tabla 1-1: Efectos metabólicos de la insulina mediados por la vía PI3K.	27
Tabla 1-2: Tipos de insulina y cómo funcionan.	28
Tabla 1-3: Evaluación de desempeño de los servidores en línea utilizados para acoplamiento proteína-proteína en el informe CAPRI sexta edición.	49
Tabla 3-1: Matriz de diseño del receptor híbrido modelado por homología.	64
Tabla 3-2: Parámetros de calidad, análisis geométrico y de torsión del modelo 1.....	67
Tabla 3-3: Matriz de diseño del modelo por homología con ligando modelado por homología.	69
Tabla 3-4: Evaluación de calidad, análisis geométrico y de torsión del modelo 2.....	71
Tabla 3-5: Evaluación de calidad, análisis geométrico y de torsión del modelo 4.....	75
Tabla 3-6: Valores de ΔG y K_d del modelo final propuesto para el complejo glargina-receptor híbrido IR/IGF1R	76
Tabla 3-7: Resumen de la Interacción glargina- sitio 1 de unión protómero IR del receptor híbrido (modelo 2).	79
Tabla 3-8: Resumen de la Interacción glargina- sitio 1 de unión de la protómero IGF1R del receptor híbrido (modelo 2).....	82

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)
Å	Angstrom	10^{-10} m	Distancia Molecular

Símbolos con letras griegas

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

Subíndices

Subíndice	Término
Kd	Constante de disociación
Km	Constante Michaelis-menten

Superíndices

Superíndice	Término
e^x	Euler a la x potencia

Introducción

Los receptores tirosina-quinasa (RTK) constituyen una familia de proteínas transmembrana (TM) involucradas en la regulación de importantes procesos biológicos, incluyendo metabolismo, desarrollo, división y diferenciación celular. Desde el punto de vista estructural, los receptores RTK consisten en un dominio N-terminal extracelular seguido de un dominio transmembrana (TM) y de un dominio intracelular con actividad tirosina quinasa (TK) que se activa por cambios conformacionales inducidos por unión del ligando al dominio extracelular. Dentro de la familia de receptores RTK, la subfamilia IR-IGF1R comprende al receptor de insulina (IR), el receptor del factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF1R) y la proteína relacionada con el receptor de insulina (IRR). Esta subfamilia IR-IGF1R se caracteriza porque los receptores se expresan en la membrana plasmática en forma de heterotetrámeros ($\alpha_2\beta_2$) donde cada fragmento ($\alpha\beta$) deriva del mismo gen y actúa como una unidad monomérica ($\alpha\beta$) que interactúa con otro monómero idéntico formando homodímeros IR/IR para el receptor de insulina o IGF1R/IGF1R para el receptor de IGF1R. En dicho contexto, cada monómero ($\alpha\beta$) tiene una subunidad α extracelular que contiene el sitio de unión de ligando, y una subunidad β conteniendo los dominios TM y TK. Además de los homodímeros IR/IR e IGF1R/IGF1R, se ha descrito que las células también expresan receptores híbridos IR/IGF1R.

Por otro lado, la glargina es un análogo de la insulina que se utiliza para el tratamiento farmacológico de la diabetes mellitus. Diferentes estudios con líneas celulares muestran que la glargina presenta actividad mitogénica *in vitro*, y esta actividad sería dependiente

del receptor IGF1R (dímero IGF1R/IGF1R) y del receptor híbrido IR/IGF1R. Experimentalmente, se han determinado las afinidades de interacción de glargina con los receptores diméricos IR/IR, IGF1R/IGF1R y con el híbrido IR/IGF1R). Sin embargo, se desconocen las bases estructurales de dicha interacción, lo que se debe al hecho de que no se han determinado las estructuras 3D de estos receptores híbridos, ni tampoco con el ligando glargina unido a ellos. En el presente trabajo se utilizaron métodos computacionales para proponer una hipotética estructura del receptor híbrido IR/IGF1R y del complejo formado entre este receptor híbrido y el ligando glargina. Adicionalmente, se realizó un análisis de los hipotéticos residuos involucrados en la interacción ligando-receptor.

Planteamiento del problema

La Diabetes Mellitus (DM) es una enfermedad crónica que se desencadena cuando el páncreas deja de producir suficiente insulina o cuando el organismo no responde eficientemente a la insulina producida (Organización Mundial de la Salud, 2020). El efecto de la diabetes no controlada es una hiperglucemia, que con el tiempo daña gravemente muchos órganos y sistemas, especialmente nervios y vasos sanguíneos (Organización Mundial de la Salud, 2020).

En el año 2019 la Federación Internacional de Diabetes (IDF, por sus siglas en inglés), informó que 537 millones de adultos a nivel mundial con edades entre 20-79 años padecen de diabetes lo que representa un 9.3% de la población dentro de este segmento etario (International Diabetes Federation, 2019). Asimismo, se prevé un aumento de la incidencia en la próxima década. En 2019 la organización mundial para la salud (OMS) reportó que las enfermedades no transmisibles como neumopatías crónicas, enfermedades cardiovasculares, cáncer, afecciones de salud mental y la diabetes son responsables del 71.0% de las muertes en el mundo (Organización Mundial de la Salud, 2020), y la diabetes fue la causa directa de 2.0 millones de defunciones (Organización Mundial de la Salud, 2022b). En Colombia, para el periodo comprendido entre el 1° de julio del 2019 y el 30 de junio del 2020, la organización Cuenta de Alto Costo (CAC) mediante su informe anual reportó de 168.778 casos nuevos de DM con una incidencia cruda de 3.38 nuevos casos por cada 1000 habitantes. No obstante, en este informe se menciona que se presentaron 17.790 casos menos que en el año 2019 (Costo, 2020). Cabe resaltar que las edades comprendidas en el reporte se clasifican de la siguiente manera: el 69.0% de los casos

nuevos de DM se encuentran entre los 50 y 74 años; el 15.2% representa el rango de edad entre los 60 y 64 años, además el 3.5% del total de los casos fueron menores de 35 años (Costo, 2020). En consecuencia, durante este periodo se calculó en Colombia una tasa de mortalidad general para DM de 63 casos por cada 100.000 habitantes.

Entre las aproximaciones terapéuticas para el control de la diabetes se encuentra el uso de agentes farmacológicos que modulan los niveles de glucosa sanguínea, entre los cuales está la insulina y sus análogos. La insulina puede administrarse por vía intravenosa o intramuscular, y se utiliza mayormente para tratar pacientes con DMT1 y en algunos casos con DMT2. Los análogos de la insulina son derivados sintéticos de la insulina que se obtienen al modificar ciertos aminoácidos de la cadena peptídica de la insulina humana, lo que modifica sus características farmacocinéticas. Se han descrito análogos de acción rápida, intermedia y prolongada (de Luis & Romero, 2013). Dentro de análogos de acción prolongada se encuentra la glargina, que se diferencia de la insulina humana en tres aminoácidos: dos residuos de arginina (Arg) en el C terminal de la cadena B y una sustitución de la Arg21 por glicina (Gly) en la cadena A (Nagel et al., 2019).

La insulina y su análogo glargina se unen al receptor de insulina (homodímero IR/IR), al receptor de IGF1 (homodímero IGF1R/IGF1R) (Drejer, 1992; Varewijck & Janssen, 2012; Pierre-Eugene et al., 2012; Singh et al., 2013) y también a los receptores híbridos IR/IGF1R presentes en las células (Li et al., 2019a; Xu et al., 2018). Mientras que la activación del receptor de insulina se relaciona mayoritariamente con regulación de vías metabólicas (Backer et al., 1992; de Meyts & Whittaker, 2002; White & Kahn, 2021), la activación del receptor de IGF1 se asocia mayoritariamente con vías mitogénicas (Xu et al., 2018). Los estudios con líneas celulares sugieren que la glargina posee actividad mitogénica *in vitro*, la que sería dependiente del receptor IGF1R (Sciacca et al., 2012; Varewijck & Janssen,

2012), y más específicamente del receptor híbrido IR/IGF1R (Ciaraldi & Sasaoka, 2011; Pierre-Eugene et al., 2012; Sciacca et al., 2014, 2018; Sommerfeld et al., 2010a; Varewijck et al., 2010). Aunque se conocen las afinidades de interacción de la glargina con los receptores IR, IGF1R y el receptor híbrido IR/IGF1R, se desconocen las bases estructurales de tales interacciones. Dicho desconocimiento se debe al hecho de que no se ha descifrado la estructura tridimensional de dichos complejos ligando/receptor, lo que requiere tecnología no disponible en nuestro medio. En este sentido, pensamos que los métodos de predicción computacionales podrían servir como una estrategia preliminar para plantear modelos estructurales hipotéticos. Así, en este trabajo se utilizaron métodos computacionales para predecir la estructura del complejo entre glargina y el receptor híbrido IR/GF1R, y se analizaron las posibles interacciones involucradas en la interacción ligando-receptor.

Con este trabajo se buscó responder la pregunta:

¿Qué características estructurales presenta un hipotético modelo estructural del complejo ligando/receptor formado por glargina y el receptor híbrido IR/IGF1R?

Objetivos

Objetivo general.

Proponer y analizar, mediante acercamiento *in silico*, un hipotético modelo estructural para la interacción entre la insulina glargina y el receptor híbrido IR/IGF1R.

Objetivos específicos.

- 1) Proponer un modelo estructural del complejo glargina-receptor híbrido IR/IGF1R.
- 2) Analizar las interacciones ligando-receptor involucradas en el modelo propuesto.

1. Marco Teórico

1.1 Diabetes Mellitus

Como se indicó previamente, la Diabetes Mellitus (DM) es una enfermedad crónica debida a la insuficiente producción endógena de insulina o a un fenómeno de resistencia a la insulina en los tejidos periféricos. El diagnóstico de la DM se sustenta en los siguientes parámetros: glucosa plasmática en ayunas ≥ 7.0 mmol/L (126 mg/dL); Glucosa plasmática postprandial $\geq 11,1$ mmol/L (200mg/dL) tomada al cabo de dos horas después de ingerir una carga oral de glucosa (75 g); Hemoglobina glicosilada (HbA1c) $\geq 6.5\%$. La diabetes mellitus (DM) se divide en tres tipos principales: Diabetes mellitus tipo 1 (DMT1), Diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) y Diabetes mellitus gestacional. La DMT1 también llamada diabetes insulino dependiente, juvenil o de inicio de infancia se caracteriza porque el páncreas deja de producir insulina, por lo cual estos pacientes son completamente dependientes de insulina exógena (DHHS, 2020). Usualmente, por mecanismos inflamatorios autoinmunes las células β pancreáticas son destruidas, con lo cual el páncreas deja de sintetizar la insulina endógena (Organización Mundial de la Salud, 2020). Sin la administración diaria de insulina exógena, este tipo de diabetes lleva rápidamente a la muerte.

La diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) se caracteriza por el hecho de que las células y tejidos se vuelven resistentes a la acción de la insulina (DHHS, 2020). Se reconoce como diabetes no insulino dependiente o de inicio en la edad adulta (Organización Mundial de la Salud, 2020). La DMT2 representa el 80-90% de los casos mundiales de diabetes, y se asocia con factores modificables (obesidad, niveles de colesterol, estilo de vida, dieta y actividad física) y factores no modificables (antecedentes de hiperglucemia, prediabetes y/o diabetes

gestacional, genética, raza/ etnia y edad). La DMT2 se presenta en personas con grados variables de resistencia a la insulina (Bello et al., 2016). La resistencia a la insulina induce una mayor secreción de esta por parte de las células β pancreáticas para compensar su acción disminuida, llevando a que dichas células fallen por la sobrecarga que eso significa, lo que se traduciría en una serie de alteraciones metabólicas representadas inicialmente por intolerancia a la glucosa seguida de hiperglucemia en ayunas (Egan & Dinneen, 2014). La Diabetes gestacional se caracteriza por el hecho de aparecer durante el embarazo, y consiste en una glucemia superior a la normal, pero inferior a la que justifica un diagnóstico de diabetes (Organización Mundial de la Salud, 2022; Parodi & José, 2016). La diabetes gestacional aumenta el riesgo de sufrir complicaciones durante el embarazo y el parto, y puede generar secuelas tanto en la madre como en el neonato (National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, 2022; Parodi & José, 2016).

No existen marcadores clínicos claros que permitan indicar con precisión cuál de los dos defectos primarios predomina en los pacientes diabéticos, pero el exceso de peso sugiere la presencia de resistencia a la insulina, mientras que la pérdida de peso sugiere una reducción de la insulina a nivel sistémico (Bello et al., 2016). Según la OMS, las estrategias para la prevención y el tratamiento de la diabetes se basan en tres objetivos esenciales (Organización Mundial de la Salud, 2020): (1) mejorar la utilización de glucosa y demás nutrientes a nivel celular; (2) controlar los niveles de glicemia, y (3) prevenir, los efectos nocivos causados por un control deficiente en el paciente tratado (Organización Mundial de la Salud, 2020). La DM agrupa un conjunto de alteraciones, a la que en general se asocian, en grado variable, un conjunto de complicaciones micro, macrovasculares y

sistémicas. Por ende, el tratamiento de la DM sigue diversas estrategias con el fin de aliviar los síntomas, mejorar la calidad de vida y prevenir las complicaciones agudas y/o crónicas.

1.2 Insulina

La insulina es una hormona peptídica de 51 aminoácidos (aa) formada por dos cadenas peptídicas: una cadena A de 21 aa y una cadena B de 30 aa unidas por dos puentes disulfuro entre las cisteínas 7-7 y 20-19 (Jarosinski et al., 2021; Menting et al., 2013) (Figura 1-1 A). La insulina posee un peso molecular de 5.8 KDa y es secretada por las células β de los islotes pancreáticos en respuesta a un aumento de la glucemia. Su principal función es mantener la concentración de glucosa sanguínea en un rango entre 80–100 mg/dL, permitiendo la entrada y almacenamiento de este nutriente en las células sensibles a la hormona (de músculo y tejido adiposo) (Alberto et al., 2008; Sánchez r Ana; Islas María C, 2016).

La insulina se sintetiza como un precursor inactivo de 110 aminoácidos denominado preproinsulina, el cual se procesa proteolíticamente en su extremo N-terminal generando la proinsulina de 87 residuos, que posteriormente se sigue procesando en el aparato de Golgi donde se retira el péptido C para generar la insulina madura. Esta como el péptido C son empaquetados en vesículas secretoras y son liberados a la circulación sistémica (**Figura 1-1**) (Hedeskov,1980; Lawrence, 2021; Sánchez e Islas, 2016).

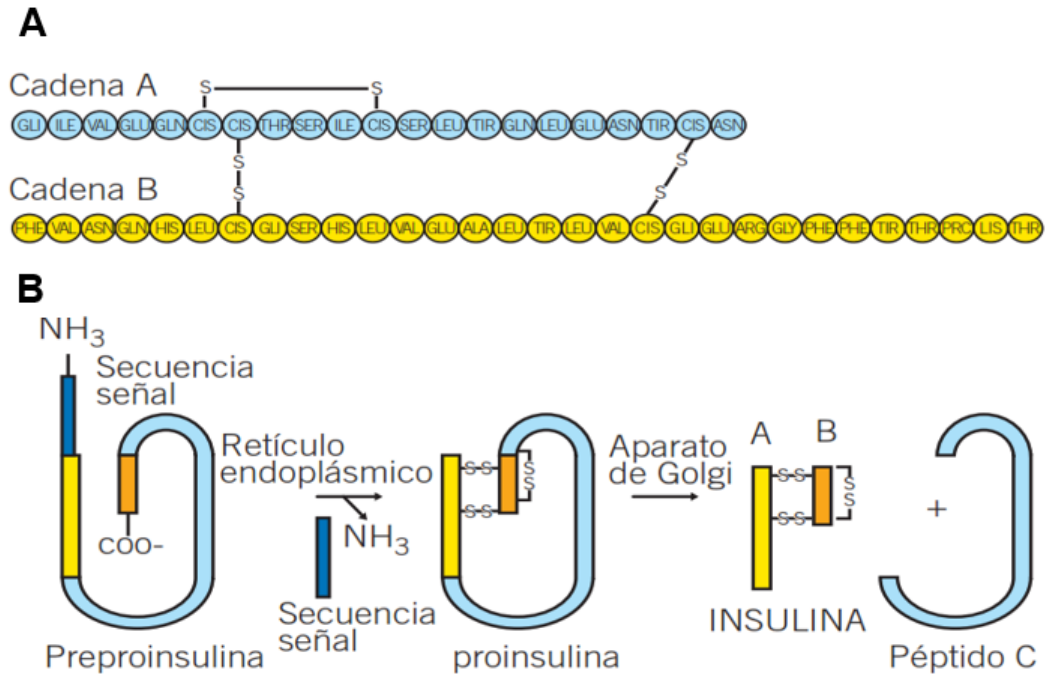


Figura 1-1: Estructura y procesamiento de la insulina humana. **A.** Insulina cadenas A y B de la insulina. **B.** Proceso de maduración del precursor de insulina. Imagen tomada de (Sánchez e Islas, 2016).

La estructura 3D de la insulina se muestra en la Figura 1-2 y fue resuelta por Menting et al. (2013). La insulina forma complejos oligoméricos (dímeros y hexámeros). Los hexámeros, son estabilizados en presencia de iones de zinc y los cambios entre estos estados oligoméricos son usados para el control de la actividad farmacológica de este biológico; así, existen análogos de insulina que se clasifican en análogos de acción rápida, intermedia o prolongada, donde la formación de hexámeros, nos indica mayor acción y estabilidad (Adams et al., 2018).

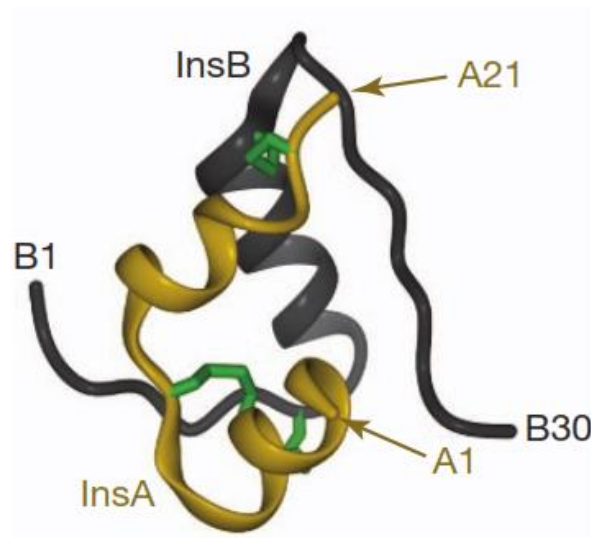


Figura 1-2: Estructura 3D de la insulina humana. La cadena A representada en color amarillo y la cadena B en color gris oscuro. Imagen tomada de (Menting et al., 2013).

1.3 Acciones de la insulina

Las acciones de la insulina son mediadas por el receptor de insulina (IR), el cual se autofosforila en residuos de tirosina (Tyr) localizados en la parte intracelular del receptor, lo que gatilla la cascadas de fosforilación dependientes de proteínas quinasas intracelulares. En consecuencia, estas quinasas son las responsables de regular los eventos metabólicos, expresión de genes, diferenciación y crecimiento celular (figura 1-3) (Hubbard, 2013; Saltiel & Kahn, 2001; Saltiel & Pessin, 2002; Sánchez ; Islas, 2016).

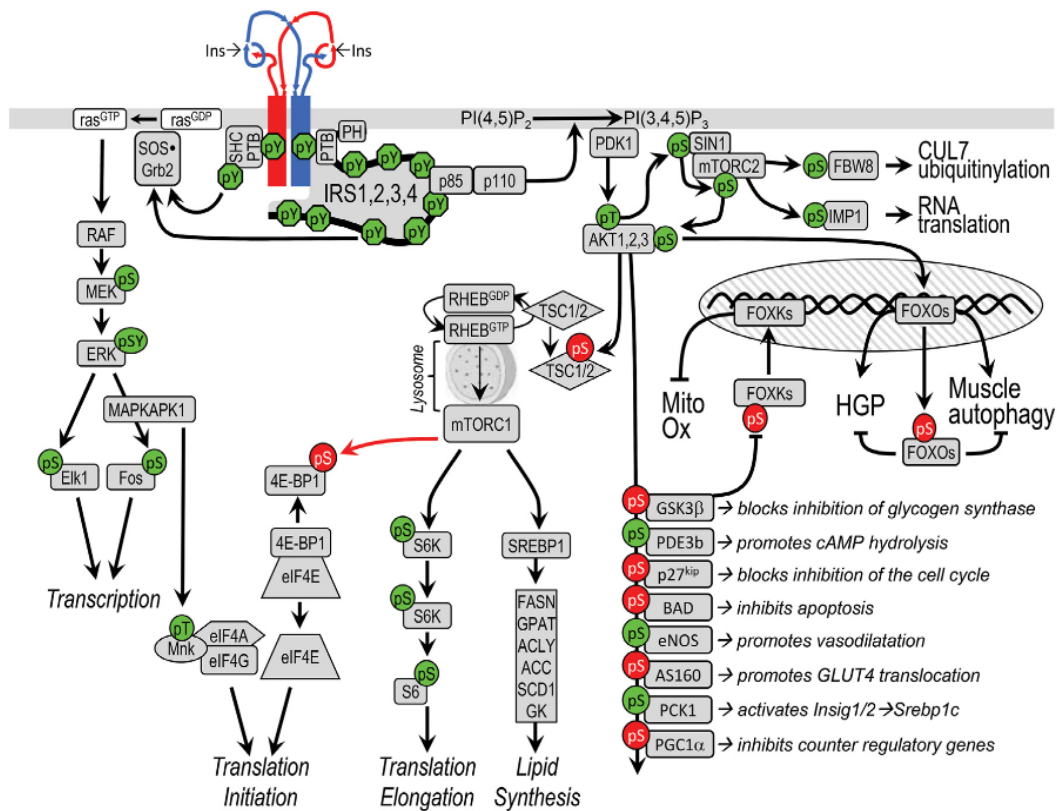


Figura 1-3: Vía de señalización de la insulina. Imagen tomada de (Rhoads, 1999; White & Kahn, 2021).

Como se observa en la figura 1-3, existen dos principales vías de señalización activadas por la insulina: 1) vía metabólica, la cual depende de las enzimas PI3K (o p85/p110 en la figura 1-3) y 2) la vía mitogénica la cual depende de la quinasa activada por mitógenos (MAPK) (Sánchez e Islas, 2016; White & Kahn, 2021). La vía metabólica regula la captación de glucosa y otros nutrientes en la célula, mientras que la vía de la MAPK, se caracteriza por participar principalmente en la regulación de la expresión genética en órganos diana, pero no en la regulación del transporte de glucosa (Sánchez e Islas, 2016; White & Kahn, 2021). Los eventos característicos de la vía metabólica se presentan en la tabla 1-1.

Tabla 1-1: Efectos metabólicos de la insulina mediados por la vía PI3K/AKT.

Órgano diana	Efecto metabólico
Tejido adiposo	↑ Transporte de glucosa
	↑ Glucólisis
	↑ Síntesis de glucógeno
	↑ Transporte de aminoácidos
	↑ Síntesis de ácidos grasos
	↓ Gluconeogénesis
	↓ Lipólisis
Musculo esquelético	↑ Transporte de glucosa
	↑ Síntesis de ácidos grasos
	↑ Transporte de aminoácidos
	↑ Síntesis de glucógeno
	↑ Glucólisis
	↑ Gluconeogénesis
	↓ Glucogenólisis
	↓ Síntesis de proteínas
Hígado	↑ Glucólisis
	↑ Síntesis de ácidos grasos
	↑ Lipogénesis de Novo
	↑ Síntesis de proteínas
	↓ Glucogenólisis
	↓ Gluconeogénesis
	↓ Cetogénesis
	↓ Transporte de glucosa

Tabla realizada con base en (Joshi et al., 2007; Alberto et al., 2008)

1.4 Análogos de la insulina

Los análogos de insulina son moléculas de insulina que han sido modificadas

estructuralmente, a las cuales se les ha adicionado, sustituido, intercambiado o eliminado algunos residuos de aminoácidos. Estas modificaciones modifican las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de la molécula de insulina.

Las modificaciones estructurales de la insulina tienen por objeto imitar la actividad basal y/o el pico de actividad de la insulina, de forma semejante a lo que ocurre con la hormona endógena en pacientes sanos. Así, los análogos se clasifican como: análogos de acción rápida, ultrarrápida y análogos de acción prolongada, tabla 1-2.

Tabla 1-2: Tipos de insulina y cómo funcionan.

Tipos de insulina	Tipo de acción	Inicio de la acción	Acción máxima (h)	Duración de la acción (h)
Lispro	Ultrarrápida	5-15min	1-2	2 – 4
Aspártica	Ultrarrápida	5-15min	1-3	3 – 5
Glulisina	Ultrarrápida	5-15min	1-2	4 – 6
Humana regular	Rápida	30-60min	2-4	5 – 7
NPH	Intermedia	1-2h	5-7	12 – 13
Glargina	Prolongada	1-2h	Sin pico pronunciado de acción máxima	20 – 24
Detemir	Prolongada	1-2h		12 – 24

NPH: Neutral Protamin Hagedorn o isofana. Tomado de (de Luis & Romero, 2013).

La figura 1-4, muestra los diferentes análogos de la insulina, sus respectivas modificaciones estructurales. Los análogos de insulina en colores distintivos.

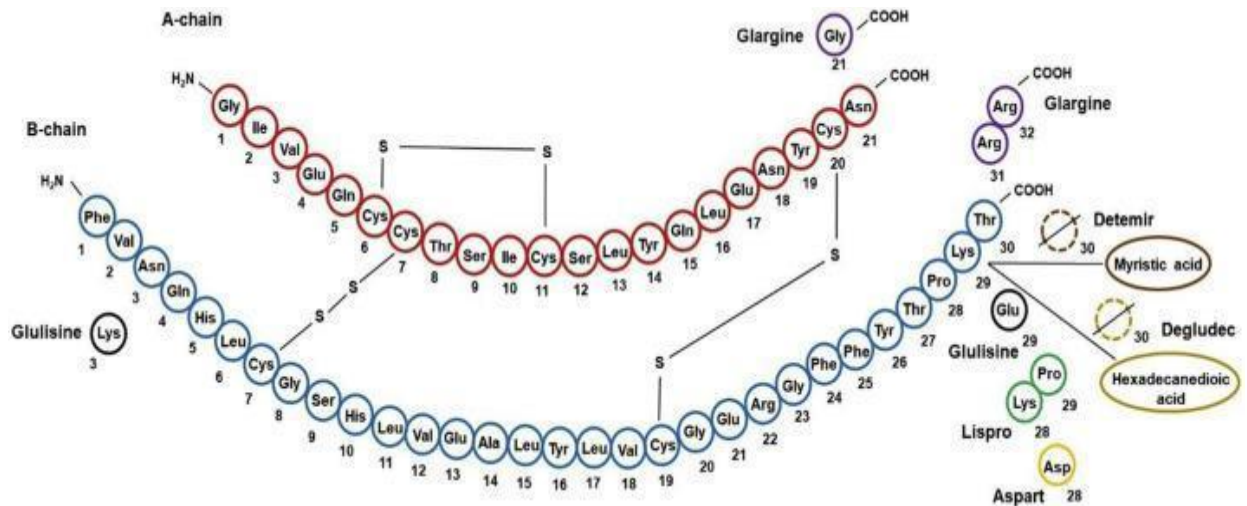


Figura 1-4: Estructura primaria de la insulina y sus análogos. Las modificaciones de los residuos, se presentan adyacentes a la cadena A y cadena B, tanto en sentido N-terminal como C-terminal, según sea el caso. Imagen tomada de Nagel et al.(2019).

Para efectos del presente proyecto es importante destacar los análogos de acción prolongada, entre ellos la insulina detemir y la insulina glargina, de la cual ahondaremos en la siguiente sección. Los análogos de larga duración simulan la liberación de insulina basal, para mantener un control preprandial conveniente. Estos análogos se caracterizan por tener un inicio de acción lento (1-2 h) y una duración de la acción mucho más prolongada (~12–24 h) (de Luis Romero, 2013; Nagel et al., 2019).

1.4.1 Insulina Glargina

La glargina es el primer análogo de insulina de acción prolongada que se obtuvo por tecnología de ADN recombinante introduciendo el gen que codifica la proinsulina en la bacteria *Escherichia coli* (Wang et al., 2003). Esta insulina, se obtiene al añadir 2 residuos de arginina en la región C terminal de la cadena B (Arg B31 y Arg B32) y además tiene una

sustitución de la arginina A21 por glicina (Bolli et al., 1999)(figura 1-4). Estas modificaciones generan dos nuevas cargas positivas en la molécula, cambiando el punto isoeléctrico de 5.4 a 6.7 y hace que la molécula sea menos soluble al pH fisiológico del tejido subcutáneo, provocando la formación de microprecipitados que se van absorbiendo lentamente, proporcionando un perfil farmacocinético de concentración/tiempo que no presenta picos máximos y genera una acción prolongada (Heise et al., 2004). En el tejido y en sangre, los microprecipitados de glargina están expuestos a la acción proteolítica, lo que genera metabolitos solubles y completamente activos, denominados IM (intermediario), metabolito M1 y metabolito M2, los cuales circulan en el plasma sanguíneo y son los responsables de ejercer acción sobre los órganos diana (Kuerzel et al., 2003; Sommerfeld et al., 2010).

1.5 Familia de receptores tirosina-quinasa (RTKs)

Los receptores tirosina-quinasa (RTK) forman una superfamilia de proteínas que está presente en todas las células eucariotas. Estos receptores son proteínas transmembrana que regulan procesos claves tales como el ciclo celular, migración celular, metabolismo, supervivencia, proliferación y diferenciación celular (Grassot et al., 2003). Los miembros de esta familia de receptores presentan un dominio extracelular (ectodominio), seguido por un dominio transmembrana hidrofóbico y un dominio intracelular conteniendo actividad enzimática del tipo tirosina quinasa (Du & Lovly, 2018; Grassot et al., 2003; Hubbard, 1999). En humanos se han identificado 58 genes que codifican RTKs (Du & Lovly, 2018; Manning et al., 2002; Robinson et al., 2000). Estos receptores se subclasifican en 20 subfamilias según su homología de secuencia, estructura modular del dominio extracelular, y ligando que se une al receptor (Lemmon & Schlessinger, 2010). En la figura 1-5, se

muestra una representación de la topología de las diferentes subfamilias de receptores RTK.

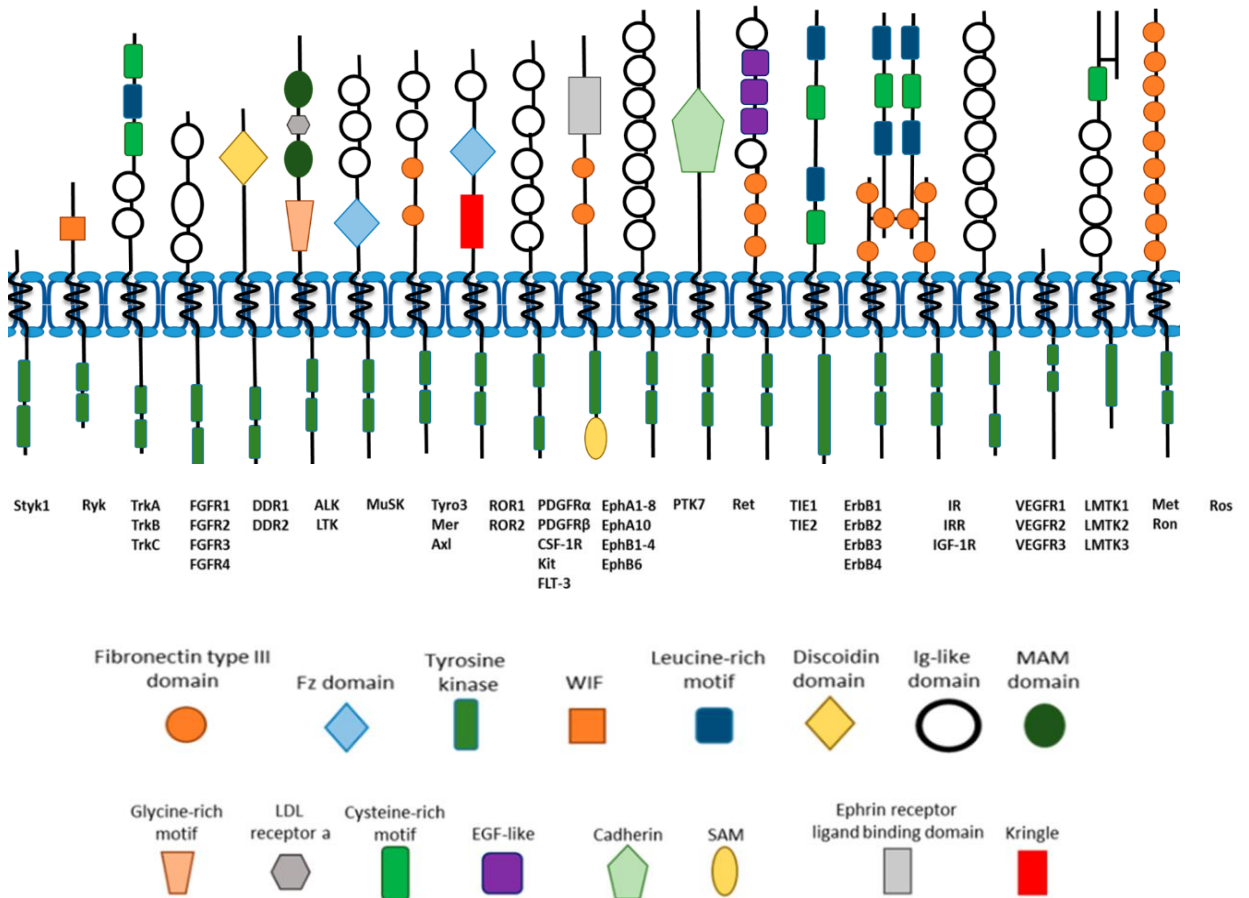


Figura 1-5: Representación topológica de las 20 subfamilias de RTK. Imagen tomada de (Scioli et al., 2014).

1.5.1 Subfamilia IR - IGF1R

Esta subfamilia contiene tres miembros: el receptor de Insulina (IR), el receptor de factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF1R) y la proteína relacionada con el receptor de insulina (IRR). Esta subfamilia de receptores presenta una estructura modular por dominios. Esta estructura involucra dos secuencias homólogas largas ricas en leucina

(dominios L1 y L2), separadas por un dominio rico en cisteína (CR), seguido de tres dominios de fibronectina tipo III (Fn1, Fn2, Fn3), un dominio en Fn2 (ID), un dominio transmembranal (TM), un dominio juxtamembrana (JM) y un dominio tirosina quinasa (TK).

Receptor de insulina (IR)

El receptor de insulina (IR) es una proteína transmembrana cuyo gen en humanos se localiza en el cromosoma 19 y es codificado por 22 exones. El exón 11 codifica 12 aminoácidos, y mediante splicing alternativo este exón da origen a dos isoformas del receptor: (i) la isoforma A (IR-A) que carece del exón 11 y (ii) la isoforma B (IR-B) que contiene los 12 residuos codificados por el exón 11 (región α -CT) la isoforma IR-A consta de 1370 aa y la isoforma IR-B es de 1382 aa, y ambos receptores están constituidos por dos subunidades α y dos subunidades β , sin embargo, la isoforma IR-B presenta mayor afinidad por la insulina. Como se indicó en la introducción la subunidad α contiene el ectodominio del receptor, mientras que la subunidad β contiene el dominio TK intracelular (figura 1-6). En la membrana celular estos receptores están en forma dimerica como IRA/IRA e IRB/IRB, como también en forma de receptores híbridos IR/IGF1R. Estos receptores híbridos contienen un protómero IR y otro IGF1R (Belfiore et al., 2009; Knudsen et al., 2011).

En la figura 1-6 se muestran los dominios L1, CR, L2, FnIII- (1-3), los cuales están interrumpidos por un dominio de inserción (ID) de 120 aminoácidos que contiene el sitio de escisión de furina que permite la separación de las subunidades α y β de cada dimer del receptor IR (White & Kahn, 2021). A su vez, la porción intracelular de la subunidad β

contiene el dominio tirosina quinasa (TK), el cual está rodeado por dos regiones reguladoras, la región juxtamembrana (JM) que antecede el dominio quinasa, y está involucrada en el acoplamiento de los sustratos IRS y Shc, y posteriormente se encuentra el extremo C-terminal (Sparrow et al., 1997; de Meyts & Whittaker, 2002). Esta subfamilia de receptores se considera heterotetrámerica ya que su ectodominio, se caracteriza por tener dos subunidades α y dos subunidades β ($\alpha_2\beta_2$), donde las dos subunidades α y β de IR están unidas por enlaces disulfuro, mediados por la interacción de los residuos Cys524 (FnIII-1); Cys647, Cys682, Cys683 y Cys685 (FnIII-2) y Cys860 (FnIII-3) (figura 1-6) (de Meyts & Whittaker, 2002). Al mismo tiempo, las subunidades α y β están conectadas covalentemente por un único puente de disulfuro entre la Cys647 del dominio FnIII-2 y la Cys860 del dominio FnIII-3 (Ye et al., 2017).

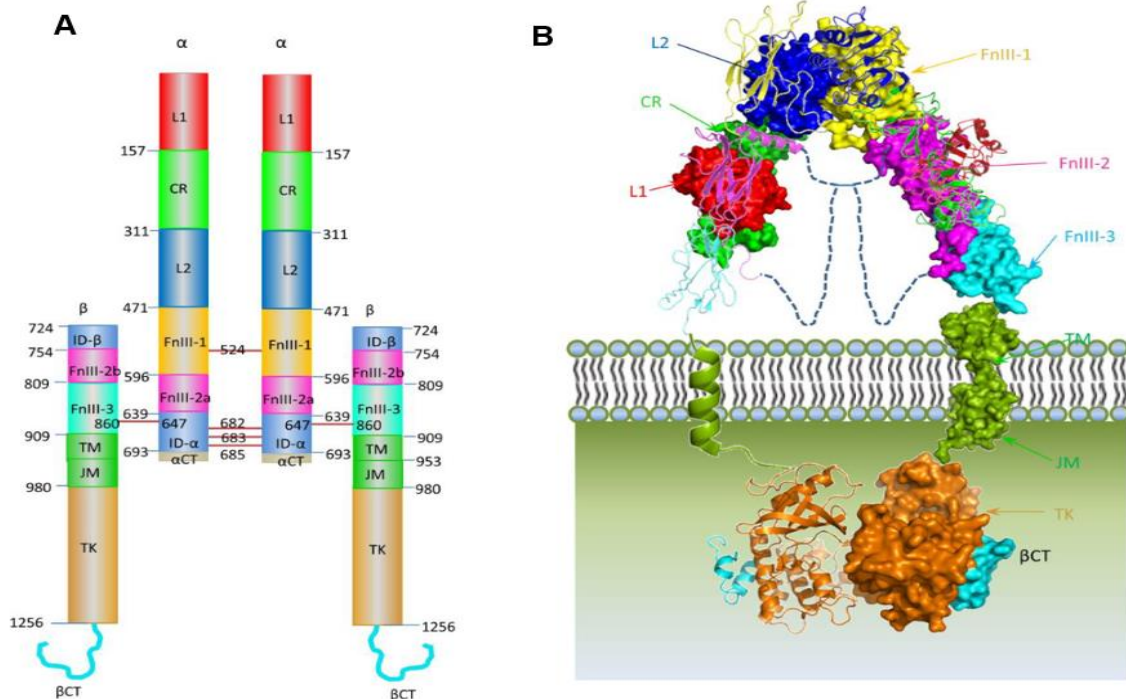


Figura 1-6: Dominios extracelulares del receptor de insulina. Representación espacial del dímero de IRB/IRB en la membrana celular. **A)** Esquema topológico del receptor IRB/IRB; las líneas horizontales representan enlaces covalentes (puentes disulfuro) entre las

subunidades. **B)** El monómero derecho se representa en forma de superficie y el izquierdo en forma de estructura secundaria. Imagen tomada de (Ye et al., 2017).

En la membrana celular, el ectodominio del receptor IR se encuentra en un estado autoinhibido, el cual se pliega en una conformación en “V” invertida simétrica (figura 1-7). Y al ser interrumpida esta conformación por la interacción con insulina, se reordena de manera estructural y rotacional, de tal manera que el ectodominio del receptor cambia su forma a una T (*T-Shaped*), la cual es su conformación activa (Gutmann et al., 2017; Yang et al., 2021).

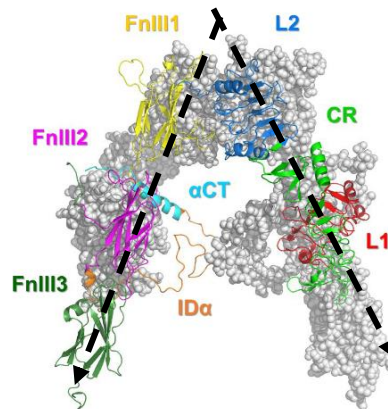


Figura 1-7: Conformación en “V” invertida del ectodominio de IR. Imagen tomada de PDB 4ZXB.

El reordenamiento del receptor IR en su conformación activa, permite que los ligandos interactúen con los cuatro sitios de unión del receptor (figura 1-8). Estos cuatro sitios de unión se distribuyen en un sitio de alta afinidad y otro de baja afinidad, para cada subunidad α del ectodominio dimérico, el sitio 1, se encuentra entre los dominios L1 y α CT, y el sitio 2 se encuentra entre los residuos de FnIII-1' y FnIII-2'. La unión de la insulina a los sitios de unión 1 y 2 ocurre con una afinidad (K_d) de 6.4nM y de 400nM respectivamente

(Williams et al., 1995). Como característica de este receptor IR es que la unión del ligando a estos dos sitios se da con cooperatividad negativa, lo que implica la comunicación entre los dos sitios, de tal manera que la unión del ligando al sitio 1 disminuye la afinidad por el segundo sitio de unión (de Meyts & Whittaker, 2002).

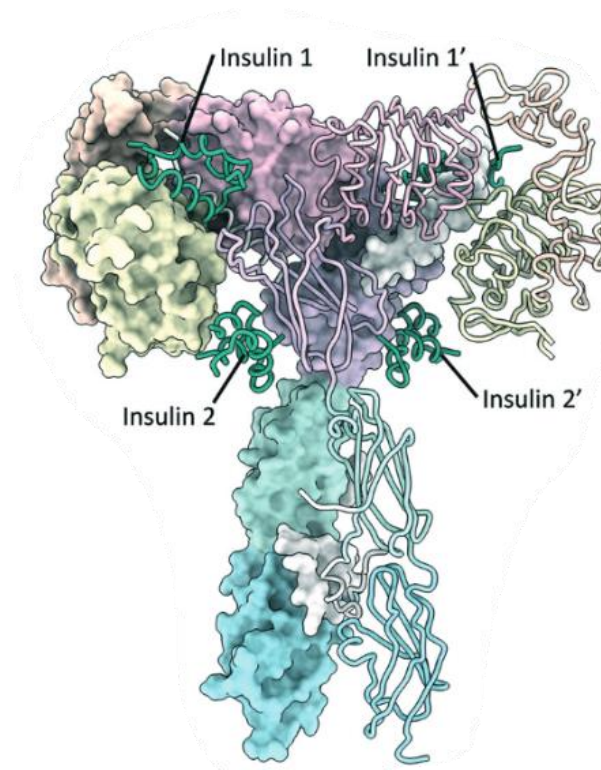


Figura 1-8: Identificación sitio 1 (1') y 2 (2') en el ectodominio del receptor IR (T-shaped). Uno de los dímeros del receptor IR/IR se encuentra en diagrama de superficie y en el otro en forma de sticks. Los dominios se encuentran segmentados por color: dominio L1 (amarillos); dominio CR (naranja); dominio L2 (magenta); dominio FnIII-1 (lila); dominio FnIII-2 (verde claro), dominio FnIII-3 (aguamarina) e insulina (verde) (Turvey et al., 2022). Imagen tomada de Cryo-EM Structure (PDB: 6PXV).

Receptor de factor de crecimiento similar a la insulina (IGF1R)

El receptor de factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF1R) tiene 1367 aminoácidos y posee un porcentaje de identidad del 57% con IR (Adams et al., 2000; Li et

al., 2019). El gen de este receptor está localizado en el cromosoma 15, el cual, es similar en tamaño y en organización estructural al gen que codifica IR en el cromosoma 19 (Ullrich et al., 1986). En cuanto al receptor IGF1R, este es una glicoproteína transmembrana, codificada por un gen que tiene 21 exones (10 exones que codifican la subunidad α y 11 exones que codifican la subunidad β). El receptor IGF1R presenta una estructura similar al receptor IR tanto en su ectodominio como en su región intracelular, por lo que, está conformado también por dos subunidades α y β extracelulares, unidas por puentes disulfuro, y un dominio TK intracelular. Este receptor está implicado en el crecimiento y desarrollo celular (Abbott et al., 1992).

En la figura 1-9 se presenta la organización de dominios y la estructura tridimensional del receptor IGF1R similar al receptor de IR. La subunidad α está conformada por los dominios L1 y L2 separados por una región rica en cisteínas (CR que contiene 22 residuos de cisteína), los dominios FNIII-1, FNIII-2 e ID (α -CT) y la subunidad β está conformada por los dominios ID, FNIII-2, FNIII-3, TM, JM, TK y C-terminal (Ward et al., 2013). El dominio intracelular está compuesto por un dominio juxtamembrana (JM), seguido de un dominio TK conteniendo varios residuos de tirosina que representan sitios de fosforilación del receptor; finalmente le sigue la región C-terminal (Hubbard, 1999). Del mismo modo que el receptor de IR. Los heterodímeros de IGF1R, están unidos por puentes disulfuro a través de los siguientes residuos Cys514 de cada subunidad α con los residuos de cisteína en las posiciones 669, 670 y 672; L1:Cys3-Cys33 y Cys120-Cys148; L2: Cys302-Cys323 y Cys425-Cys458 (Schäffer & Ljungqvist, 1992; Sparrow et al., 1997; Ward et al., 2013).

Debido a la similitud estructural entre los dímeros de los receptores de IR e IGF1R no solo se unen a su respectivo ligando con alta afinidad, sino también presentan unión cruzada con ligandos de otros receptores de esta misma subfamilia, aunque con menor afinidad. Los ligandos pueden ser IGF1, IGF2 e insulina y sus análogos (Adams et al., 2000; Ward et al., 2013; Xu et al., 2018).

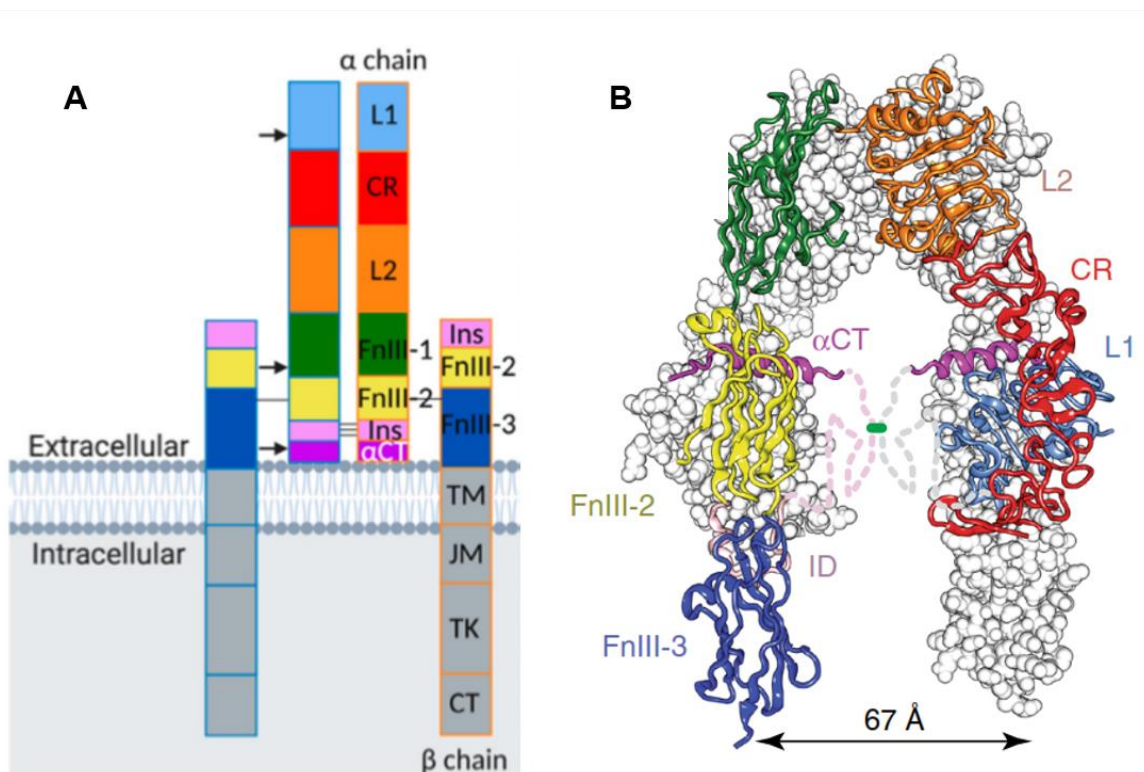


Figura 1-9: Estructura del receptor de factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF1R). **A)** Organización de los diferentes dominios de IGF1R clasificados en código de colores. **B)** Estructura 3D en forma de cinta del receptor IGF1R. Imágenes tomadas de (Blyth et al., 2020; Xu et al., 2018).

El receptor IGF1R posee cuatro sitios de unión al ligando, localizados en el ectodominio del receptor y a diferencia del receptor IR en donde el sitio 1 unión, se encuentra formado por los dominios L1 y CR de un protómero de IGF1R, el α -CT y dominio FnIII-1 del protómero adyacente (Xu et al., 2018; Li et al., 2019). Por otra parte, se conoce que el

receptor IGF1R posee un segundo sitio de unión, el cual ejerce su acción a través de un mecanismo de ajuste inducido, el cual no se ha determinado (Xu et al., 2018; Li et al., 2019; Turvey et al., 2022). Más, sin embargo, el sitio 1 de unión es de mayor afinidad que el sitio 2 (figura 1-10) (Shooter et al., 1996; Xu et al., 2018).

Análogo a lo observado con el receptor IR, la unión del ligando a IGF1R presenta cooperatividad negativa (de Meyts, 1994; Xu et al., 2018). En relación con IGF1R, este interactúa con los ligandos insulina, IGF1 e IGF2 con valores IC₅₀ de 289, 0.89 y 6.68 nmol/L respectivamente, por lo que IGF1 posee mayor afinidad a este receptor (Sommerfeld et al., 2010). En la figura 1-10, se observan las modificaciones conformacionales, que sufre el receptor IGF1R interactuando en complejo con el ligando y a su vez, estas modificaciones se dan en el receptor IR, aunque los cambios conformacionales son diferentes entre el receptor IR e IGF1R, ya que IR presenta una activación mediada por las regiones intra-homodímericas lo que conduce una interacción entre los homodímeros, mientras que la activación de IGF1R se produce por la separación de sus homodímeros (Kavran et al., 2014; Lee et al., 2014).

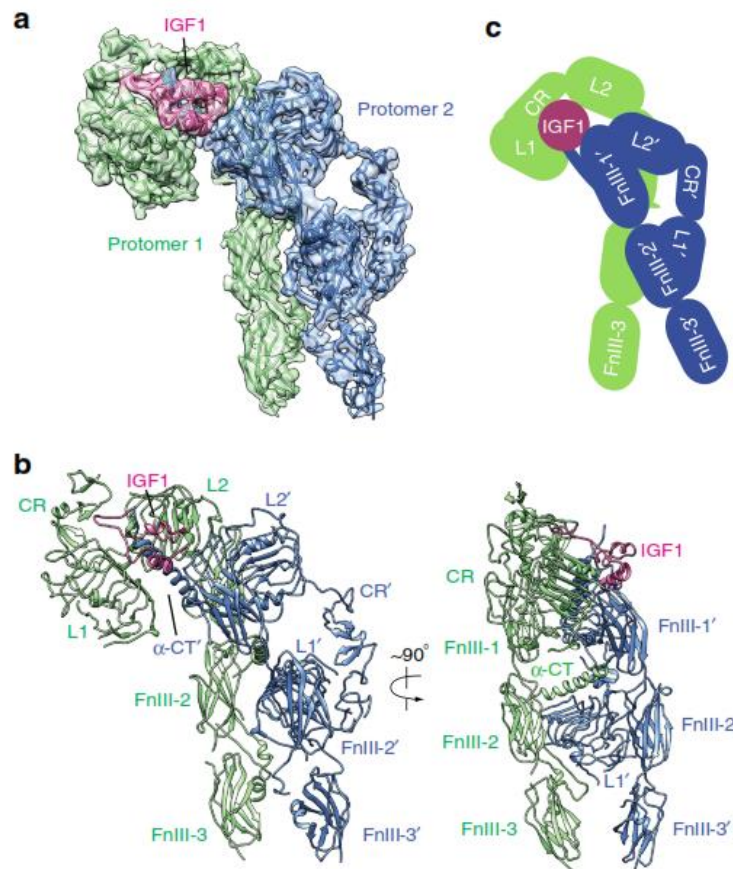


Figura 1-10: Estructura del ectodominio del receptor IGF1R en complejo con IGF1. **A)** Reconstrucción espacial en 3D de la unión de IGF1 en el sitio 1 del ectodominio de IGF1R, el receptor IGF1R fue generado por la técnica de microscopía electrónica criogénica de partícula única (Cryo-EM), los dímeros del receptor se encuentra representado de color verde y azul. **B)** Interacción espacial del ligando entre los dímeros del receptor. **C)** Esquematación del cambio conformacional mediado por IGF1 sobre el receptor (activación). Imagen tomada de (Li et al., 2019).

IGF1 es un péptido de 70 aminoácidos compuesto por una cadena única de aminoácidos estabilizada por tres puentes disulfuro, y es sintetizado en su mayoría en el hígado. IGF1 comparte un 48% de identidad con la insulina (Annunziata et al., 2011). IGF2 también es sintetizado por el hígado y posee una estructura tridimensional similar a IGF1, pero este tiene 67 aminoácidos, por lo que su porcentaje de identidad respecto a la insulina es menor que el reportado para IGF1 (de Pagter-Holthuizen et al., 1986). La principal diferencia

estructural entre los IGF e insulina es que los IGF conservan el péptido C mientras que la insulina, pierde dicho fragmento durante el procesamiento proteolítico involucrado en la maduración (Annunziata et al., 2011).

Receptor híbrido (IR/IGF-1R)

Como se dijo más arriba, las células también expresan receptores híbridos, los cuales están constituidos por dos protómeros uno del receptor IR (dímero $\alpha\beta$) y uno de IGF1R (dímero $\alpha\beta$). Por lo tanto, se expresan los receptores híbridos funcionales del tipo IRA/IGF1R o IRB/IGF1R (figura 1-11) (Soos et al., 1990, 1993; Yamaguchi et al., 1993). Estos receptores híbridos promueven en su mayoría señales mitogénicas inducidas principalmente por IGF1 (Belfiore et al., 2009; Soos et al., 1993), aunque se ha evidenciado que insulina y sus análogos, incluyendo la insulina glargina, interactúan con los dos tipos de receptores híbridos dimerizados con valores EC50 de 18.0+/-8.54 nM para IRA/IGF1R y 7.6+/-2.99 nM para IRB/IGF1R, siendo este último, el que desencadena principalmente la activación de rutas mitogénicas (Federici et al., 1999; Pierre-Eugene et al., 2012; Slaaby, 2015; Slaaby et al., 2006).

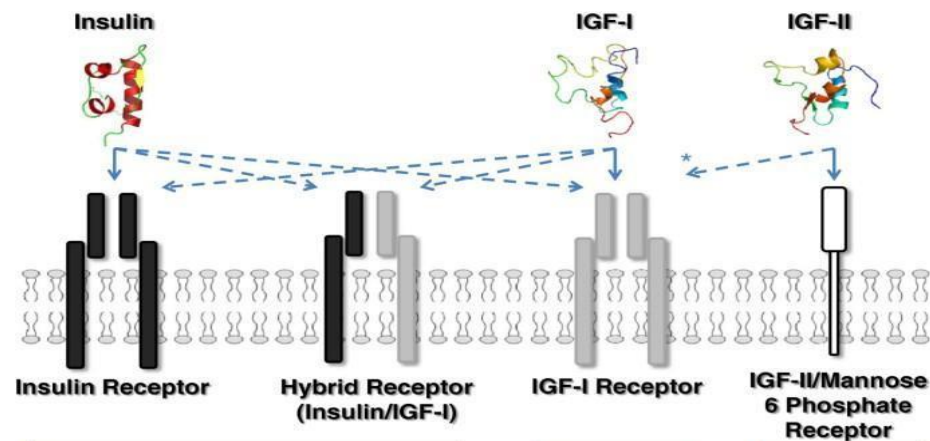


Figura 1-11: Esquema de interacción ligando-receptor para distintos miembros de la familia de receptores Tirosina quinasa (TRKs). Imagen tomada de (Puche & Castilla-Cortázar, 2012).

Los receptores híbridos IR/IGF1R han sido identificados en músculo esquelético, corazón, arteria coronaria, endotelio, tejido adiposo, fibroblastos, bazo, glóbulos rojos, glóbulos blancos y placenta (Chisalita & Arnqvist, 2005; Dekker Nitert et al., 2005; Pierre-Eugene et al., 2012). Se ha sugerido que estos receptores se expresan de manera variable en células malignas, donde la insulina actúa como un factor de proliferación, pero los antecedentes biológicos de la célula maligna también deben influir en la respuesta de crecimiento general mediada por la insulina, u otros factores (Dekker Nitert et al., 2005; Sciacca et al., 2014; Vigneri et al., 2020).

La formación de los receptores híbridos es posible, debido a que los ectodominios de IR e IGF1R comparten un porcentaje de identidad del 57%, lo cual permite que estos receptores puedan interactuar entre sí e incluso entre dímeros unidos por enlaces covalentes (puentes disulfuro), y de esta manera, comparte dominios característicos de IR e IGF1R (Kim & Accili, 2002; J. Whittaker & Whittaker, 2005; Malaguarnera & Belfiore, 2011).

El dominio tirosina quinasa (TK) intracelular es la región o dominio más conservado en IR e IGF-IR, mostrando aproximadamente un 84% de similitud a nivel de la secuencia de aminoácidos, mientras que la región estructural y funcionalmente más divergente entre los dos receptores es la región C-terminal de las subunidades β intracelulares (de Meyts, 2004; Denley et al., 2005; Malaguarnera & Belfiore, 2011). La figura 1-12 muestra lo que sería la conformación espacial del receptor híbrido IR/IGF1R. La existencia de estos receptores híbridos ha sido mostrada mediante técnicas de Western blot (Benyoucef et al., 2007; Pandini et al., 2002) e inmunofluorescencia (Blanquart et al., 2008).

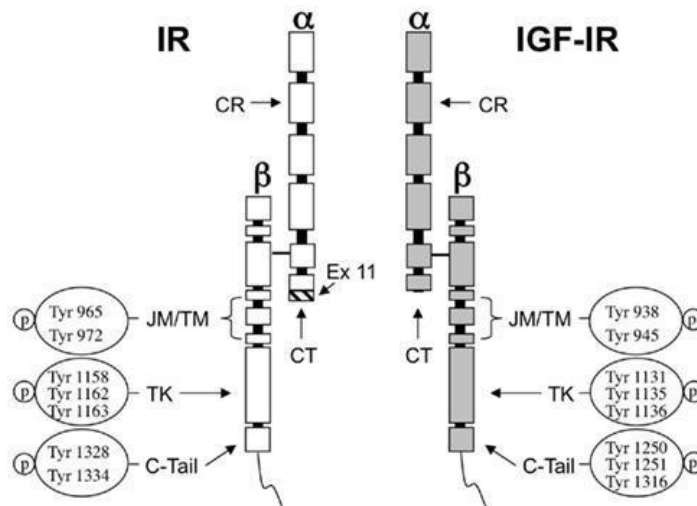


Figura 1-12: Esquema de la organización espacial del receptor híbrido IR/IGF1R. Imagen tomada de (Malaguarnera & Belfiore, 2011).

A la fecha no se conoce la estructura 3D del ectodominio completo de los receptores híbridos IR/IGF1R; solo se ha cristalizado una porción muy parcial de este, el cual contempla los dominios de L1-CR de IR y α CT de IGF1R (4XSS) (Menting et al., 2015). Por lo que este trabajo presenta un primer intento en proponer una estructura 3D hipotética para este complejo.

1.6 Modelamiento por homología

El modelamiento por homología y/o modelado comparativo de proteínas es una técnica que permite predecir la estructura 3D de una proteína que se desconoce, partiendo de una secuencia de aminoácidos conocida (Baker & Sali, 2001; Waterhouse et al., 2018). De tal manera, el modelado por homología se basa en dos observaciones. 1) La estructura tridimensional de las proteínas viene determinada en particular por su secuencia de aminoácidos y 2) la estructura 3D de las proteínas está más conservada y el cambio se produce a un ritmo mucho más lento en relación con la secuencia durante la evolución. Como resultado, secuencias similares se pliegan en estructuras idénticas e incluso secuencias con poca relación adoptan estructuras 3D similares (Fiser, 2010; Muhammed & Aki-Yalcin, 2019). Hoy por hoy, existen diferentes herramientas informáticas que utilizan servidores web para automatizar el modelamiento por homología, reduciendo el gasto computacional. Entre los servidores disponibles están, SWISS-MODEL, I-TASSER, MODELLER, FAMS, y otros (Fernandez-Fuentes et al., 2007; Fiser, 2010). Cada uno de los servidores, poseen como característica la automatización del proceso, el cual se basa en diferentes etapas (Figura 1-13) (Muhammed & Aki-Yalcin, 2019; Werner et al., 2012).

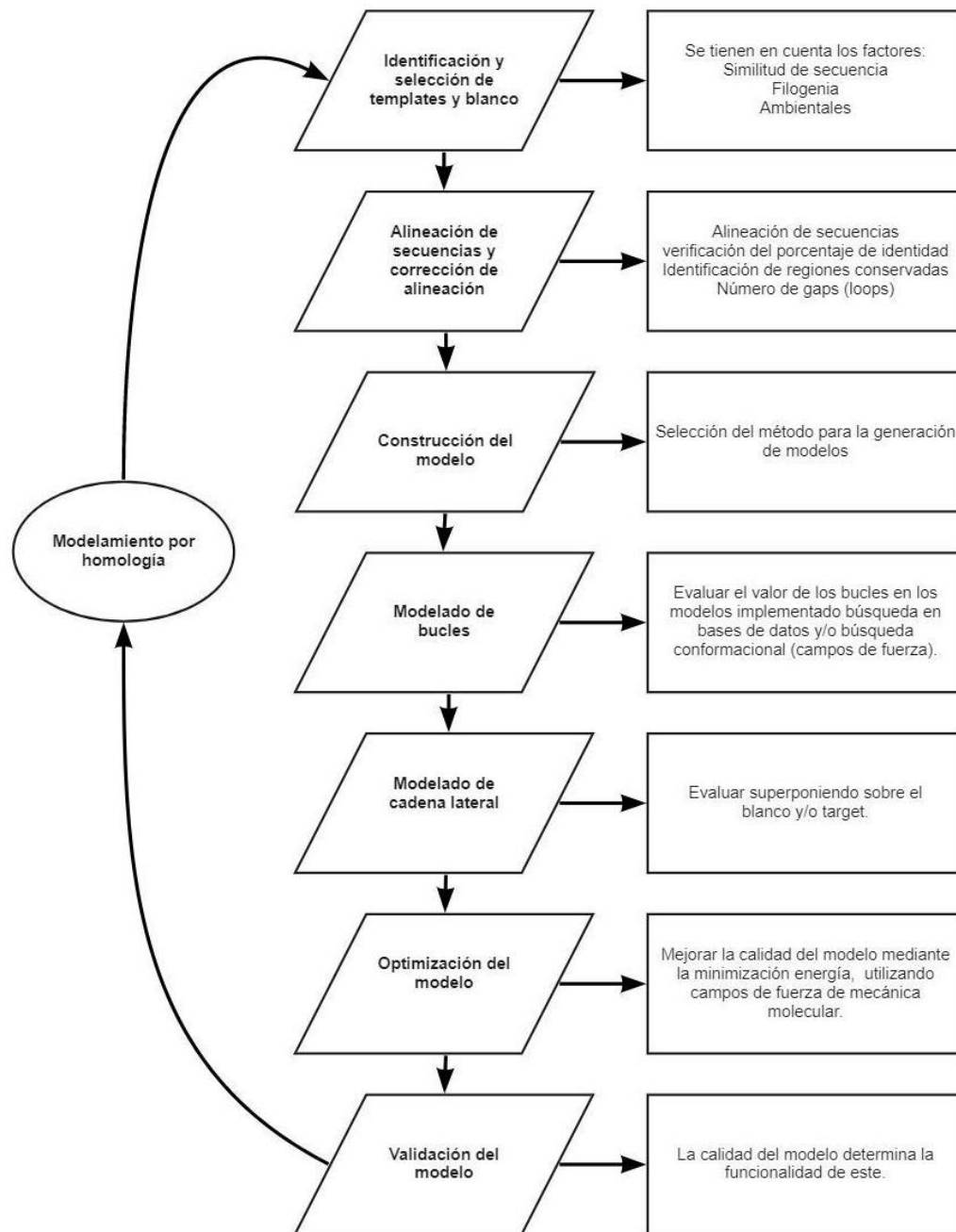


Figura 1-13: Automatización para el desarrollo del modelamiento por homología. Imagen tomada de (Haddadid et al., 2020; Muhammed & Aki-Yalcin, 2019; Waterhouse et al., 2018).

El reto más importante de esta metodología es refinar los modelos para que se parezcan

más a la estructura nativa de las proteínas blanco que a la de sus moldes iniciales (Vega Castro & Reyes, 2020). Así mismo, con un modelo de buena calidad generado se puede determinar la interacción con compuestos presentes en librerías de ligandos o compuestos activos y, de esta manera, ser útil en el diseño de fármacos basados en estructura (Prieto Martínez et al., 2018; Roy & Zhang, 2012). Existen varias formas de realizar la evaluación de calidad, entre las cuales se cuentan herramientas estadísticas como el Z-score o topológicas como el diagrama de Ramachandran, entre otras (Fischer, 2006; Muhammed & Aki-Yalcin, 2019; Saxenda et al., 2013; Vega Castro & Reyes, 2020; Waterhouse et al., 2018; Zhang & Sonic, 1998).

1.7 Acoplamiento molecular

El *docking* molecular o acoplamiento molecular es una herramienta de simulación computacional que tiene en tres objetivos principales: predicción, detección virtual y estimación de la afinidad de unión; este último objetivo predice energías y modos de enlace entre ligandos y proteínas (Guedes et al., 2014; Ferreira et al., 2015). Existen dos tipos de Acoplamiento molecular: proteína–ligando, y proteína–proteína. Los métodos de acoplamiento, se basan en tres estrategias que consideran la flexibilidad de las moléculas interactuantes: 1) La proteína se considera rígida y el ligando se considera rígido y no se contemplan los grados de libertad internos; 2) La proteína se considera rígida y se exploran todos los grados de libertad del ligando (traslacional, rotacional y conformacional); 3) la proteína se considera total o parcialmente flexible, y también se estudian todos los grados de libertad del ligando (Chen et al., 2020; Ferreira et al., 2015; Guedes et al., 2014). Las interacciones proteína–ligando o proteína–proteína se miden con campos de fuerza, mediante atracciones electrostáticas y fuerzas débiles como las de Lennard-Jones y Van

der Waals, determinadas mediante las ecuaciones de Coulomb (Pagadala et al., 2017) (figura 1-15).

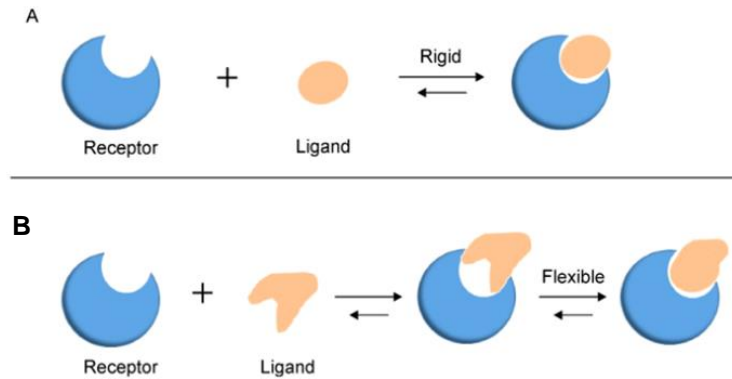


Figura 1-14: Esquema general de los métodos de interacción del acoplamiento molecular. **A)** *Docking* rígido proteína-ligando. **B)** *Docking* flexible proteína-ligando. Imagen tomada de (Fan et al., 2019).

1.7.1 Acoplamiento proteína-proteína

La interacción entre las biomoléculas es fundamental y de gran importancia debido a que se dan con frecuencia procesos en los sistemas vivos; ejemplos son la de receptores, la activación de enzimas, el transporte de nutrientes y otros (Marsh & Teichmann, 2015; Nooren & Thornton, 2003). Bastard et al. (2011) menciona que se deben explorar al menos seis grados de libertad, tres traslacionales y tres rotacionales, del complejo proteína-proteína, los cuales permiten una optimización de la función de puntaje para clasificar las predicciones.

1.7.2 Puntaje de las predicciones

Durante el proceso de Acoplamiento, según el algoritmo de búsqueda, se presenta un gran número de conformaciones de ligandos, por lo que el puntaje de las predicciones nos

permite evaluar la calidad de los acoplamientos relevantes; así mismo, permite comparar las predicciones y/o acoplamientos reportados de manera experimental, asociándolos con valores de energía libre de unión de todas las poses y formando un paisaje (Guedes et al., 2014; Leis & Zacharias, 2011). Adicionalmente, las funciones de evaluación (scoring functions) permiten clasificar apropiadamente los ligandos (*Virtual screening*) y permite la predicción de las constantes de afinidad (Kd) (Guedes et al., 2014). Estas predicciones se realizan mediante la evaluación de los fenómenos fisicoquímicos más importantes involucrados en la unión ligando-receptor, incluidas las interacciones intermoleculares, la solvatación y los efectos entrópicos (Jain, 2006).

Una función de puntaje óptima (E) debería tener características similares a lo dispuesto en la siguiente ecuación:

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

Donde:

- $\omega_0 E_{int}$: 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.

1.7.3 Refinado del acoplamiento

El refinamiento del docking se realiza con el fin de obtener una caracterización más confiable de los valores de energía libre de unión de las predicciones seleccionadas en el

software, ya que frecuentemente se generan sesgos en el puntaje, produciendo modelos de falso positivo. El refinamiento puede tener varias estrategias, tales como: incrementar la resolución, contabilizar los cambios conformacionales de la cadena lateral y la solvatación explícita. La etapa de refinamiento se realiza para lograr un acuerdo con la geometría nativa y para reconocer soluciones de acoplamiento casi nativas (Agrawal et al., 2019; Siebenmorgen & Zacharias, 2020; Yuriev & Ramsland, 2013).

1.7.4 Evaluación de los métodos de acoplamiento molecular

Para el año 2017 en su sexto informe, la comunidad de científicos CAPRI (*Critical Assessment of Predicted Interactions*), la cual funciona desde junio del 2001 (Janin et al., 2003; Bonvin & CAPRI, 2021). Evaluó el rendimiento de los métodos para predecir el comportamiento de las estructuras proteicas, partiendo de estructuras obtenidas por técnicas de cristalografía de rayos-X y por resonancia magnética nuclear, las cuales se encuentran reportadas en bases de datos (Lensink et al., 2017). Los objetivos de este informe fueron identificar y evaluar las predicciones proteína-proteína, proteína-péptido y la predicción de interacciones mediante puentes hidrógeno en la superficie del ligando-receptor; así mismo, evaluar el desempeño de los programas implementados en el desarrollo de este informe (Lensink et al., 2017). Los resultados se pueden ver en la tabla 1-3.

Tabla 1-3: Evaluación de desempeño de los servidores en línea utilizados para docking proteína-proteína en el informe CAPRI sexta edición.

Docking server performance ranking	
ClusPro	5/2**
LzerD	3/1***/1
Swarmdock; Haddock	2**
PyDockWeb	2/1**
GalaxyPPDock	1**
Gramm-x; PatchDock-FiberDock; Dock/PIERR	1

Medium quality *Hiigh quality

Tabla tomada de (Lensink et al., 2017).

La evaluación de desempeño planteada por CAPRI, indicó que todos los servidores, generaron al menos un modelo de calidad aceptable o mejor. ClusPro se acercó a un nivel de buen desempeño de los grupos de predictores, con cinco modelos aceptables, incluidos dos de calidad media. Además, LzerD arrojó con tres buenos modelos, y uno de calidad aceptable (Lensink et al., 2017).

1.7.5 Servidores en línea más utilizados para la realización de acoplamiento.

ClusPro

ClusPro es un servidor web (<https://cluspro.org>) ampliamente utilizado para el acoplamiento proteína-proteína, este fue desarrollado por los grupos VajdaLab y ABC Group, pertenecientes a la Universidad de Boston y la Universidad *Stony Brook*, respectivamente (Comeau et al., 2004a, 2004b). Este servidor se encuentra parametrizado para realizar el acoplamiento en tres pasos: 1) docking de cuerpo rígido mediante el muestreo de miles o millones de conformaciones, 2) clúster de estructuras, basados en el RMSD de las 1000 estructuras de energía más bajas y 3) refinamiento de estructuras, usando minimización de energía (Kozakov et al., 2017).

Esta herramienta bioinformática implementa dentro de su matriz el algoritmo PIPPER (Kozakov et al., 2006), el cual tiene un enfoque de correlación basado en la transformada rápida de Fourier; en este método una de las proteínas se dispone como una estructura rígida, dentro del sistema de coordenadas y una segunda proteína se coloca en una cuadrícula móvil y la energía de interacción se escribe en forma de una función de correlación (Kozakov et al., 2017). De tal manera, que introduce funciones de puntuación más complejas y precisas, en donde se incluyen interacciones electrostáticas o contribuciones tanto electrostáticas como de solvatación (Chen & Weng, 2002; Mandell et al., 2001). Los resultados son evaluados y segmentados en cuatro categorías diferentes de interacción molecular: 1) balanceado, 2) favorecido electrostáticamente, 3) favorecido

Hidrofobicamente, 4) fuerzas electrostáticas y de van der Waals (vdW+Elec) y por último enviados vía correo electrónico (Kozakov et al., 2017).

LzerD

El programa LzerD (Local 3D Zernike Descriptor-based protein docking program) se encuentra disponible en el sitio web del laboratorio Kihara, en el enlace: <http://www.kiharalab.org/proteindocking>. Esta herramienta otorga la posibilidad de ser trabajada directamente en el sitio web o descargada para ser ejecutada en el ordenador (Esquivel-Rodriguez et al., 2014). Al igual que la herramienta ClusPro, se requiere dos archivos en formato PDB, donde uno regirá como receptor y el otro como ligando.

El acoplamiento proteína-proteína, se realiza en tres pasos: 1) acoplamiento de cuerpo rígido, partiendo de las estructuras proteicas en formato PDB cargadas en la plataforma, estas entradas crean decenas de miles de conformaciones de acoplamiento, 2) los modelos generados se agruparán con un límite de clúster definido por el usuario donde el valor predeterminado de RMSD es 4 Angstroms (Å), por lo que se reducirán los modelos de generados, 3) Los modelos restantes se clasifican teniendo en cuenta la suma de tres descriptores generados por el servidor, descriptores se denominan 3D Zernike (3DZD). Estas funciones de puntuación verifican las interacciones atómicas en un modelo, teniendo en cuenta la distancia y ángulos similares a los observados en estructuras proteicas ya determinadas experimentalmente (Christoffer et al., 2021; Esquivel-Rodriguez et al., 2014; Venkatraman et al., 2009). Este servidor utiliza el algoritmo hashing geométrico, permitiéndole realizar la respectiva exploración conformacional de las predicciones obtenidas, así mismo permite realizar la búsqueda exhaustiva de restricciones de distancia

entre residuos, descartando los modelos que no cumplan la información suministrada en la interfaz (Christoffer et al., 2021; Esquivel-Rodriguez et al., 2014).

HADDOCK

El servidor HADDOCK (*High Ambiguity Driven biomolecular DOCKing*) se considera la herramienta bioinformática pionera en el acoplamiento integrativo (Domínguez et al., 2003). El cual permite el acoplamiento de proteínas, moléculas pequeñas, ácidos nucleicos, péptidos, péptidos cíclicos, glicanos y proteínas glicosiladas (Honorato et al., 2021). Este servidor utiliza cálculos de acoplamiento, basados en restricciones de interacción ambigua (AIR), con el fin de reducir el espacio de la búsqueda conformacional. Las restricciones se derivan de datos de interacción bioquímicos y/o biofísicos, en los que se encuentran el desplazamiento químico, datos de experimentos de titulación de RMN, datos de mutagénesis o de predicciones (Domínguez et al., 2003; Saponaro et al., 2020).

Los AIR se clasifican en dos categorías: Residuos activos y pasivos. Donde los residuos activos se definen como los residuos expuestos al solvente directamente involucrados en la interacción proteína-proteína y los residuos pasivos, se caracterizan por ser los expuestos al solvente que están próximos a los residuos activos (Saponaro et al., 2020).

El acoplamiento proteína-proteína, parte del cargue de dos archivos en formato PDB, que corresponde a las estructuras del receptor y del ligando; la predicción de conformaciones se realiza en tres pasos: 1) Se genera una minimización de energía de la molécula rígida, 2) Refinamiento semiflexible por *simulated annealing* (recocido simulado) en el espacio de torsión, 3) refinamiento de solvatación (Domínguez et al., 2003; Koukos et al., 2018;

Saponaro et al., 2020). Durante el proceso, se optimizan los cambios generados sobre las estructuras y al mismo tiempo producen una mejora energética de la interfaz, por lo que las estructuras finales se agrupan utilizando el RMSD, teniendo en cuenta la interacción promedio (suma de E_{elec} , E_{vdw} , E_{AIR}) y su área media de superficie (Dominguez et al., 2003; Koukos et al., 2018).

2. Materiales y métodos

Materiales

Equipos y software:

Este estudio se llevó a cabo en un equipo tipo laptop con la siguiente configuración:

Computador hp Intel(R) Core (TM) i7-7500 de séptima generación, CPU @ 2.70 GHz, GPU NVIDIA GeForce 940MX, RAM 8GB y sistema operativo Windows10 x64 Byte.

Servidores Online utilizados:

En este trabajo se utilizaron los siguientes servidores online, todos los cuales son de acceso libre.

- **CLUSPRO**

URL: <https://cluspro.bu.edu/login.php>

Desarrolladores: Boston University and Stony Brook University
Gratuito (Comeau et al., 2004b, 2004a).

- **EMBOSS Water**

URL: https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_water/

Desarrolladores: European Molecular Biology Laboratory ([EMBL](#)-EBI).
Gratuito (T. F. Smith & Waterman, 1981).

- **HADDOCK**

URL: <https://wenmr.science.uu.nl/haddock2.4/>

Desarrolladores: Duke University
Gratuito (Dominguez et al., 2003).

- **LzerD**

URL: <https://kiharalab.org/proteindocking/lzerd.php>

Desarrolladores: KIHARA Bioinformatics LABORATORY.
Gratuito (Esquivel-Rodriguez et al., 2014).

- **MOLPROBITY**

URL: <http://molprobity.biochem.duke.edu/>

Desarrolladores: Duke University.
Gratuito (Williams et al., 2018).

- **PRODIGY**

URL: <https://bianca.science.uu.nl/prodigy/>

Desarrolladores: Computational Structural Biology group – Utrecht Universit.
Gratuito (Xue et al., 2016).

- **SWISS – MODEL**

URL: <https://swissmodel.expasy.org/>

Desarrolladores: Swiss Institute of Bioinformatics/ Biozentrum.
Gratuito (Waterhouse et al., 2018).

Softwares utilizados:

En este trabajo se utilizaron los siguientes software de acceso libre, excepto Pymol y Maestro, los que se usaron bajo licencia académica.

- **DISCOVERY STUDIO® VISUALIZER**

URL: <https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download>

Desarrolladores: Dassault Systèmes

Descarga gratuita.

(BIOVIA, Dassault Systèmes, Discovery Studio®, V21.1.0.20298, San Diego: Dassault Systèmes, 2023).

- **MAESTRO, Version 13.1**

URL: <https://www.schrodinger.com/products/maestro>

Desarrolladores: Schrödinger

Licencia Académica.

(Schrödinger Release 2022-1: Maestro, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2023).

- **PYMOL Molecular Graphics System, Version 2.0**

URL: <https://www.pymol.org/>

Desarrolladores: Schrödinger

Licencia Académica

(The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC).

Métodos

2.1 Selección de las secuencia de aminoácidos y verificación del porcentaje de identidad

Se descargaron las secuencias en formato FASTA de las proteínas IR (P06213) e IGF1R (P08069) seleccionadas en la base de datos *uniprot*. Se realizó una verificación del

porcentaje de identidad para confirmar que las secuencias tengan un porcentaje de identidad >25 % (Ma et al., 2002 Rice et al., 2000), lo que se hizo mediante la suite *The European molecular biology open software suite* (EMBOSS), módulo water, en el siguiente enlace https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_water/.

2.2 Modelado por homología

Modelado del receptor híbrido IR/IGF1R libre y en complejo con glargina

Para realizar el modelamiento por homología se utilizó el servidor *Swiss Model* (Waterhouse et al., 2018).

En este caso del modelado del **receptor híbrido libre** (**Apo receptor** o receptor sin ligando unido), el servidor se alimentó con las siguientes secuencias de aminoácidos (Anexo 1)

- *Target*: secuencia del ectodominio del receptor IR (1327 aa)
- *Hetero target*: IGF1R (1337 aa)

Como molde (*template*) el servidor se alimentó con el modelo del receptor IGF1R en complejo con glargina, cuya estructura 3D fue recientemente propuesta por nuestro grupo (González-Beltrán & Gómez-Alegría, 2021).

Para modelar el **receptor híbrido en complejo con glargina** (**Holo receptor**), se alimentó el servidor Swiss Model con las siguientes secuencias (ver secuencias en Anexo 2)

- *Target*: secuencia proglargina (71 aa)
- *Hetero-target*: secuencia del ectodominio del receptor IR (1327 aa)

- *Hetero-target*: secuencia del ectodominio del receptor IGF1R (1337 aa)

En este caso, se usó como *template* la estructura del modelo del receptor IGF1R en complejo con glargina (González-Beltrán & Gómez-Alegría, 2021). También se utilizó la secuencia de aminoácidos de Glargina a la cual se le adicionaron 21 aminoácidos correspondientes al péptido C del precursor proinsulina (de 71 aa). La inclusión de estos 21 aminoácidos fue necesaria porque todo intento de modelado utilizando solo la secuencia de glargina resultaba en modelos incompletos que carecían de la cadena A de este análogo. Es importante aclarar, sin embargo, que en todos los modelos mostrados en este trabajo, estos 21 aminoácidos del péptido C fueron retirados.

El modelado por homología es más preciso cuando hay disponible una plantilla homóloga cercana con una identidad mayor o igual al 50% (Larsson et al., 2008; Moulton, 2005), mientras que otras técnicas de modelamiento como el *threading* se utilizan cuando las secuencias no superan el 30-40% de identidad. Así, la técnica de *threading* es más susceptible a generar modelos de menor calidad y limitaciones a nivel estructural (Larsson et al., 2008; Moulton, 2005). En nuestro caso, las secuencias de interés presentan un 53% de identidad, razón por la cual se escogió el modelamiento por homología. Sin embargo, no ignoramos que el modelado por homología presenta importantes limitaciones como la predicción de la disposición espacial de loops y a su vez, la disposición espacial de las cadenas laterales (*sidechains*) de los modelos obtenidos (Bordoli et al., 2009).

La figura 2-1 muestra un esquema general del procedimiento seguido para realizar los modelamientos mediante el servidor Swiss-model.

Los modelos seleccionados del complejo receptor híbrido libre o en complejo con glargina fueron refinados mediante la eliminación de secuencias de aminoácidos presentes en regiones que en bases de datos aparecen descritas como desordenadas.

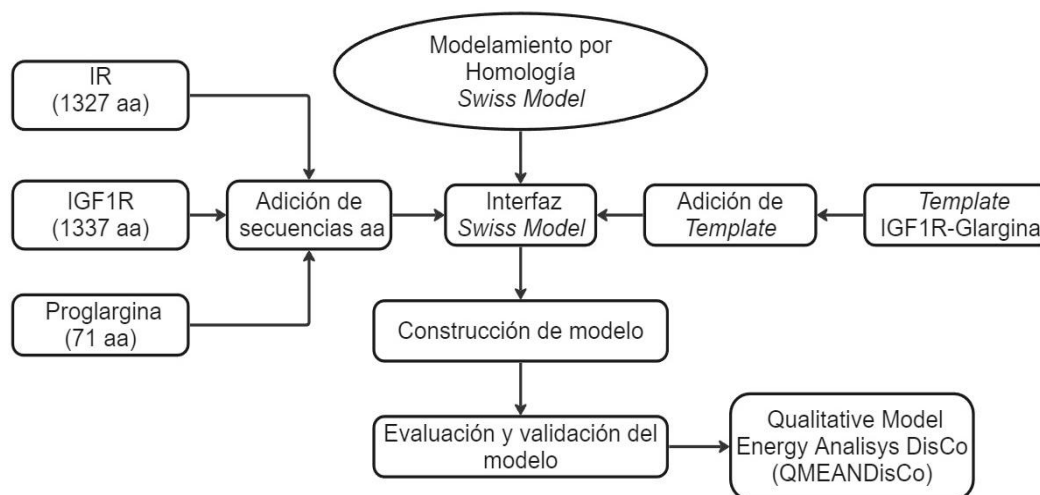


Figura 2-1: Esquema general del procedimiento seguido para el modelamiento por homología del receptor híbrido en complejo con glargina imagen diseñada por el autor del presente trabajo.

2.3 Evaluación de la calidad estructural de los modelos obtenidos por homología

Con el fin de obtener las mejores estructuras posibles, en primera instancia se contemplaron como estimadores de la calidad de los modelos obtenidos por homología los parámetros *Global Model Quality Estimate (GMQE)* (Benkert et al., 2009) y *Qualitative Model Energy Analysis DisCo (QMEANDisCo)* (Studer et al., 2019) que entrega el servidor *Swiss Model*. Además de lo anterior, la calidad estructural global y local de los modelos obtenidos se evaluó con la herramienta MolProbity (Williams et al., 2018). Esta herramienta realiza el análisis partiendo de la adición de átomos de hidrógeno, el análisis de contactos

entre todos los átomos y por último un análisis geométrico. La adición de hidrógenos brinda la visión más confiable del efecto estérico y los enlaces de hidrógeno permiten el análisis geométrico, identificando posibles valores atípicos de Ramachandran y/o rotámeros que pueden marcar conformaciones inusuales en el esqueleto polipeptídico (*backbone*) o en las cadenas laterales (*sidechains*). Debido a esto, fue de suma importancia diagnosticar y corregir este tipo de errores en los modelos obtenidos.

La evaluación de los modelos se basó en un análisis estereoquímico, considerando como eje principal los ángulos diedros psi y phi proporcionados por el diagrama de Ramachandran y el puntaje Z-score (L. I. Zhang & Skolnick, 1998). El Z-score es un parámetro que se relaciona con la capacidad de tener un plegamiento nativo de la cadena peptídica, y un resultado óptimo debe ser ≤ 2 . Por otra parte, se implementó un análisis de la geometría de los modelos evaluando los rotámeros y la desviación del C β (Williams et al., 2018).

2.4 Acoplamiento

El modelo del receptor híbrido libre (Apo-receptor) obtenido mediante modelado por homología y refinado, fue empleado para generar nuevos modelos del receptor híbrido IR/IGF1R en complejo con glargina. El acoplamiento molecular fue dirigido al sitio 1 de unión de cada protómero del receptor híbrido IR/IGF1R. Como ligando, se utilizó la estructura tridimensional (3D) en formato PDB de Glargina (5VIZ) reportada en el *protein data bank* (PDB) (Reyes, 2017). El acoplamiento proteína-proteína se realizó en los servidores ClusPro, LzerD y Haddock los cuales son más eficientes según la comunidad de expertos CAPRI (Lensink et al., 2017). Para la aplicación de esta metodología, y con el

fin de preparar la estructura del receptor híbrido IR/IGF1R, se realizó una asignación de átomos, átomos de hidrógeno, enlaces faltantes por distancia y cargas formales, del mismo modo se procedió a eliminar posibles moléculas de agua y iones presentes, con el fin de mejorar la calidad y precisión de las coordenadas de partida. A continuación, se describe la metodología seguida para el análisis en cada servidor:

ClusPro:

En la interfaz del servidor, se procedió a cargar como *input* los archivos en formato PDB del modelo hipotético del receptor híbrido IR/IGF1R previamente preparado y el ligando glargina (5VIZ) (Reyes, 2017) por separado. El análisis se realizó implementando un acoplamiento dirigido, por lo que se hicieron las anotaciones de atracción y de restricción de residuos involucrados en la interacción del sitio 1 por cada protómero del receptor híbrido IR/IGF1R, descritos en la sección 2.2.6. Los resultados obtenidos fueron evaluados y segmentados por la categoría balanceado, ya que este contempla el menor coeficiente de ponderación, nos permite evaluar una aproximación del modelo esperado, más sin embargo, se debe complementar su análisis con una verificación visual (Kozakov et al., 2017).

LzerD:

Para esta plataforma, el acoplamiento proteína-proteína, se realizó en tres pasos: (1) Se cargan como *input* los archivos en formato PDB del modelo hipotético de receptor híbrido IR/IGF1R previamente preparado y del ligando glargina (5VIZ) (Reyes, 2017) por separado. Como restricciones se colocaron los aminoácidos que son parte del sitio 1 de unión de los respectivos receptores IR e IGF1R, descritos previamente (sección 2.2.6). (2) Se adicionan los parámetros *Clustering Cutoff* (Å) de 4.0 y *Surface Reduction Cutoff* de $1e^{-3}$. Por último, el servidor genera los resultados de los modelos agrupándolos por *clústers*,

los que se evaluaron mediante el descriptor ITScore, que es una puntuación general de los resultados obtenidos por el servidor.

HADDOCK:

En la interfaz del servidor, se cargan en formato PDB el modelo hipotético del receptor híbrido IR/IGF1R y el ligando glargina (5VIZ) (Reyes, 2017). A su vez, se cargaron los datos de las atracciones aminoácidos-aminoácido y restricciones aminoácido-aminoácidos que se presentan en el sitio 1 de unión de los respectivos receptores IR e IGF1R, mencionados en la sección 2.2.6. Los resultados generados se recopilan en clúster de 4 estructuras, donde se agrupan utilizando el valor RMSD, teniendo en cuenta la interacción promedio (suma de E_{elec} , E_{vdw} , E_{AIR}) y su área media de superficie. A su vez cada clúster se evalúa utilizando el *z-score*, el cual indica a cuántas desviaciones estándar de la media se sitúa este conglomerado en términos de puntuación, por ende, el clúster mejor clasificado siempre tendrá la puntuación *z* más negativa.

2.5 Criterios de selección de los modelos finales

Para la selección de los modelos finales receptor-ligando obtenidos por acoplamiento molecular, se aplicaron los siguientes criterios de selección:

1. Orientación (posicionamiento) del ligando en el receptor. Asumimos que la interacción glargina-receptor debe presentar una orientación similar a la que adquiere insulina en el sitio 1 de unión de los receptores IR e IGF1R (sección 1.5.1 del marco teórico).
2. Residuos interactuantes conservados tanto para el ligando como para el receptor (en este caso, los residuos descritos en el sitio 1 de unión de cada protómero (IR e IGF1R)).

En el caso del ligando glargina, se utilizaron los residuos conservados que participan en la interacción insulina-IR e insulina-IGF1R.

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

(Hua, 2010; Menting et al., 2013, 2014).

Para el receptor IGF1R (Interacción con el ligando IGF1):

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

Residuos del dominio CR: Phe241, Ile255, Ser260, Ser261, Glu264, Gly265, Phe266, Gln275, Glu276.

Residuos del dominio α CT: Phe701, Val702, Arg704.

(Whittaker et al., 2001; de Meyts & Whittaker, 2002; Whittaker et al., 2008; Xu et al., 2018; Li et al., 2019).

2.6 Afinidades teóricas de los complejos receptor-glargina

Las afinidades teóricas (Kd) de los modelos obtenidos (complejos glargina-receptor híbrido) fueron calculadas mediante el software *PROtein binDIng enerGY prediction* (*PRODIGY*) a una temperatura estándar de 25 °C, de acuerdo con la fórmula $\Delta G = RT(\ln K)$ (Vangone & Bonvin, 2015; Xue et al., 2016)

2.7 Visualización de estructuras

Las estructuras proteicas se visualizaron en el programa PyMol 2.5.2 edu (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.5.2 Schrödinger, LLC), Maestro, V. 13.1. y Discovery Studio® Visualizer (Accelrys Software Inc, 2007).

3. Resultados

3.1 Modelado por homología

Modelado del receptor híbrido libre (Apo-receptor)

Para proponer un modelo estructural 3D del receptor híbrido IR/IGF1R, primero se recurrió a la aproximación de modelamiento por homología utilizando el servidor *Swiss- model*. Para ello, el servidor se alimentó primero con las secuencias *target* y *heterotarget* descritas en la Tabla 3-1 y cuyas secuencias de aminoácidos se presentan en el Anexo 1, como se indicó en Materiales y métodos. Como *template* se evaluaron todas las opciones que sugirió el servidor, y se generaron varios modelos. Sin embargo, ninguno de estos modelos correspondía a un receptor híbrido IR/IGF1R. En vista de esto, se decidió emplear como *template* un modelo 3D correspondiente al complejo Glargina-IGF1R propuesto recientemente por nuestro grupo de investigación (González-Beltrán & Gómez-Alegría, 2021).

Tabla 3-1: Matriz de diseño del receptor híbrido modelado por homología.

Target ^a	Hetero target ^b	Template ^c	Resultado	Observaciones	QMEAN DisCo
IR (1327)	IGF1R (1337)	Glargina-IGF1R	Se obtiene modelo	Presenta estructura de receptor híbrido	0.66

^{a, b} Los valores en paréntesis representan el número de aminoácidos de la respectiva secuencia utilizada (Anexo 1).

^c complejo Glargina-IGF1R reportado por (González-Beltrán & Gómez-Alegría, 2021).

Usando dicho *template* se logró generar un modelo para el receptor híbrido IR/IGF1R libre (*Apo* receptor o receptor sin ligando unido), lo que se confirmó mediante revisión visual con *PyMOL*, donde se observan ambos protómeros (IR e IGF1R), por lo que efectivamente corresponde al receptor híbrido IR/IGF1R (Figura 3-1 A). Los parámetros de calidad entregados por el servidor *Swiss Model* para este modelo, *GMQE* y *QMEANDisCo*, fueron de 0.47 y 0.66 +/- 0.5 respectivamente. Esto indicó que el modelo no tenía muy buena calidad, por lo cual fue necesario refinarlo. El refinamiento consistió en eliminar regiones que en el modelo se ven estructuradas (aminoácidos 656-690;717-753 y 672-707;731-774) pero que en la base de datos UNIPROT se describen como regiones desordenadas debido a que no se encuentran bien resueltas en las estructuras 3D descritas para los receptores IR (6PXV) e IGF1R (6JK8). Por lo tanto, con *PyMOL* se eliminaron dichas secuencias de aminoácidos, lo que llevó a tener un modelo refinado que consta de 1591 aminoácidos totales, con 790 aminoácidos del protómero IR y 801 del protómero IGF1R. Este modelo refinado se presenta en la Figura 3-1 B.

Este modelo de receptor híbrido consiste únicamente de la porción extracelular del receptor (ectodominio) pues el molde o plantilla empleada correspondía sólo a dicha porción; esto explica la diferencia entre el número de aminoácidos introducidos a la plataforma de modelamiento (*input* de 2664 aminoácidos para IR e IGF1R) y el número de aminoácidos en el modelo de salida (1591 aminoácidos). La porción del ectodominio modelado abarca los dominios L1, CR, L2, FnIII-1, FnIII-2 y parte de FnIII-3 de IR, así como los dominios L1, CR, L2, FnIII-1, FnIII-2 y parte de FnIII-3 de IGF1R. El receptor presenta una conformación en forma de T (*T-shaped*), sugiriendo que el modelo podría corresponder a uno de los cuatro estados conformacionales descritos para esta subfamilia de receptores.

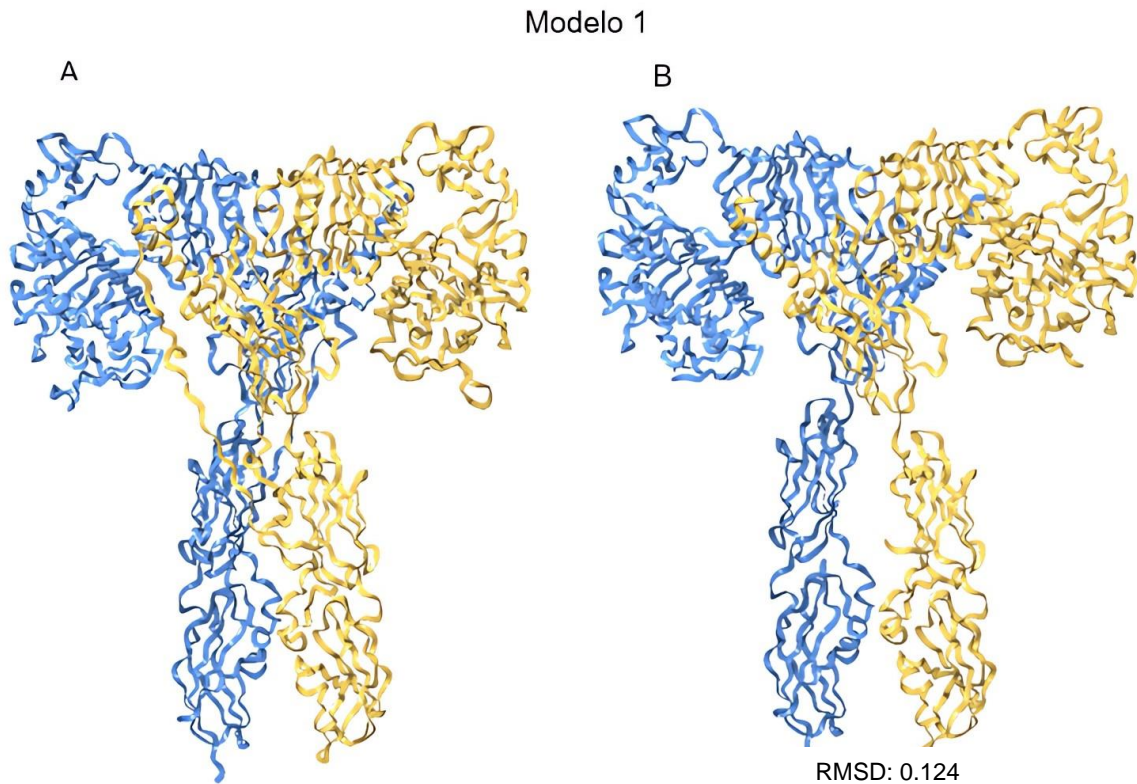


Figura 3-1: Modelo del ectodominio del receptor híbrido IR/IGF1R en ausencia de ligando. A) Modelo sin refinar. B) Modelo refinado. El modelo fue obtenido mediante modelamiento por homología utilizando el servidor *Swiss Model*. La estructura se representa en forma de cintas, con el protómero IR de color dorado y el protómero IGF1R de color azul.

La calidad del modelo refinado se evaluó a nivel local y global utilizando dos aproximaciones: (i) el módulo “*Structure Assessment*” del servidor *Swiss Model* y (ii) Molprobit. El módulo de *Swiss Model* mostró valores de calidad global y local como *QMEANDisCo* y *IDDT* que se muestran en la tabla 3-2.

Tabla 3-2: Parámetros de calidad, análisis geométrico y de torsión del modelo 1.

Evaluación	Modelo 1	%	Meta
N° aa	1591	-	-
QMEANDisCo	0.73+/- 0.5	-	-
IDDT	0.71	-	-
Z-Score	-1.99 +/- 0.18		Meta: abs (Z score) ≤ 2
Ramachandran valores atípicos	20	1.28%	Meta: ≤ 0.05%
Ramachandran valores Favorecidos	1432	91.50 %	Meta: ≥ 98%
Rotámeros pobres	6	0.42%	Meta: ≤ 0.3%
Rotámeros favorecidos	1387	89.59%	Meta: ≥ 98%
Cβ deviation > 0.25 Å	16	1.07%	Meta: 0

Los parámetros *QMEANDisCo* e *IDDT* muestran valores cercanos a 1, indicando que son valores aceptables. En cuanto al análisis realizado con MolProbity, se identificó que el gráfico de Ramachandran (Figura 3-2) muestra un 91.50% (1432/1565) de los residuos en regiones favorecidas (siendo la meta un 98%), mientras que 98.70% (1545/1565) de los residuos se encontraron en regiones permitidas (meta: >99.8%). Además de lo anterior, se hizo un análisis local que incluyó la evaluación de rotámeros con el fin de detectar posibles residuos que no cumplen con la calidad aceptable. El análisis geométrico y de torsión de

rotámeros mostró que 6 residuos (0.42%) tienen una configuración espacial atípica (Asn90, Thr524, Asp654, Leu841, Leu861 y Val924). Por último, las desviaciones del C β de 1.07%, muestran que no existe un error considerable en la geometría del modelo. De acuerdo con lo anterior, los análisis de calidad en general demuestran que la calidad del modelo es aceptable.

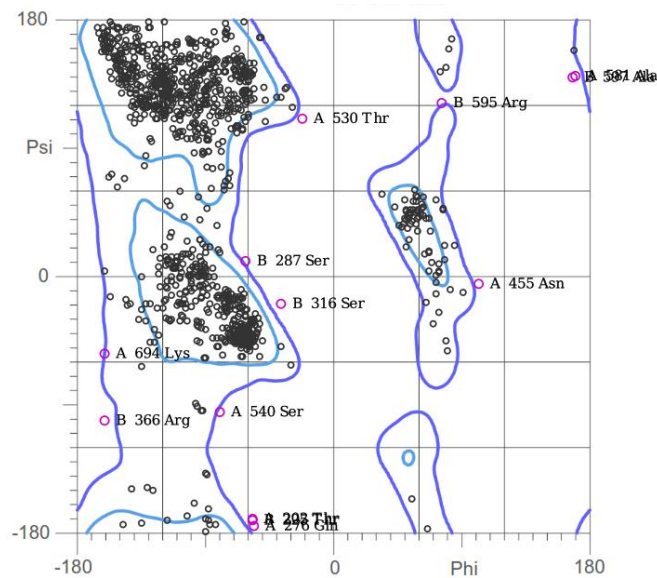


Figura 3-2: Gráfico Ramachandran del modelo. En azul claro se muestran las regiones favorecidas y en azul oscuro las regiones permitidas. Fuera de eso son regiones no permitidas. Gráfico Obtenido de *MolProbity*.

En resumen, de los resultados anteriores se logró obtener un modelo del receptor híbrido IR/IGF1R libre (Modelo 1).

Modelado del receptor híbrido con glargina (Holo-receptor)

Con el fin de explorar la posibilidad de tener un modelo con el ligando glargina unido al receptor, se decidió evaluar una secuencia *target* extra. Para ello, se utilizó la secuencia

“proglargina” descrita en metodología (Anexo 2). Para el modelamiento del receptor híbrido *IR/IGF1R* con glargina, se utilizaron las moléculas que se muestran en la Tabla 3-3.

Tabla 3-3: Matriz de diseño del modelo por homología con ligando modelado por homología.

Target ^a	Hetero target ^b	Hetero target ^c	Template ^d	Resultado	Observaciones	QMEAN DisCo
Proglargina (71)	IR (1327)	IGF1R (1337)	Glargina-IGF1R/IGF1R	Se obtiene modelo	Presenta estructura completa de Receptor híbrido en complejo	0.65
Proglargina (71)	IR (1327)	IGF1R (1337)		Se obtiene modelo	Presenta estructura completa de Receptor híbrido en complejo con un gap del aa Ile670 - Thr684	0.64

^{a, b, c} Los valores en paréntesis representan el número de aminoácidos que contiene la respectiva secuencia utilizada en el servidor *Swiss Model* (secuencias en Anexo 2)

^d Complejo Glargina-IGF1R reportado por (González-Beltrán & Gómez-Alegría, 2021).

Como resultado de este nuevo *round* de modelado con *Swiss Model*, se obtuvieron dos modelos del receptor híbrido *IR/IGF1R* en interacción con glargina (holo-receptor). Estos modelos se refinaron como se describió antes, y los modelos refinados finales se muestran en la Figura 3-3, donde se aprecia también el ligando unido (en color rojo).

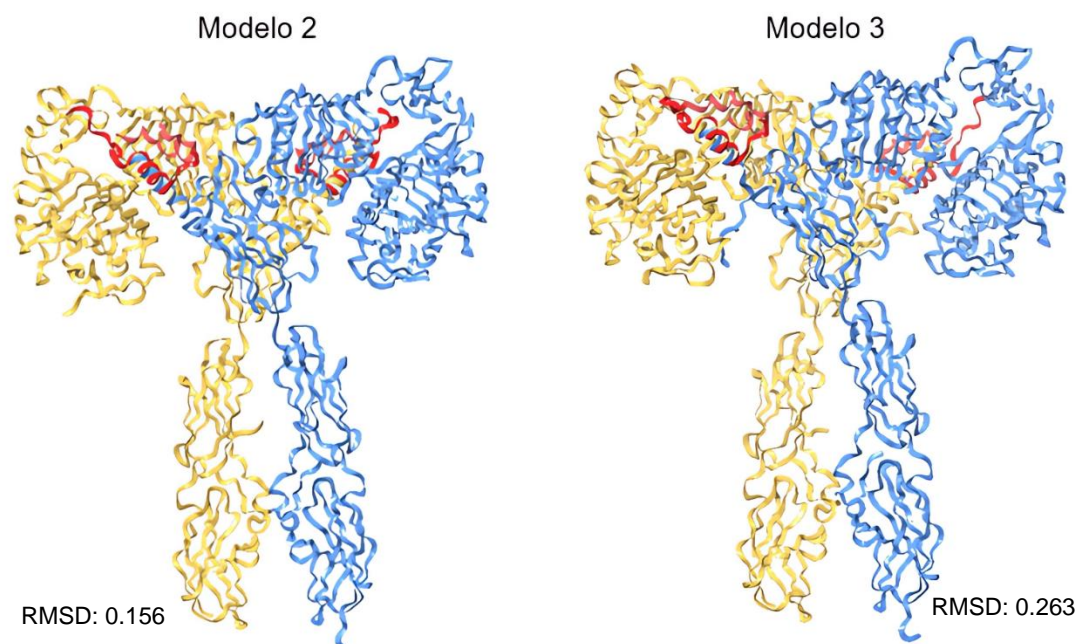


Figura 3-3: Modelos hipotéticos del receptor híbrido en complejo con Glargina. Los modelos obtenidos se presentan en forma de cintas, donde el protómero IR se representa de color dorado, y el protómero IGF1R de color azul. En todos estos modelos, el ligando glargina se representa con su cadena A de color rojo claro y la cadena B de color rojo oscuro.

El modelo 2 consta de 1.695 aminoácidos de los cuales 790 residuos corresponden al protómero IR y 801 al protómero IGF1R. En este modelo, el ligando glargina de 52 aminoácidos (color rojo en la Figura 3-3) se encuentra ocupando el sitio 1 de cada protómero. Además, la pose del ligando es la que se esperaría observar. Los parámetros de calidad geométrica y de torsión del modelo 2 se muestran en la tabla 3-4, donde *QMEANDisCo* e *IDDT* muestran valores cercanos a 1, indicando que son valores aceptables. En cuanto al análisis realizado con MolProbity, se identificó que el gráfico de Ramachandran (Figura 3-4) muestran que el 91.10% (1513/1661) de los residuos están en regiones favorecidas y 98.70% (1639/1661) en regiones permitidas. Por otro lado, en el análisis local que incluyó la evaluación de rotámeros, se presentan 9 residuos (0.59%) que

poseen una configuración espacial atípica, tres de los cuales están localizados en el sitio de unión de ligando (sitio 1) del receptor híbrido. Uno de ellos (Gln69), es parte del segmento α CT de IR. En este mismo sitio de unión está el residuo GlnA15 de glargina. El mismo residuo GlnA15 se localiza también en el sitio 1 de unión del protómero IGF1R.

Tabla 3-4: Evaluación de calidad, análisis geométrico y de torsión del modelo 2.

Evaluación	Modelo 2	%	Meta
N° aa	1.695	-	-
QMEANDisCo	0.72 +/- 0.5	-	-
IDDT	0.79	-	-
Z-Score	-1.46 +/- 0.19		Meta: abs (Z score) ≤ 2
Ramachandran valores atípicos	22	1.32%	Meta: $\leq 0.05\%$
Ramachandran valores Favorecidos	1513	91.09%	Meta: $\geq 98\%$
Rotámeros favorecidos	1468	96.07%	Meta: $\geq 98\%$
C β deviation > 0.25 Å	15	0.94%	Meta: 0

Por último, las desviaciones del C β de 0.94% evidencian que no existe un alto error en la geometría del modelo. De acuerdo con lo anterior, los análisis de calidad en general demuestran que la calidad del modelo es aceptable.

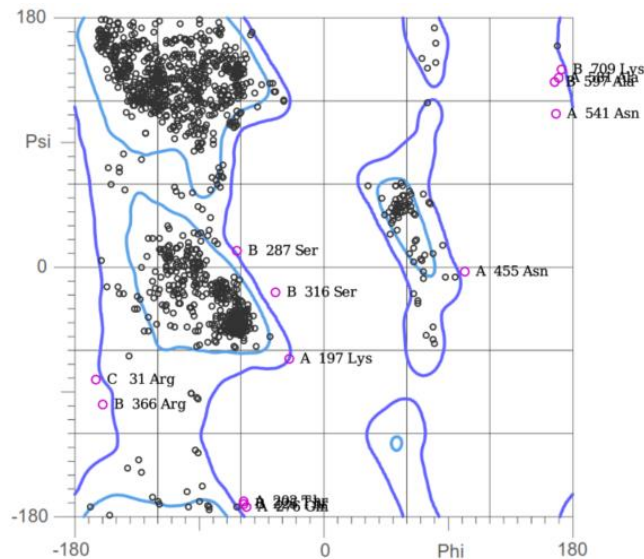


Figura 3-4: Gráfico Ramachandran del modelo 2. En azul claro se muestran las regiones favorecidas y en azul oscuro las regiones permitidas. Fuera de eso son regiones no permitidas. Gráfico Obtenido de *MolProbability*.

En cuanto al modelo 3, este tiene un total de 1696 aminoácidos, con 791 aminoácidos del protómero IR y 801 aminoácidos del protómero IGF1R. En este modelo, el sitio 1 de cada receptor ocupado por glargina, de 52 aminoácidos. Para este modelo, el protómero IGF1R del dímero presenta un gap de 14 residuos (Ile670-Thr684), los cuales son parte del dominio de fibronectina II (FnIII-2) y a su vez, el segmento α CT de este protómero se encuentra parcialmente resuelto, de tal manera que no posee la similitud estructural del segmento α CT a lo reportado experimentalmente. En consecuencia, este modelo se excluye del análisis geométrico y de torsión del modelo.

Los datos anteriores, en su conjunto, nos permiten disponer de un modelo computacional del receptor híbrido IR/IGF1R (Modelo 1), y de dos modelos estructurales para el receptor híbrido IR/IGF1R en interacción con glargina (Modelos 2 y 3).

Modelamiento del complejo Glargina-Receptor híbrido mediante acoplamiento molecular

Se utilizó el modelo del receptor híbrido IR/IGF1R obtenido mediante *Swiss Model* (Modelo 1), con el fin de construir un modelo con el ligando glargina unido, mediante la aplicación de un método alternativo como es el acoplamiento molecular. Para tales efectos, y de acuerdo con lo descrito en materiales y métodos (sección 2.2.5), se emplearon tres herramientas bioinformáticas (*ClusPro*, *HADDOCK* y *LZerD*). El análisis de acoplamiento arrojó un total de 179 modelos, 42 modelos con *ClusPro* y 137 modelos con *HADDOCK*. No se obtuvieron modelos con *LZerD*. Con el fin de limitar el número de modelos, se aplicaron criterios de selección que fueron descritos previamente (Sección 2.2.6). Con base a esto, se llegó a un único modelo final que cumple con todos los criterios de selección, descartando 178 de los 179 modelos generados con esta aproximación. Este modelo final con glargina unida al receptor se logró con el servidor *HADDOCK* y se presenta en la figura 3-5.

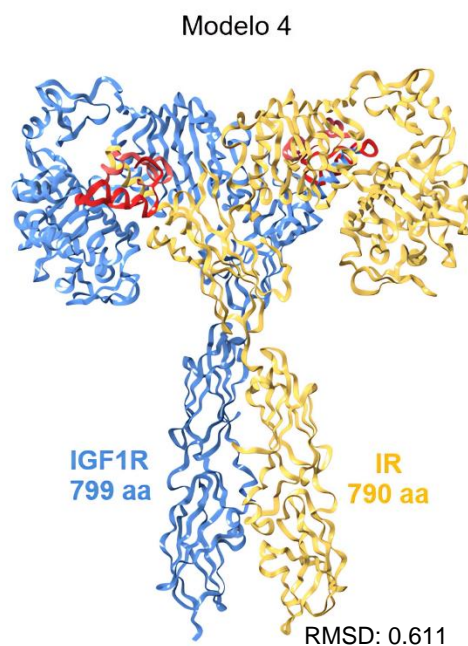


Figura 3-5: Modelo del receptor híbrido IR/IGF1R con glargina unida (modelo 4). Obtenido por acoplamiento molecular. El protómero IR del receptor se representa de color dorado, y el protómero de IGF1R se representa en color azul. El ligando glargina se representa en color rojo claro (cadena A) y rojo oscuro (cadena B).

Este modelo 4 está conformado por un total de 1.691 aminoácidos, de los cuales el protómero IR contiene 790 aminoácidos, el protómero IGF1R 801 aminoácidos y el ligando glargina 50 aminoácidos. Los resultados del análisis estructural y conformacional del modelo 4 se reportan en la tabla 3-5, donde *QMEANDisCo* e *IDDT*, no se determinó, ya que el servidor *Swiss Model*, no permite el análisis del modelo por las coordenadas, que posee el formato y un Z-score de -3.28 ± 0.17 . En cuanto al análisis realizado con MolProbity, se identificó que los valores de Ramachandran muestran que el 88.40% (1457/1649) de los residuos están en regiones favorecidas y 98.80% (1629/1649) en regiones permitidas. Por otro lado, en el análisis local que incluyó la evaluación de rotámeros, 119 residuos (7.82%) poseen una configuración espacial atípica según el

análisis de geometría, y por último las desviaciones del C β de 0.94% evidencia que existe un alto error en la geometría del modelo.

Tabla 3-5: Evaluación de calidad, análisis geométrico y de torsión del modelo 4.

Evaluación	Modelo 4	%	Meta
N° aa	1691	-	-
Z-Score	-3.28 +/- 0.17		Meta: abs (Z score) \leq 2
Ramachandran valores atípicos	20	1.21%	Meta: \leq 0.05%
Ramachandran valores Favorecidos	1457	88.36%	Meta: \geq 98 %
Rotámeros pobres	119	7.82%	Meta: \leq 0.3 %
Rotámeros favorecidos	1245	81.80%	Meta: \geq 98 %
C β deviation > 0.25 Å	15	0.94%	Meta: 0

Estos resultados nos llevan a descartar el modelo 4 obtenido por acoplamiento molecular.

Los resultados anteriores, en su conjunto nos lleva a proponer como modelo final del holo-receptor (complejo glargina-receptor híbrido) al modelo 2 descrito previamente. Por último,

la Tabla 3-6 muestra las afinidades (constantes de disociación, Kd) para el modelo 2 del complejo glargina-receptor híbrido obtenido y presentados más arriba.

Tabla 3-6: Valores de ΔG y Kd del modelo final propuesto para el complejo glargina-receptor híbrido IR/IGF1R

Afinidades según Protómero	Modelo	ΔG (kcal/mol)	Kd * (nM)
Protómero IR	Modelo 2	-12.1	1.4×10^{-9}
Protómero IGF1R	Modelo 2	-11.1	7×10^{-9}

*Los valores mostrados fueron calculados mediante el servidor PROtein binDIng enerGY (PRODIGY) a una temperatura estándar de 25 °C

Estos valores de las afinidades teóricas para el modelo híbrido propuesto se calcularon con la herramienta bioinformática PRODIGY, la cual se basa en la evaluación del número de contactos interfaciales observados en el complejo. Estas afinidades fueron determinadas con el único fin de tener alguna forma de comparación de nuestro modelo teórico con datos reales obtenidos experimentales para este sistema ligando-receptor, pues las afinidades experimentales si han sido determinadas experimentalmente. Con base en esto, en la sección Discusión del trabajo se incluyó un párrafo donde se tocó este punto. Estos valores teóricos se asemejan a valores experimentales descritos por otros autores, como se presenta más adelante.

Los resultados anteriores, en su conjunto, nos permiten cumplir con el objetivo 1 de este trabajo, permitiendo proponer por primera vez dos modelos del receptor híbrido IR/IGF1R tanto para el apo-receptor (en ausencia de ligando) como para el holo-receptor unido a glargina, ambos de los cuales se desconocen a la fecha.

Con base en los criterios de selección se decide excluir los modelos 3 y 4, ya que, luego de su caracterización y evaluación, presentan condiciones menos favorables respecto a su conformación, calidad y/o geometría. En el caso del modelo 3 este no presenta totalmente resuelto el segmento α CT del protómero IGF1R como ya se mencionó anteriormente, respecto a su análogo del receptor IGF1R (apo y/o holo-receptor) a otros modelos y/o el receptor IGF1R, a su vez presenta un gap 14 residuos (Ile670-Thr684), en el dominio de fibronectina II (FnIII-2) de este protómero; El modelo 4 en su análisis estereoquímico presentó un Z-score de -3.28 y en el diagrama de Ramachandran, se presentan unos valores atípicos de 1.21%. Por otra parte, en el análisis de geometría, se presentaron 119 residuos (7.82%) que poseen una configuración espacial no permitida, por ende, este modelo presenta un alto error en la geometría de su estructura. Con base a la calidad, geometría y su conformación estructural, se propone el modelo 2 como el hipotético modelo estructural del complejo glargina-receptor híbrido IR/IGF1R.

3.2 Análisis de las interacciones entre el ligando glargina y el receptor híbrido IR/IGF1R

El análisis de las interacciones ligando-receptor para el sistema glargina-receptor híbrido IR/IGF1R se enfocó únicamente en el modelo 2 y, más específicamente en el sitio 1 de unión de ligando, que es el sitio de mayor afinidad de ambos protómeros.

En la Figura 3-6 se muestra la glargina posicionada en el sitio 1 del protómero IR en el receptor híbrido (Panel A) y se observan también algunos residuos interactuantes entre glargina y el receptor (Panel B).

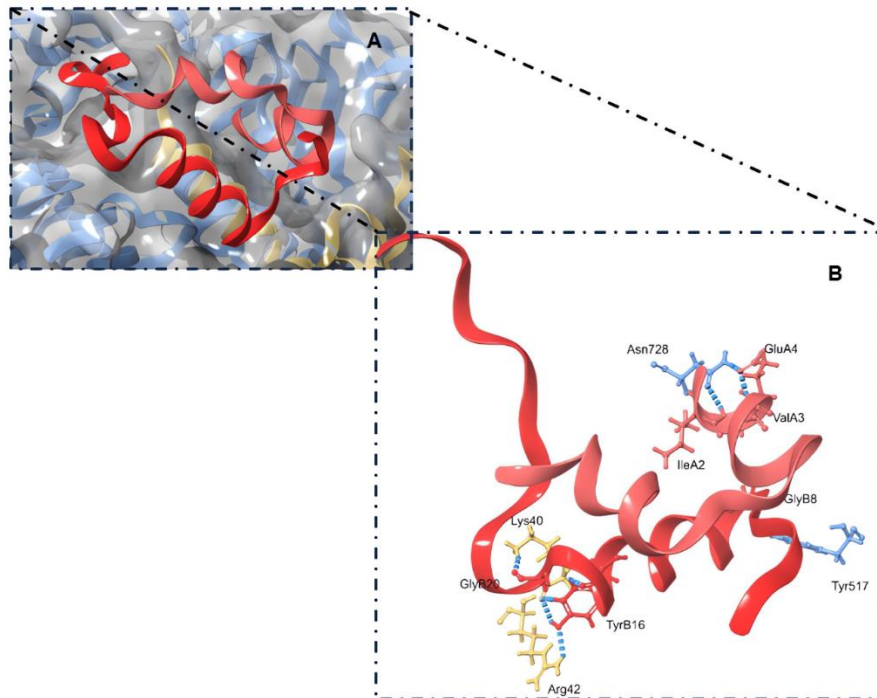


Figura 3-6: Interacción de glargina con el receptor híbrido IR/IGF1R (protómero IR). La imagen corresponde al sitio 1 de unión del protómero IR del receptor. (A) Glargina (en rojo) posicionada en el sitio 1 del protómero IR del receptor híbrido (modelo 2), el cual se representa en forma de superficie. (B) Residuos involucrados en la interacción entre la glargina y el receptor híbrido. Glargina se representa en forma de cintas y los residuos que interactúan en forma de palos y bolas. Las líneas discontinuas de color azul presentan enlaces tipo puentes de hidrógeno.

En la Tabla 3-7, por su parte, se presenta un detalle de todas las interacciones entre la glargina y el receptor híbrido en el sitio 1 del protómero IR. Estas interacciones se distribuyen entre interacciones de tipo electrostático (cuatro interacciones) y enlaces de

hidrógeno (doce interacciones). Las interacciones de tipo electrostático involucran a residuos de los dominios L1 y CR de IGF1R que también forman parte del sitio 1 del protómero IR, específicamente los residuos Asp292, Glu294, y Asp38, que interactúan

Tabla 3-7: Resumen de la Interacción gárgina- sitio 1 de unión protómero IR del receptor híbrido (modelo 2).

Interacción	Distancia Å	Categoría
LysB29:HZ2 - CR(IGF1R): Asp292:OD2	1.7211	Electrostático
ArgB31:HH12 - CR(IGF1R): Glu294:OE1	2.50515	Electrostático
ArgB31:HH22 - CR(IGF1R): Glu294:OE1	1.72968	Electrostático
FnIII-I(IR):Arg576:HH12 - ThrA8:O	2.33874	Puente de hidrógeno
FnIII-I(IR):Arg576:HH22 - ThrA8:O	2.03967	Puente de hidrógeno
α CT(IR):Asn711:HD21 - GluA4:OE1	2.33228	Puente de hidrógeno
α CT(IR):Arg717:HN - AsnA18:O	2.10055	Puente de hidrógeno
L1(IGF1R):Arg40:HH11 - PheB25:O	2.60686	Puente de hidrógeno
IleA2:HN - α CT(IR):Asn711:OD1	2.26479	Puente de hidrógeno
ValA3:HN - α CT(IR):Asn711:OD1	2.40889	Puente de hidrógeno
α CT(IR):Pro716:HA - AsnA18:O	2.48708	Puente de hidrógeno
ArgB31:HD1 - CR(IGF1R): Asp292:OD1	2.58739	Puente de hidrógeno
GlyA1:HA1 - α CT(IR):Asn711:OD1	3.03868	Puente de hidrógeno
TyrA19:HA - α CT(IR):Val715:O	2.8776	Puente de hidrógeno
L1(IGF1R):Ser65:HG - TyrB16	3.21483	Puente de hidrógeno
L1(IGF1R): Asp38:OD2 - TyrB26	3.53131	Electrostático
PheB24 - L1(IGF1R):Leu63	4.51965	Hidrofóbico
PheB25 - α CT(IR):Arg717	4.25407	Hidrofóbico
TyrA19 - α CT(IR):Pro716	4.1748	Hidrofóbico

con LysB29, ArgB31 y TyrB26, respectivamente. En esta superficie de contacto también se identificaron los residuos GlyA1, IleA2, TyrA19, TyrB16, PheB24, PheB25 y TyrB26 de glargina, y los residuos Asn711 y Val715 del segmento α CT del protómero IR, todos los cuales han sido reportados experimentalmente en el complejo insulina-IR (Menting et al., 2013).

La Figura 3-7 muestra la glargina en el sitio 1 del protómero IGF1R del receptor híbrido (Panel A) y algunos residuos interactuantes con este protómero (Panel B).

La Tabla 3-8, por su parte, detalla todas las interacciones encontradas entre la glargina y el sitio 1 del protómero IGF1R. En este caso, solo se observaron interacciones de tipo hidrofóbico y puentes de hidrógeno. De manera interesante, ninguna de las interacciones observadas ha sido reportada experimentalmente en complejos relacionados con este sistema. En cuanto a residuos interactuantes, encontramos los residuos IleA2, TyrB16 y PheB24 de glargina, quienes interactúan, respectivamente, con los aminoácidos Asn728 (α CT de IGF1R), Lys40 (dominio L1 de IR) y Leu37 (Dominio L1 de IR). Los residuos equivalentes de insulina (IleA2, TyrB16 y PheB24) han sido descritos como parte de la interacción insulina-receptor IR (Menting et al., 2013).

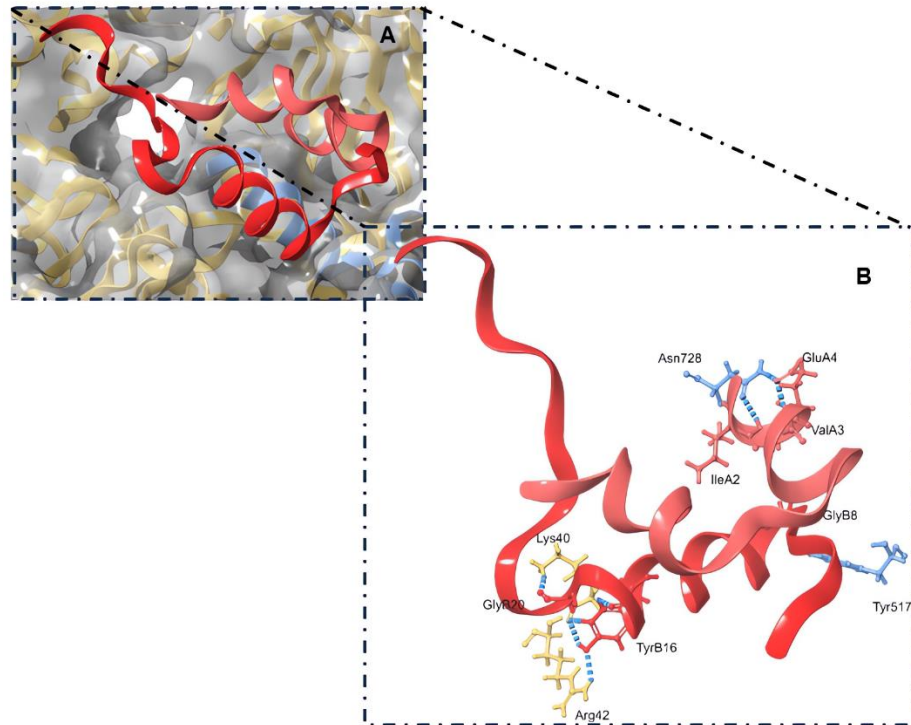


Figura 3-7: Interacción de glargina con el receptor híbrido IR/IGF1R (protómero IGF1R). La imagen corresponde al Sitio 1 de unión en el protómero IGF1R del receptor. (A) Glargina (en rojo) posicionada en el sitio 1 del protómero IGF1R del receptor híbrido (modelo 2), el cual se representa en forma de superficie. (B) Residuos involucrados en la interacción entre la glargina y el receptor híbrido. Glargina se representa en forma de cintas y los residuos que interactúan en forma de palos y bolas. Las líneas discontinuas de color azul presentan enlaces de tipo puente de hidrógeno.

Tabla 3-8: Resumen de la Interacción glargina- sitio 1 de unión de la protómero IGF1R del receptor híbrido (modelo 2).

Interacción	Distancia Å	Categoría
L1(IR):Lys40:HZ3 - GlyB20:O	1.851	Puente de hidrógeno
L1(IR):Arg42:HH11 - TyrB16:OH	2.29145	Puente de hidrógeno
FnIII-I(IGF1R):Tyr517:HH - SerB9:OG	2.32383	Puente de hidrógeno
αCT(IGF1R):Asn728:HD21 - GluA4:OE1	2.13581	Puente de hidrógeno
TyrB16:HH - L1(IR):Lys40:O	2.1377	Puente de hidrógeno
IleA2:HN - αCT(IGF1R):Asn728:OD1	2.54413	Puente de hidrógeno
ValA3:HN - α-CT(IGF1R):Asn728:OD1	2.28985	Puente de hidrógeno
GlyB8:HA2 - FnIII-I(IGF1R):Tyr517:OH	2.90977	Puente de hidrógeno
TyrB16 - L1(IR):Lys40	4.46327	Hidrofóbico
PheB24 - L1(IR):Leu37	4.44809	Hidrofóbico

En resumen, estos resultados presentados nos permiten proponer por primera vez un modelo del receptor híbrido unido a glargina, y describir las hipotéticas interacciones encontradas en dicho complejo.

4. Discusión

Este proyecto tuvo como propósito realizar un acercamiento *in silico* a la interacción ligando-receptor observada entre la insulina glargina y el receptor híbrido IR/IGF1R. Esto partió por proponer un modelo estructural 3D del receptor híbrido unido a glargina, para lo cual se diseñó un estudio *In silico* de modelado molecular y de acoplamiento molecular. Como resultado final se logró proponer un modelo final de la estructura 3D del apo-receptor (receptor libre) y otro modelo para el Holo-receptor (complejo receptor glargina), y se analizaron las interacciones del complejo glargina-receptor híbrido. Aunque se trata de un modelo hipotético, el presente trabajo representa un estudio pionero en el campo, y se constituye en el primer documento en proponer una hipotética estructura para este complejo ligando-receptor y para el receptor híbrido IR/IGF1R, cuya expresión en las células se encuentra reportada. Desde este punto de vista, este trabajo es novedoso y se constituye en el primer documento en proponer un modelo 3D de la porción extracelular del receptor híbrido IR/IGF1R.

A diferencia de los receptores diméricos clásicos bastante estudiados, como son el receptor de insulina (dímero IR/IR) y el receptor de IGF1 (dímero IGF1R/IGF1R), el receptor híbrido IR/IGF1R es muy poco conocido tanto a nivel de su estructura tridimensional como de su mecanismo de activación (McKern et al., 2006; Smith et al., 2010; Menting et al., 2013, 2014; Croll et al., 2016; Scapin et al., 2018; Gutmann et al., 2018, 2020; Weis et al., 2018; Xu et al., 2018, 2020; Uchikawa et al., 2019; Li et al., 2019; Zhang et al., 2020). Menting et al. (2015) realizó una aproximación de algunas porciones de los dominios del receptor híbrido como es el dominio L1 y CR de IR, y una mínima

porción del segmento α -CT de IGF1R en complejo con el ligando IGF1 (Menting et al., 2015). De modo similar, Xu et al. (2022) presentó un modelo estructural 3D del receptor híbrido en complejo con IGF1, seccionado en dos partes (*Head* y *Legs*) (Xu et al., 2022) el cual presenta la conformación activa en forma de *r-Shaped*.

Nuestro trabajo constituye una aproximación complementaria para el entendimiento de este complejo proteico. Con base en dicho estudio estructural, Xu et al. (2022) han sugerido que la activación del receptor híbrido involucraría un reordenamiento conformacional de IGF1R, desde una conformación *Apo-state* en reposo a una conformación activa en forma de *r* o *r-Shaped* (Xu et al., 2022). Debido a la identidad de secuencia del 57% entre los ectodominios de IR e IGF1R (Kim & Accili, 2002; Malaguarnera & Belfiore, 2011; J. Whittaker & Whittaker, 2005), es posible que cambios conformacionales similares afecten al protómero IR (Kavran et al., 2014; Lee et al., 2014). En nuestro estudio se encontró que el receptor híbrido muestra una conformación en forma de *T*, la que podría representar una conformación activa alterna de IR (Gutmann et al., 2017; Yang et al., 2021). Estas discrepancias, más que invalidar los resultados obtenidos, podrían representar información complementaria para este sistema. Se requieren estudios experimentales para explorar este punto.

Al revisar las distancias de los extremos C-terminales de cada unidad del dímero en nuestro modelo propuesto del receptor híbrido IR/IGF1R, se observa una distancia de 38.03 Å, mientras que los protómeros del receptor híbrido en forma de *r-Shaped* (Xu et al., 2022), presentan una distancia de 35.18 Å. Las distancias de los protómeros en la estructura disponible del receptor IR/IR (6PXV) el cual se encuentra en una conformación de *T-Shaped* presenta una distancia de 43.42 Å (Uchikawa et al., 2019). Solo a modo de

especulación, quizás el modelo hipotético propuesto para el receptor híbrido IR/IGF1R presenta una posible reorganización estructural de uno de los estado activos, lo cual se ha propuesto previamente para IR (Yang et al., 2021). Esta suposición está respaldada por la estructura cristalográfica de la porción parcial del receptor híbrido (PDB 4XSS) (Menting et al., 2015), que tiene los dominios L1-CR de IR en complejo con la región α CT de IGF1R. Por tanto, esta estructura indicaría que los protómeros IR e IGF1R del receptor híbrido IR/IGF1R se ensamblan de forma análoga a la observada en los receptores diméricos IR/IR e IGF1R/IGF1R en su apo-conformación (Turvey et al., 2022).

Aunque no se haya mostrado en los resultados presentados, en el modelo del receptor híbrido propuesto aquí, entre los protómeros IR e IGF1R se observan interacciones de tipo puentes salinos, donde participan los siguientes residuos interactuantes de IR e IGF1R, respectivamente, Arg372-Glu590, Asp404-Arg480, Lys460-Asp424. Estos residuos se localizan en los subdominios L2 y FnIII-1 de cada una de las porciones del híbrido.

El modelo obtenido del receptor híbrido sin ligando se utilizó para buscar otros modelos mediante el método alternativo de acoplamiento molecular. Por medio de esta aproximación se obtuvieron 179 modelos computacionales del complejo glargina-receptor híbrido IR/IGF1R, y después de aplicar criterios de selección se llegó a un modelo final de este complejo. Sin embargo, este modelo fue descartado por su baja calidad estructural. Los criterios se basaron en la hipotética alta homología estructural que debe existir para la unión del ligando (insulina, glargina e IGF1) al sitio 1 de unión en los receptores IR e IGF1R, de los cuales se tiene bastante información de tipo estructural (Whittaker et al., 2001; de Meyts & Whittaker, 2002; Whittaker et al., 2008; Hua, 2010; Menting et al., 2013, 2014; Xu et al., 2018; Li et al., 2019). Cabe resaltar que los modelos hipotéticos del complejo

glargina-receptor híbrido IR/IGF1R, fueron sometidos a una evaluación de calidad estructural y conformacional con el fin de validar nuestros supuestos. Por último, se evaluó el *root mean square deviation* (RMSD) realizando una superposición del modelo del receptor híbrido IR/IGF1R en ausencia y/o presencia del ligando frente a la estructura plantilla utilizada en la sección 2.2, obteniendo valores RMSD de 0.124 y 0.156 respectivamente. Estos valores indican que existe similitud de las estructuras tridimensionales a las coordenadas atómicas de los cuerpos rígidos, respecto a la plantilla utilizada y ésta, a su vez, presenta similitud respecto a la estructura PDB: 6PXV usada como estructura base para llegar a la plantilla propuesta por nuestro grupo (González-Beltrán & Gómez-Alegría, 2021). Así mismo no podemos descartar la posibilidad que los modelos hipotéticos propuestos difieran a lo que se observa a nivel celular en el ambiente nativo en el cual sucede esta interacción, por lo que se requerirán nuevos estudios experimentales que nos permitan descifrar esto.

La caracterización y evaluación de los modelos hipotéticos propuestos nos permitió clasificar el modelo 2 como el más acorde a nivel teórico. El cual presentó interacciones de diferente tipo entre el ligando glargina y el sitio 1 de unión en cada protómero del receptor híbrido. Para el protómero de IR del modelo de receptor híbrido IR/IGF1R la interacción ligando-receptor involucraría los siguientes aminoácidos interactuantes de glargina: GlyA1, IleA2, TyrA19, TyrB16, PheB24, PheB25 y TyrB26. Smith et al. (2003) y De Meyts (2004) sugieren que los aminoácidos GlyA1, IleA2, TyrA19, TyrB16, PheB24, PheB25 y TyrB26 en su análogo insulina en interacción con IR, son parte de la superficie clásica de unión (Smith et al., 2003; De Meyts, 2004; Menting et al., 2013). Los aminoácidos PheB24 y PheB25 aumenta la afinidad del ligando por el receptor y junto a

TyrB26 se consideran esenciales para la cooperatividad negativa observada en la unión del ligando a esta familia de receptores (Smith et al., 2003; De Meyts, 2004; Menting et al., 2013, 2014; Lawrence, 2021). En el protómero IR del receptor híbrido IR/IGF1R están los aminoácidos Asn711, Val715, Pro716 y Arg717. Otros autores trabajando con el receptor IR, han mostrado que los aminoácidos Asn711 y Val715 se ven involucrados en el reordenamiento del segmento α CT del receptor IR al unir su ligando insulina. En la interacción entre glargina y el sitio 1 del protómero IGF1R en el modelo de receptor híbrido, glargina mostró los siguientes residuos interactuantes: IleA2, ValA3, GlyB8, SerB9, TyrB16 y PheB24. Los mismos residuos del ligando insulina se ven involucrados en el complejo homólogo insulina-IR (Smith et al., 2003; De Meyts, 2004; Menting et al., 2013). En este complejo, los residuos ValA3, GlyB8 y SerB9 de insulina están también involucrados en el reordenamiento del segmento α CT de IR en el sitio 1 de unión (Smith et al., 2003; De Meyts, 2004; Menting et al., 2013, 2014; Lawrence, 2021). En el protómero IGF1R del modelo de receptor híbrido IR/IGF1R, se encuentra el aminoácido Asn728 del segmento α CT el cual interactúa con glargina, y la interacción de este aminoácido no ha sido reportada previamente (Xu et al., 2018).

Las interacciones intermoleculares reportadas para los protómeros IR e IGF1R como parte de la superficie clásica de unión, están respaldadas por diferentes estudios experimentales (Smith et al., 2003; De Meyts, 2004; Menting et al., 2013). Más aún, recientemente, Viola et al. (2023) comparó la señalización de insulina e IGF1 mediada por IR de *Drosophila* y humanos, determinando el involucramiento de la superficie clásica de unión tanto del ligando como del sitio 1 del receptor. Esto indica que las interacciones de tipo puente de hidrógeno reportadas se forman de manera habitual en este sistema de señalización de

insulina con esta subfamilia de receptores TRKs. Realizando un análisis de las interacciones presentes entre glargina y cada porción del receptor híbrido, se evidencia que las interacciones más prominentes e importantes para estabilizar el complejo receptor-ligando son de tipo puentes de hidrógeno. De acuerdo con esto, llama la atención algunas interacciones por puentes de hidrógeno con aminoácidos como valina y prolina. En este respecto, es necesario aclarar que el concepto original de enlace de hidrógeno X-H---Y, donde X es un átomo altamente electronegativo (como N, O o F), se amplió en el año 2000 para incluir también al carbono (C-H---Y) (Hobza & Havlas, 2000). Tras más investigaciones al respecto, Yu y colaboradores reportaron que la valina puede formar enlaces de tipo puente de hidrógeno debido a que los grupos funcionales de la valina de acuerdo con su cambio estérico pueden comportarse como un aceptor o donador en la formación de enlaces tipo puente de hidrógeno, todo esto fue demostrado utilizando como base criterios energéticos, geométricos y de densidad electrónica (Yu et al., 2006). Por otro lado, aunque la Prolina no es un donante de enlaces de hidrógeno tradicional, se ha reportado que los hidrógenos del anillo de prolina son estéricamente accesibles y permiten enlaces C-H polarizados en $H\alpha$ y $H\delta$ que pueden utilizarse como sitios alternativos para el reconocimiento entre proteínas (Daniecki et al., 2022). De acuerdo con lo anterior, se confirma que las interacciones encontradas en nuestro estudio son interesantes y dan cuenta de la complejidad de la interacción entre glargina y los receptores IR e IGF1R.

En cuanto a las afinidades de unión teóricas calculadas (K_d) para nuestro sistema glargina-receptor híbrido, estas resultaron tener valores de 1.4 y 7.0 nM para los protómeros IR e IGF1R, respectivamente. Estos valores teóricos concuerdan con los valores experimentales descritos por Sommerfeld et al. (2010), quienes reportaron afinidades de

unión experimentales (K_d) de 1.10 y 63.2 nM para los protómeros IR e IGF1R, respectivamente, mientras que Pierre-Eugène et al. (2012) describe que a nivel general el receptor híbrido al interactuar con glargina este presenta una EC_{50} de 6.28 nM. Esta concordancia en cierta medida le proporciona algún grado de validez al modelo propuesto y al presente estudio teórico computacional. A pesar de esto, reconocemos las limitaciones de nuestro estudio, y somos conscientes de que los datos teóricos propuestos aquí deben ser validados experimentalmente, más aun considerando el hecho de que para modelar el receptor híbrido fue necesario utilizar como plantilla un modelo predictivo porque ninguna de las plantillas propuestas por el servidor dio resultados positivos. Aunque esto no es lo más indicado, el uso de modelos predictivos como plantilla ya ha sido descrito en la literatura (Kundrotas et al., 2012), de manera que decidimos explorar dicha posibilidad, y fue esta innovación lo que nos permitió obtener los resultados positivos mostrados en esta tesis. Tenemos claro que esto, evidentemente, representa una clara limitación de este trabajo. De no haber sido así, nos hubiésemos visto obligados a iniciar una nueva tesis. Y todo esto en plena pandemia de Covid-19, cuando ni siquiera era posible ingresar al laboratorio para realizar algún trabajo práctico.

En cuanto a la estrategia de modelamiento empleada en este trabajo (modelamiento por homología), es importante señalar que nuestro sistema de estudio es bastante complejo pues involucra a tres proteínas interactuantes, dos de ellas forman el ectodominio del receptor (dímero IR e IGF1R) y la tercera corresponde al ligando glargina. De las diferentes estrategias posibles para realizar el modelamiento, nos dimos cuenta de que el servidor *Swiss Model* (Waterhouse et al., 2018) al momento de iniciar el trabajo era el único que permitía realizar modelamientos por homología para complejos proteicos oligoméricos.

Aunque los estudios *In silico* tienen limitaciones respecto de los estudios experimentales o de laboratorio húmedo como la Difracción de rayos X o la Crio microscopía electrónica, no por ello dejan de ser válidos y son cada vez más frecuentes. En países en vías de desarrollo, donde los recursos y la disponibilidad de equipos robustos representa una limitante importante, este tipo de estudios *In silico* constituyen una herramienta que ayuda a disminuir la brecha de generación de nuevo conocimiento con respecto a los países desarrollados. Y aunque las técnicas experimentales sean el *gold standard* en la determinación de la estructura 3D de proteínas, no contamos con equipos de este tipo ni con la experticia profesional requerida para estos abordajes de alta complejidad en nuestro medio. Sumado a lo anterior, el receptor estudiado en el presente trabajo es de por sí un sistema complejo, pues a la complejidad que representa el trabajo con proteínas de membrana en cuanto a las dificultades de solubilización (Seeger, 2017), se suma el hecho de que los receptores de esta subfamilia presentan, además, una estructura cuaternaria compleja que implica la asociación de dos protómeros diferentes (IR e IGF1R) y con formación de enlaces covalentes entre ellos para generar el receptor híbrido IR/IGF1R, donde cada protómero está constituido a su vez por dos subunidades (α y β) unidas covalentemente (Benyoucef et al., 2007; Blanquart et al., 2008; Pandini et al., 2002). Así, en sistemas estructurales complejos como el tratado en el presente trabajo, los métodos de predicción computacionales pueden proporcionar una ayuda valiosa para descifrar aspectos estructurales (Karaca & Bonvin, 2013; M. T. J. Smith & Rubinstein, 2014; Lensink et al., 2020).

En este trabajo se usó el servidor *Swiss Model* debido a su facilidad de uso, y a que es una de las herramientas más utilizadas en la predicción de estructuras proteicas (Waterhouse et al., 2018; Haddadid et al., 2020). Esta plataforma tiene la ventaja de que

se pueden utilizar secuencias de más de dos mil residuos de aminoácidos en formato FASTA, tanto en la opción del *target* como del *heterotarget* de su interfaz. Para comparación, el servidor *Protein homology Recognition Engine V 2.0 (Phyre²)* (Kelley et al., 2015), permite cargar un máximo de mil quinientos residuos en formato FASTA y el servidor *Robetta* (Kim et al., 2004) permite cargar un máximo de dos mil y un residuos. Para obtener el modelo del receptor híbrido en complejo con glargina utilizamos un total de 2735 aminoácidos y como *template* el modelo de IGF1R en complejo con el metabolito M1 de glargina publicado previamente por nuestro grupo (González-Beltrán & Gómez-Alegría, 2021). Durante el desarrollo de este estudio, se intentó utilizar la herramienta de predicción *AlphaFold*, pero no se obtuvieron resultados. *AlphaFold* es considerada la herramienta más exacta para la predicción de estructuras proteicas, según la comunidad CAPRI (Wodak et al., 2023). Esta herramienta permite cargar un máximo de 4000 residuos en formato *FASTA*, pero no permite la adición de algún tipo de *template*, lo que sí permite la herramienta *Swiss-Model*. *AlphaFold* utiliza algoritmos de predicción de estructuras basados en inteligencia artificial y técnicas de simulación molecular mediante una red neuronal (Evans et al., 2022).

Recientemente, nuestro grupo de investigación propuso por primera vez dos modelos predictivos: uno para el complejo entre el receptor de insulina en complejo y glargina y otro para el complejo entre el receptor de IGF1 y glargina. A la fecha de hoy, la estructura 3D de ninguno de dichos complejos se conoce. En ambos casos, el dominio extracelular de estos receptores es un homodímero, esto es, IR/IR (para el receptor de insulina) o IGF1R/IGF1R (para el receptor IGF1R). Sin embargo, en nuestras células y tejidos, no solo tenemos estos receptores homodiméricos; también se expresa el receptor heterodimérico IR/IGF1R, cuya estructura 3D se desconoce tanto en su forma *apo* (sin ligando) como en

su forma *holo* (en complejo con ligando). El presente trabajo se enfocó exclusivamente en el receptor heterodimérico (IR/IGF1R), proponiendo un modelo predictivo de la estructura 3D del dominio extracelular del receptor híbrido en su forma y en su forma *holo* (en complejo con glargina). Con base en esto, los resultados de este trabajo describen algo totalmente nuevo y representan generación de nuevo conocimiento científico, pues estas estructuras se desconocen hoy en día. Así, el presente trabajo no solo da continuidad a los trabajos previos del grupo, sino que los extiende, y genera nuevo conocimiento, esta vez en relación con el receptor híbrido.

Finalmente, pensamos que este trabajo aporta al entendimiento de los aspectos estructurales, funcionales y bioquímicos del sistema glargina-receptor híbrido IR/IGF1R, y podría ayudar al diseño de nuevos análogos de insulina en el futuro. Esto porque el sistema glargina-receptor híbrido IR/IGF1R ha sido relacionado con mitogénesis inducida por este fármaco en diferentes modelos celulares (Pierre-Eugene et al., 2012; Sommerfeld et al., 2010) y otros autores han sugerido que el uso prolongado de este fármaco en pacientes diabéticos estaría relacionado con riesgo de desarrollar cáncer (Mannucci et al., 2010; Ruitter et al., 2011; Sciacca et al., 2012; Vigneri et al., 2020) lo que ha generado cierta controversia en la comunidad científica.

5. Conclusiones

1. Se propuso un hipotético modelo estructural para el ectodominio del receptor híbrido IR/IGF1R tanto libre como unido al ligando glargina.
2. Se analizaron las interacciones entre la insulina glargina y el receptor híbrido IR/IGF1R en el modelo propuesto.
3. Las constantes de afinidad (K_d) calculadas teóricamente para nuestro modelo glargina-receptor híbrido concuerdan con los valores determinados experimentalmente por otros autores, proporcionando cierta validez al presente estudio.

6. Recomendaciones

1. Diseñar estudios experimentales para corroborar la información hipotética obtenida en el presente trabajo. Se sugiere usar herramientas bioinformáticas bajo licencia comercial para realizar este tipo de estudios.
2. Enfocar la información teórica y experimental futura hacia el diseño de nuevos fármacos análogos de insulina.
3. Se sugiere usar herramientas bioinformáticas bajo licencia comercial para realizar este tipo de estudios.

ANEXOS

Anexo 1. Secuencias usadas para la construcción del modelo de receptor híbrido IR/IGF1R libre (sin ligando).

Secuencia target IR (1327 aa):

VIEGHLQIILLMFKTRPEDFRDLSFPKLIMITDYLLLFVRYGLESKDLFPNLTVIRGSRLFFNYALVIFEMV
HLKELGLYNLMNITRGSVRIEKNNELCYLATIDWSRILDSVEDNYIVLNKDDNEECGDICPGTAKGKTNCPA
TVINGQFVERCWTSHCQKVCPTICKSHGCTAEGLCCHSECLGNCSPDDPTKCVACRNFYLDGRCVETCPP
PYYHFQDWRVCVNFVFCQDLHHKCKNSRRQGCHQYVIHNNKCIPECPSGYTMNSSNLLCTPCLGPCPKVCHLL
EGEKTIDSVTSAQELRGCTVINGSLIINIRGGNNLAAELEANLGLIEEISGYLKIRRSYALVLSLFFRKLRL
IRGETLEIGNYSFYALDNQNLRLQLDWWSKHNLITITQKGLFFHYNPKLCLSEIHKMEEVSGTKGRQERNDIAL
KTNGDQASCENELLKFSYIRTSFDKILLRWEYPWPPDFRDLLGFMLFYKEAPYQNVTEFDGQDACGSNSWTV
VDIDPPLRSNDPKSQNHGWLMRGLKPWTQYAI FVKTLVTFSDERRTYGAKSDI IYVQTDATNPSVPLDPI S
VSNSSSQIILKWKPPSDPNGNITHYLVFWERQAEDSELFELDYCLKGLKLPRTWSPPFESQKHNSQSEY
EDSAGECCSCPKTDSQILKELEESSFRKTFEDYLHNVVFPVPRSRKRR : SLGDVGNVTVAVPTVAAPNTSS
TSVPTSPEEHRPFKVVNKESLVISGLRHFTGYRIELQACNQDTPEERCSSVAAYVSARTMPEAKADDIVGPV
THEIFENNVVHLMWQEPKEPNGLIVLYEVSYRRYGDEELHLCVSRKHFALERGCRLRGLSPGNYSVIRIRATS
LAGNGSWTEPTYFYVTDYLDVPSNIAKIIIGPLIFVFLFSVIGSIYLFRLKRQPDGGLPLYASSNPEFLT
ASDVFPSCSVYVPDEWEVSREKITLLRELQGSFGMVYEGNARDI IKGEAETRVAVKTVNESASLRERIEFLN
EASVMKGFTCHHVRLLGVVSKGQPTLVVMEMLAHGDLKSYLRSLRPEAENNPGRPPPTLQEMIQMAAEIAD
GMAYLNAKKFVHRNLAARNCMVAHDFTVKIGDFGMTRDIYETDYRKGKGLLPVRWMAPESLKDGVTFTSS
DMWSFGVVLWEITSLAEQPYQGLSNEQVLKFMVDDGGYLDQPDNCPERVTDLMRMCWQFNPKMRPTFLEIVNL
LKDDLHPSFPEVSFFHSEENKAPESSELEMEFEDMENVPLDRSSHQREEAGGRDGGSSLGFKRSYEEHIPY
THMNGGKKNGAATAPRSNPSLESSGLEVLVLFQ

Secuencia Heterotarget IGF1R (1337 aa):

EICGPGIDIRNDYQQLKRELENCTVIEGYLHILLISKAEDYRSYRFPKLTVITEYLLLFVRYGLESGLDLPN
LTVIRGWKLFYNYALVIFEMTNLKDIGLYNLRNITRGAIRIEKNADLCYLSTVDWLSLILDAVSNNYIVGNKP
PKECGDLCPGTMEKPMCEKTTINNEYNYRCWTTNRCQKMCPSCTGKRACTENNECCHPECLGSCSAPDNDT
ACVACRHHYAGVCPACPPNTYRFEGWRCVDRDFCANILSAESSDSEGFVIHDGECMQECPSGFIRNGSQS
MYCIPCEGPCPKVCEEEKTKTIDSVTSAQMLQGCTIFKGNLLINIRGGNNIASELENFMGLIEVVTGYVKI
RHSHALVLSLFLKNLRLILGEEQLEGNYSFYVLDNQNLLQQLWDWDHRNLTIKAGKMYFAFNPKLCVSEIYRM
EEVTGKGRQSKGDINTRNNGERASCESDVLHFTSTTTSKNRITITWHRYRPPDYRDLISFTVYYKEAPFKN
VTEYDQDACGSNSWNMVDVLDLPPNKDVEPGILLHGLKPWTQYAVYVKAVTLTMVENDHIRGAKSEILYIRT
NASVPSIPLDVLSASNSSSQILIVKWNPPSLPNGNLSYYIVRWQRQPDGYLYRHNYCSKDKIPIRKYADGTI
DIEEVTENPKTEVCGGEGKPCACPKTEAEKQAEKEEAEYRKFVFNFLHNSIFVPRPERKRR : DVMQVANTT
MSSRSRNTTAADTYNITDPEELETEYPFFESRVDNKERTVISNLRPFTLYRIDIHSCNHEAEKLGCSASNFV
FARTMPAEGADDIPGPVTWEPRPENSIFLKWPEPENPNGLILMYEIKYGSQVEDQRECVSRQYRKYGGAKL
NRLNPGNYTARIQATSLSGNGSWTDPVFFVYQAKTGYENFIHLIIALPVAVLLIVGGLVIMLYVHRKRNS
RLGNGVLYASVNPEYFSAADVVPDEWEVAREKITMSRELQGSFGMVYEGVAKGVVDEPETRVAIKTVNE
AASMRERIEFLNEASVMKEFNCHHVRLLGVVSGQPTLVIMELMTRGDLKSYLRSLRPEMENNVLAPPSSL
SKMIQMAE IADGMAYLNANKFVHRDLAARNCMVAEDFTVKIGDFGMTRDIYETDYRKGKGLLPVRWMS

ESLKDGVFTTYSDVWSFGVVLWEIATLAEQPYQGLSNEQVLRFVMEGGLLDKPDNCPDMLFELMRMCWQYNP
 KMRPSFLEIISSIKEEMEPGFREVSFYFSEENKLEPEPEELDLEPENMESVPLDPSASSSSLPLPDRHSGHKA
 ENGGPGVVLVLRASFDERQPYAHMNGGRKNERALPLPQSSTC

Anexo 2. Secuencias usadas para la construcción del modelo de receptor híbrido IR/IGF1R en complejo con glargina.

Secuencia Target:

Proglargina (74 aa):

FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRREAEDLQGSGLQPLALEGSLQKRGIVEQCCTSIICSLYQLENY
 CG

Código de colores:

Rojo subrayado: glargina (Cadena A)

Rojo: glargina (Cadena B)

Sin color: péptido C de insulina

Secuencia target IR (1327 aa):

VIEGHLQIILLMFKTRPEDFRDLSFPKLIMITDYLLLFVYGLESLKDLFPNLTVIRGSRLFFNYALVIFEMV
 HLKELGLYNLMNITRGSVRIEKNNELCYLATIDWSRILDSVEDNYIVLNKDDNEECGDICPGTAKGKTNCPA
 TVINGQFVERCWTSHCQKVCPTICKSHGCTAEGLCCHSECLGNCSPDDPTKCVACRNFYLDGRCVETCPP
 PYYHFQDWRCVNFVFCQDLHHKCKNSRRQGCHQYVIHNNKCIPECPSGYTMNSSNLLCTPCLGPCPKVCHLL
 EGEKTIDSVTSAQELRGCTVINGSLIINIRGGNNLAAELEANLGLIEEISGYLKIRRSYALVLSLFFRKLRL
 IRGETLEIGNYSFYALDNQNLRLQLDWWSKHNLITITQKGLFFHYNPKLCLSEIHKMEEVSGTKGRQERNDIAL
 KTNGDQASCENELLKFSYIRTSFDKILLRWEYPWPDFRDLLGFMLFYKEAPYQNVTEFDGQDACGSNSWTV
 VDIDPPLRSNDPKSQNHGWLMRGLKPWTQYAI FVKTLVTFSDERRTYGAKSDIIYVQTDATNPSVPLDPIS
 VSNSSSQIILKWKPPSPDNGNITHYLVFWERQAEDSELFEDYCLKGLKLPRTWSPPFESQKHNSQSEY
 EDSAGECCSCPKTDSQILKELEESSFRKTFEDYLHNVVVFPVPRSRKRR : SLGDVGNVTVAVPTVAAFPNTSS
 TSVPTSPEEHRPFKVVNKESLVISGLRHFTGYRIELQACNQDTPPEERCSVAAYVSARTMPEAKADDIVGPV
 THEIFENNVVHLMWQEPKEPNGLIVLYEVSRYRYGDEELHLCVSRKHFALERGCRRLRGLSPGNYSVIRIRATS
 LAGNGSWTEPTYFYVTDYLDVPSNIAKIIIGPLIFVFLFSVIGSIYLFRLRKRQPDGPLGPLYASSNPEFLT
 ASDVFPVSVYVPEDEWVSRKAITLLRELGGQSGFMVYEGNARDIIKGEAETRVAVKTVNESASLRERIEFLN
 EASVMKGFTCHHVVRLLGVVSKGQPTLVVMEMLMAHGDLKSYLRSRPEAENNPGRPPPTLQEMIQMAAEIAD
 GMAYLNAKKFVHRNLAARNCMVAHDFTVKIGDFGMTRDIYETDYRKGKGLLPVRWMAPELKDGVFTTSS
 DMWSFGVVLWEITSLAEQPYQGLSNEQVLKFMVMDGGYLDQPDNCPERVTDLMRMCWQFNPKMRPTFLEIVNL
 LKDDLHPSFPEVSFFHSEENKAPESSELEMEFEDMENVPLDRSSHQREEAGGRDGGSSLGFKRSYEEHIPY
 THMNGGKKNGAATAPRSNPSLESSGLEVLVLFQ

Secuencia Heterotarget IGF1R (1337 aa):

EICGPGIDIRNDYQQLKRENTVIEGYLHILLISKAEDYRSYRFPKLTVITEYLLLFRVAGLES LGDLFPN
 LTVIRGWKLFYNYALVIFEMTNLKDIGLYNLRNITRGAIRIEKNADLCYLSTVDWLSLILDAVSNNYIVGNKP
 PKECGDLCPGTMEEEKPMCEKTTINNEYNYRCWTTNRCQKMC PSTCGKRACTENNECCHPECLGSCSAPDNDT
 ACVACRHYYYAGVCPACPPNTYRFEGWRCVDRDFCANILSAESSDSEGFVIHDGECMQECPSGFIRNGSQS
 MYCIPCEGPCPKVCEEEKTKTIDSVTS AQMLQGCTIFKGNLLINIRRGNNIASELENFMGLIEVVTGYVKI
 RSHALVLSLFLKNLRLILGEEQLEGNYSFYVLDNQNQLQQLWDWDHRNLTIKAGKMYFAFNPKLCVSEIYRM
 EEVTGTKGRQSKGDINTRNNGERASCESDVLHFTSTTT SKNRIITWHRYRPPDYRDLISFTVYYKEAPFKN
 VTEYDGDACGSNSWNMVDVLDLPPNKDVEPGILLHGLKPWTQYAVYVKAVTLTMVENDHIRGAKSEILYIRT
 NASVPSIPLDVLSASNSSSQLIVKWNPPSLPNGNLSYYIVRWQRQPQDGYLYRHNYCSKDKIPIRKYADGTI
 DIEEVTENPKTEVCGGEGKGPCCACPKTEAEKQAEKEEA EYRKVFENFLHNSIFVPRPERKRR : DVMQVANTT
 MSSRSRNTTAADTYNITDPEELETEYPPFFESRVDNKERTVISNLRPFTLYRIDIHSCNHEAEKLGCSASN FV
 FARTMPAEGADDIPGPVTWEPRPENSIFLKWPEPENPNGLILMYEIKYGSQVEDQRECVSRQ EYRKYGGAKL
 NRLNPGNYTARIQATSLSGNGSWTDPVFFVYQAKTGYENFIHLIIALPVAVLLIVGGLVIMLYVFHRKRNNS
 RLGNGVLYASVNPEYFSAADVVPDEWEVAREKITMSRELGQGSFGMVYEGVAKGVVKDEPETRVAIKTVNE
 AASMRERIEFLNEASVMKEFNCHHVRL LGVVSQGQPTLVIMELMTRGDLKSYLRSRPEMENN PVLAPPSL
 SKMIQMAGEIADGMAYLNANKFVHRDLAARNCMVAEDFTVKIGDFGMTRDIYETDYRKGKGLLPVRWMS P
 ESLKDGVTFTYSDVWSFGVVLWEIATLAEQPYQGLSNEQVLR FVMEGLLDKPDNCPDMLFELMRMCWQYNP
 KMRPSFLEIISSIKEEMEPGFREVSFY YSEENKLPEPEELDLEPENMESVPLDPSASSSS LPLPDRHSGHKA
 ENGGPGVVLVLRASFDERQPYAHMNGGRKNERALPLPQSSTC

Bibliografía

Abbott, A. M., Bueno, R., Pedrini, M. T., Murray, J. M., & Smith, R. J. (1992). Insulin-like growth factor I receptor gene structure. *Journal of Biological Chemistry*, 267(15), 10759–10763. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)50083-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)50083-7)

Adams, G. G., Meal, A., Morgan, P. S., Alzahrani, Q. E., Zobel, H., Lithgo, R., Samil Kok, M., Besong, D. T. M., Jiwani, S. I., Ballance, S., Harding, S. E., Chayen, N., & Gillis, R. B. (2018). Characterisation of insulin analogues therapeutically available to patients. *PLOS ONE*, 13(3), e0195010. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0195010>

Adams, T. E., Epa, V. C., Garrett, T. P. J., & Ward, C. W. (2000). Structure and function of the type 1 insulin-like growth factor receptor. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 57(7), 1050–1093. <https://doi.org/10.1007/PL00000744>

Agrawal, P., Singh, H., Srivastava, H. K., Singh, S., Kishore, G., & Raghava, G. P. S. (2019). Benchmarking of different molecular docking methods for protein-peptide docking. *BMC Bioinformatics*, 19. <https://doi.org/10.1186/S12859-018-2449-Y>

Alberto, J., Reyes, O., & Plancarte, A. A. (2008). BASES MOLECULARES DE LAS ACCIONES DE LA INSULINA*. *Revista de Educación Bioquímica*, 27(1), 03–01. <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=4901145200>

AlphaFold Data Copyright (2022) DeepMind Technologies Limited. (2022). *AlphaFold Protein Structure Database*. Created with the AlphaFold Monomer v2.0 Pipeline. <https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/P06213>

Annunziata, M., Granata, R., & Ghigo, E. (2011). The IGF system. *Acta Diabetologica*, 48(1), 1–9. <https://doi.org/10.1007/S00592-010-0227-Z>

Backer, J. M., Myers Jnr., M. G., Shoelson, S. E., Chin, D. J., Sun, X. J., Miralpeix, M., Hu, P., Margolis, B., Skolnik, E. Y., Schlessinger, J., & White, M. F. (1992). Phosphatidylinositol 3'-kinase is activated by association with IRS-1 during insulin stimulation. *The EMBO Journal*, 11(9), 3469–3479. <https://doi.org/10.1002/J.1460-2075.1992.TB05426.X>

Baker, D., & Sali, A. (2001). Protein structure prediction and structural genomics. *Science (New York, N.Y.)*, 294(5540), 93–96. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1065659>

Bastard, K., Saladin, A., & Prévost, C. (2011). Accounting for Large Amplitude Protein Deformation during in Silico Macromolecular Docking. *International Journal of Molecular Sciences* 2011, Vol. 12, Pages 1316-1333, 12(2), 1316–1333. <https://doi.org/10.3390/IJMS12021316>

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. *Endocrine Reviews*, 30(6), 586–623. <https://doi.org/10.1210/ER.2008-0047>

Bello, L. G., Salinas, J. T., Belén Giménez, M., Flores, L. E., Gómez De Ruiz, N., Centurión, A., & Centurión, O. A. (2016). El riesgo de los que cuidan el riesgo: FINDRISK en personal de blanco The risk of those who care for risk: FIDRISK in healthcare personnel Autores: ARTÍCULO ORIGINAL. *Rev. Virtual Soc. Parag. Med. Int. Setiembre*, 3(2), 71–76. [https://doi.org/10.18004/rvspmi/2016.03\(02\)71-076](https://doi.org/10.18004/rvspmi/2016.03(02)71-076)

Benkert, P., Künzli, M., & Schwede, T. (2009). QMEAN server for protein model quality estimation. *Nucleic Acids Research*, 37(Web Server issue), W510. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKP322>

Bentham Science Publisher, B. S. P. (2006). Scoring functions for protein-ligand docking. *Current Protein & Peptide Science*, 7(5), 407–420. <https://doi.org/10.2174/138920306778559395>

Benyoucef, S., Surinya, K. H., Hadaschik, D., & Sidle, K. (2007). Characterization of insulin/IGF hybrid receptors: contributions of the insulin receptor L2 and Fn1 domains and the alternatively spliced exon 11 sequence to ligand binding and receptor activation. *The Biochemical Journal*, 403(3), 603–613. <https://doi.org/10.1042/BJ20061709>

Biasini, M., Schmidt, T., Bienert, S., Mariani, V., Studer, G., Haas, J., Johner, N., Schenk, A. D., Philippsen, A., & Schwede, T. (2013). OpenStructure: an integrated software framework for computational structural biology. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 69(Pt 5), 701–709. <https://doi.org/10.1107/S0907444913007051>

Blanquart, C., Achi, J., & Issad, T. (2008). Characterization of IRA/IRB hybrid insulin receptors using bioluminescence resonance energy transfer. *Biochemical Pharmacology*, 76(7), 873–883. <https://doi.org/10.1016/J.BCP.2008.07.027>

Blundell, T., Dodson, G., Hodgkin, D., & Mercola, D. (1972). Insulin: The Structure in the Crystal and its Reflection in Chemistry and Biology by. *Advances in Protein Chemistry*, 26(C), 279–402. [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(08\)60143-6](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(08)60143-6)

Blyth, A. J., Kirk, N. S., & Forbes, B. E. (2020). Understanding IGF-II Action through Insights into Receptor Binding and Activation. *Cells*, Vol. 9, Page 2276, 9(10), 2276. <https://doi.org/10.3390/CELLS9102276>

Bolli, G. B., di Marchi, R. D., Park, G. D., Pramming, S., & Koivisto, V. A. (1999). Insulin analogues and their potential in the management of diabetes mellitus. *Diabetologia*, 42(10), 1151–1167. <https://doi.org/10.1007/S001250051286>

Bordoli, L., Kiefer, F., Arnold, K., Benkert, P., Battey, J., & Schwede, T. (2008). Protein structure homology modeling using SWISS-MODEL workspace. *Nature Protocols* 2009 4:1, 4(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.197>

Brown, J., Delaine, C., Zaccheo, O. J., Siebold, C., Gilbert, R. J., van Boxel, G., Denley, A., Wallace, J. C., Hassan, A. B., Forbes, B. E., & Jones, E. Y. (2008). Structure and functional analysis of the IGF-II/IGF2R interaction. *The EMBO Journal*, 27(1), 265. <https://doi.org/10.1038/SJ.EMBOJ.7601938>

Chen, G., Seukep, A. J., & Guo, M. (2020a). Recent Advances in Molecular Docking for the Research and Discovery of Potential Marine Drugs. *Marine Drugs*, 18(11). <https://doi.org/10.3390/MD18110545>

Chen, R., & Weng, Z. (2002). Docking unbound proteins using shape complementarity, desolvation, and electrostatics. *Proteins*, 47(3), 281–294. <https://doi.org/10.1002/PROT.10092>

Chisalita, S. I., & Arnqvist, H. J. (2005). Expression and function of receptors for insulin-like growth factor-I and insulin in human coronary artery smooth muscle cells. *Diabetologia*, 48(10), 2155–2161. <https://doi.org/10.1007/S00125-005-1890-4>

Christoffer, C., Chen, S., Bharadwaj, V., Aderinwale, T., Kumar, V., Hormati, M., & Kihara, D. (2021). LZerD webserver for pairwise and multiple protein-protein docking. *Nucleic Acids Research*, 49(W1), W359–W365. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAB336>

Ciaraldi, T. P., & 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. *Hormone and Metabolic Research = Hormon- Und Stoffwechselforschung = Hormones et Metabolisme*, 43(1), 1–10. <https://doi.org/10.1055/S-0030-1267203>

Comeau, S. R., Gatchell, D. W., Vajda, S., & Camacho, C. J. (2004a). ClusPro: a fully automated algorithm for protein-protein docking. *Nucleic Acids Research*, 32(Web Server issue). <https://doi.org/10.1093/NAR/GKH354>

Comeau, S. R., Gatchell, D. W., Vajda, S., & Camacho, C. J. (2004b). ClusPro: an automated docking and discrimination method for the prediction of protein complexes. *Bioinformatics* (Oxford, England), 20(1), 45–50. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTG371>

Costo, F. C. de enfermedades de alto (CAC). (2020). Enfermedad renal crónica. *FMC Formacion Medica Continuada En Atencion Primaria, SUPPL. 4*, 1–335.

Daniecki, N. J., Bhatt, M. R., Yap, G. P. A., & Zondlo, N. J. (2022). Proline C–H Bonds as Loci for Proline Assembly via C–H/O Interactions. *ChemBioChem*, 23(24), e202200409. <https://doi.org/10.1002/CBIC.202200409>

de Luis, D. A., & Romero, E. (2013). Análogos de insulina: modificaciones en la estructura, consecuencias moleculares y metabólicas. *SEMERGEN - Medicina de Familia*, 39(1), 34–40. <https://doi.org/10.1016/J.SEMERG.2012.04.010>

de Meyts, P. (1994). The structural basis of insulin and insulin-like growth factor-I receptor binding and negative co-operativity, and its relevance to mitogenic versus metabolic signalling. *Diabetologia*, 37 Suppl 2(2 Supplement). <https://doi.org/10.1007/BF00400837>

de Meyts, P., & Whittaker, J. (2002). Structural biology of insulin and IGF1 receptors: implications for drug design. *Nature Reviews Drug Discovery* 2002 1:10, 1(10), 769–783. <https://doi.org/10.1038/nrd917>

De Meyts, P. (2004). Insulin and its receptor: structure, function and evolution. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 26(12), 1351–1362. <https://doi.org/10.1002/BIES.20151>

de Pagter-Holthuizen, P., van Schaik, F. M. A., Verduijn, G. M., van Ommen, G. J. B., Bouma, B. N., Jansen, M., & Sussenbach, J. S. (1986). *Organization of the human genes factors I and for insulin-like growth II*. 195(1). [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(86\)80156-9](https://doi.org/10.1016/0014-5793(86)80156-9)

Dekker Nitert, M., Chisalita, S. I., Olsson, K., Bornfeldt, K. E., & Arnqvist, H. J. (2005). IGF-I/insulin hybrid receptors in human endothelial cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 229(1–2), 31–37. <https://doi.org/10.1016/J.MCE.2004.10.003>

Denley, A., Cosgrove, L. J., Booker, G. W., Wallace, J. C., & Forbes, B. E. (2005). Molecular interactions of the IGF system. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 16(4–5), 421–439. <https://doi.org/10.1016/J.CYTOGFR.2005.04.004>

DHHS. (2020). Centers for Disease Control and Prevention. National Diabetes Statistics Report, 2020. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention, U.S. Dept of Health and Human Services; 2020. *National Diabetes Statistics Report*, 2. <https://www.cdc.gov/diabetes/pdfs/data/statistics/national-diabetes-statistics-report.pdf>

Dominguez, C., Boelens, R., & Bonvin, A. M. J. J. (2003). HADDOCK: A protein-protein docking approach based on biochemical or biophysical information. *Journal of*

the American Chemical Society, 125(7), 1731–1737.

<https://doi.org/10.1021/JA026939X>

Drejer, K. (1992). The bioactivity of insulin analogues from in vitro receptor binding to in vivo glucose uptake. *Diabetes/Metabolism Reviews*, 8(3), 259–285.

<https://doi.org/10.1002/DMR.5610080305>

Du, Z., & Lovly, C. M. (2018). Mechanisms of receptor tyrosine kinase activation in cancer. *Molecular Cancer* 2018 17:1, 17(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/S12943-018-0782-4>

Egan, A. M., & Dinneen, S. F. (2014). What is diabetes? *Medicine (United Kingdom)*, 42(12), 679–681. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2014.09.005>

Esquivel-Rodriguez, J., Filos-Gonzalez, V., Li, B., & Kihara, D. (2014). Pairwise and multimeric protein–protein docking using the Izerd program suite. *Methods in Molecular Biology*, 1137, 209–234. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0366-5_15

Fan, J., Fu, A., & Zhang, L. (2019). Progress in molecular docking. *Quantitative Biology*, 7(2), 83–89. <https://doi.org/10.1007/S40484-019-0172-Y>

Federici, M., Giaccari, A., Hribal, M. L., Giovannone, B., Lauro, D., Morviducci, L., Pastore, L., Tamburrano, G., Lauro, R., & Sesti, G. (1999). Evidence for glucose/hexosamine in vivo regulation of insulin/IGF-I hybrid receptor assembly. *Diabetes*, 48(12), 2277–2285. <https://doi.org/10.2337/DIABETES.48.12.2277>

Fernandez-Fuentes, N., Rai, B. K., Madrid-Aliste, C. J., Eduardo Fajardo, J., & Fiser, A. (2007). Comparative protein structure modeling by combining multiple templates and optimizing sequence-to-structure alignments. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 23(19), 2558–2565. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTM377>

Ferreira, L. G., dos Santos, R. N., Oliva, G., & Andricopulo, A. D. (2015). Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies. *Molecules*, 20(7), 13384. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES200713384>

Fischer, D. (2006). Servers for protein structure prediction. *Current Opinion in Structural Biology*, 16(2), 178–182. <https://doi.org/10.1016/J.SBI.2006.03.004>

Fiser, A. (2010). Template-Based Protein Structure Modeling. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 673, 73. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-842-3_6

González-Beltrán, M., & Gómez-Alegría, C. (2021). Molecular Modeling and Bioinformatics Analysis of Drug-Receptor Interactions in the System Formed by Glargine, Its Metabolite M1, the Insulin Receptor, and the IGF1 Receptor. *Bioinformatics and Biology Insights*, 15. <https://doi.org/10.1177/11779322211046403>

Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (1990). Automated docking of substrates to proteins by simulated annealing. *Proteins*, 8(3), 195–202. <https://doi.org/10.1002/PROT.340080302>

Grassot, J., Mouchiroud, G., & Perrière, G. (2003). RTKdb: database of receptor tyrosine kinase. *Nucleic Acids Research*, 31(1), 353–358. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKG036>

Guedes, I. A., de Magalhães, C. S., & Dardenne, L. E. (2014). Receptor-ligand molecular docking. *Biophysical Reviews*, 6(1), 75–87. <https://doi.org/10.1007/S12551-013-0130-2>

Haddadid, Y., Adamid, V., & Hegerid, Z. (2020). *Ten quick tips for homology modeling of high-resolution protein 3D structures*. PLOS Computational Biology, 16(4), e1007449. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1007449>

Harris, R., Olson, A. J., & Goodsell, D. S. (2008). Automated prediction of ligand-binding sites in proteins. *Proteins*, 70(4), 1506–1517. <https://doi.org/10.1002/PROT.21645>

Hedekov, C. J. (1980). Mechanism of glucose-induced insulin secretion. *Physiological Reviews*, 60(2), 442-509. <https://doi.org/10.1152/physrev.1980.60.2.442>

Heise, T., Nosek, L., Roønn, B. B., Endahl, L., Heinemann, L., Kapitza, C., & Draeger, E. (2004). Lower within-subject variability of insulin detemir in comparison to NPH insulin and insulin glargine in people with type 1 diabetes. *Diabetes*, 53(6), 1614–1620. <https://doi.org/10.2337/DIABETES.53.6.1614>

Hobza, P., & Havlas, Z. (2000). Blue-shifting hydrogen bonds. *Chemical Reviews*, 100(11), 4253–4264. <https://doi.org/10.1021/CR990050Q>

Honorato, R. v., Koukos, P. I., Jiménez-García, B., Tsaregorodtsev, A., Verlato, M., Giachetti, A., Rosato, A., & Bonvin, A. M. J. J. (2021). Structural Biology in the Clouds: The WeNMR-EOSC Ecosystem. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8, 708. <https://doi.org/10.3389/FMOLB.2021.729513>

-
- Hua, Q. (2010). Insulin: a small protein with a long journey. *Protein & Cell*, 1(6), 537–551. <https://doi.org/10.1007/S13238-010-0069-Z>
- Hubbard, S. R. (1999). Structural analysis of receptor tyrosine kinases. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 71(3–4), 343–358. [https://doi.org/10.1016/S0079-6107\(98\)00047-9](https://doi.org/10.1016/S0079-6107(98)00047-9)
- Hubbard, S. R. (2013). The insulin receptor: both a prototypical and atypical receptor tyrosine kinase. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(3). <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A008946>
- International Diabetes Federation. (2019). IDF Diabetes Atlas, 9th edn. Brussels, Belgium. In *Atlas de la Diabetes de la FID*. http://www.idf.org/sites/default/files/Atlas-poster-2014_ES.pdf
- Janin, J., Henrick, K., Moulton, J., Eyck, L. ten, Sternberg, M. J. E., Vajda, S., Vakser, I., & Wodak, S. J. (2003). CAPRI: a Critical Assessment of PRedicted Interactions. *Proteins*, 52(1), 2–9. <https://doi.org/10.1002/PROT.10381>
- Jarosinski, M. A., Dhayalan, B., Chen, Y. S., Chatterjee, D., Varas, N., & Weiss, M. A. (2021). Structural principles of insulin formulation and analog design: A century of innovation. *Molecular Metabolism*, 52, 101325. <https://doi.org/10.1016/J.MOLMET.2021.101325>
- Joshi, S., Parikh, R., & Das, A. (2007). Insulin--history, biochemistry, physiology and pharmacology. *The Journal of the Association of Physicians of India*, 55(Supp), 19–25. PMID: 17927007.

Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., ... Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596, 583. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>

Kavran, J. M., McCabe, J. M., Byrne, P. O., Connacher, M. K., Wang, Z., Ramek, A., Sarabipour, S., Shan, Y., Shaw, D. E., Hristova, K., Cole, P. A., & Leahy, D. J. (2014). How IGF-1 activates its receptor. *ELife*, 3. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.03772>

Kim, J. J., & Accili, D. (2002). Signalling through IGF-I and insulin receptors: where is the specificity? *Growth Hormone & IGF Research*, 12, 84–90. <https://doi.org/10.1054/ghir.2002.0265>

Knudsen, L., de Meyts, P., & Kiselyov, V. v. (2011). Insight into the molecular basis for the kinetic differences between the two insulin receptor isoforms. *The Biochemical Journal*, 440(3), 397–403. <https://doi.org/10.1042/BJ20110550>

Koukos, P. I., Faro, I., van Noort, C. W., & Bonvin, A. M. J. J. (2018). A Membrane Protein Complex Docking Benchmark. *Journal of Molecular Biology*, 430(24), 5246–5256. <https://doi.org/10.1016/J.JMB.2018.11.005>

Kozakov, D., Brenke, R., Comeau, S. R., & Vajda, S. (2006). PIPER: an FFT-based protein docking program with pairwise potentials. *Proteins*, 65(2), 392–406. <https://doi.org/10.1002/PROT.21117>

Kozakov, D., Hall, D. R., Xia, B., Porter, K. A., Padhorny, D., Yueh, C., Beglov, D., & Vajda, S. (2017). The ClusPro web server for protein-protein docking. *Nature Protocols*, 12(2), 255. <https://doi.org/10.1038/NPROT.2016.169>

Kuerzel, G. U., Shukla, U., Scholtz, H. E., Pretorius, S. G., Wessels, D. H., Venter, C., Potgieter, M. A., Lang, A. M., Koose, T., & Bernhardt, E. (2003). Biotransformation of insulin glargine after subcutaneous injection in healthy subjects. *Current Medical Research and Opinion*, 19(1), 34–40. <https://doi.org/10.1185/030079902125001416>

Larsson, P., Wallner, B., Lindahl, E., & Elofsson, A. (2008). Using multiple templates to improve quality of homology models in automated homology modeling. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 17(6), 990. <https://doi.org/10.1110/PS.073344908>

Lawrence, M. C. (2021). Understanding insulin and its receptor from their three-dimensional structures. *Molecular Metabolism*, 52, 101255. <https://doi.org/10.1016/J.MOLMET.2021.101255>

Lee, J., Miyazaki, M., Romeo, G. R., & Shoelson, S. E. (2014). Insulin receptor activation with transmembrane domain ligands. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(28), 19769–19777. <https://doi.org/10.1074/JBC.M114.578641>

Leis, S., & Zacharias, M. (2011). Efficient inclusion of receptor flexibility in grid-based protein–ligand docking*. *Journal of Computational Chemistry*, 32(16), 3433–3439. <https://doi.org/10.1002/JCC.21923>

Lemmon, M. A., & Schlessinger, J. (2010). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, 141(7), 1117–1134. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2010.06.011>

Lensink, M. F., Velankar, S., & Wodak, S. J. (2016). Modeling protein–protein and protein–peptide complexes: CAPRI 6th edition. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 85(3), 359–377. <https://doi.org/10.1002/PROT.25215>

Li, J., Choi, E., Yu, H., & Bai, X. chen. (2019). Structural basis of the activation of type 1 insulin-like growth factor receptor. *Nature Communications* 2019 10:1, 10(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12564-0>

Lucas Morante, T., Aragón Alonso, A., Oliván Palacios, B., & Manzano Arroyo, P. (2004). Las nuevas insulinas: Revisión. *Información Terapéutica Del Sistema Nacional de Salud, ISSN 1130-8427, Vol. 28, Nº. 2, 2004, Págs. 41-49, 28(2), 41–49.* <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=914248&info=resumen&idioma=SPA>

Ma, B., Tromp, J., & Li, M. (2002). PatternHunter: faster and more sensitive homology search. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 18(3), 440–445. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/18.3.440>

Madeira, F., Pearce, M., Tivey, A., Basutkar, P., Lee, J., Edbali, O., Madhusoodanan, N., Kolesnikov, A., & Lopez, R. (2022). Search and sequence analysis tools services from EMBL-EBI in 2022. *Nucleic Acids Research*, 50(W1), W276–W279. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAC240>

Malaguarnera, R., & Belfiore, A. (2011). The insulin receptor: a new target for cancer therapy. *Frontiers in Endocrinology*, 2, 93. <https://doi.org/10.3389/FENDO.2011.00093>

Mandell, J. G., Roberts, V. A., Pique, M. E., Kotlovyi, V., Mitchell, J. C., Nelson, E., Tsigelny, I., & ten Eyck, L. F. (2001). Protein docking using continuum electrostatics and geometric fit. *Protein Engineering*, 14(2), 105–113. <https://doi.org/10.1093/PROTEIN/14.2.105>

Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T., & Sudarsanam, S. (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science (New York, N.Y.)*, 298(5600), 1912–1934. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1075762>

Marsh, J. A., & Teichmann, S. A. (2015). Structure, dynamics, assembly, and evolution of protein complexes. *Annual Review of Biochemistry*, 84, 551–575. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-BIOCHEM-060614-034142>

Mannucci, E., Monami, M., Balzi, D., Cresci, B., Pala, L., Melani, C., Lamanna, C., Bracali, I., Bigiarini, M., Barchielli, A., Marchionni, N., & Rotella, C. M. (2010). Doses of Insulin and Its Analogues and Cancer Occurrence in Insulin-Treated Type 2 Diabetic Patients. *Diabetes Care*, 33(9), 1997. <https://doi.org/10.2337/DC10-0476>

Menting, J. G., Whittaker, J., Margetts, M. B., Whittaker, L. J., Kong, G. K. W., Smith, B. J., Watson, C. J., Žáková, L., Kletvíková, E., Jiráček, J., Chan, S. J., 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* 2013 493:7431, 493(7431), 241–245. <https://doi.org/10.1038/nature11781>

Menting, J. G., Yang, Y., Chan, S. J., Phillips, N. B., Smith, B. J., Whittaker, J., Wickramasinghe, N. P., Whittaker, L. J., Pandyarajan, V., Wan, Z. L., Yadav, S. P., Carroll, J. M., Strokes, N., Roberts, C. T., Ismail-Beigi, F., Milewski, W., Steiner, D. F., Chauhan, V. S., Ward, C. W., ... Lawrence, M. C. (2014). Protective hinge in insulin opens to enable its receptor engagement. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(33). <https://doi.org/10.1073/PNAS.1412897111>

Menting, J. G., Lawrence, C. F., Kong, G. K. W., Margetts, M. B., Ward, C. W., & Lawrence, M. C. (2015). Structural Congruency of Ligand Binding to the Insulin and Insulin/Type 1 Insulin-like Growth Factor Hybrid Receptors. *Structure*, 23(7), 1271–1282. <https://doi.org/10.1016/J.STR.2015.04.016>

Michalska, K., & Joachimiak, A. (2021). Structural genomics and the Protein Data Bank. *The Journal of Biological Chemistry*, 296. <https://doi.org/10.1016/J.JBC.2021.100747>

Morris, G., Goodsell, D., Halliday, R., Huey, R., Hart, W., Belew, R., & Olson, A. (1999, January 6). *Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function - Morris - 1998 - Journal of Computational Chemistry - Wiley Online Library*. [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(19981115\)19:14%3C1639::AID-JCC10%3E3.0.CO;2-B](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/(SICI)1096-987X(19981115)19:14%3C1639::AID-JCC10%3E3.0.CO;2-B)

Moult, J. (2005). A decade of CASP: progress, bottlenecks and prognosis in protein structure prediction. *Current Opinion in Structural Biology*, 15(3), 285–289. <https://doi.org/10.1016/J.SBI.2005.05.011>

Muhammed, M. T., & Aki-Yalcin, E. (2019). Homology modeling in drug discovery: Overview, current applications, and future perspectives. *Chemical Biology & Drug Design*, 93(1), 12–20. <https://doi.org/10.1111/CBDD.13388>

Mynarcik, D. C., Yu, G. Q., & Whittaker, J. (1996). Alanine-scanning Mutagenesis of a C-terminal Ligand Binding Domain of the Insulin Receptor α Subunit (*). *Journal of Biological Chemistry*, 271(5), 2439–2442. <https://doi.org/10.1074/JBC.271.5.2439>

Nagel, N., Graewert, M. A., Gao, M., Heyse, W., Jeffries, C. M., Svergun, D., & Berchtold, H. (2019). The quaternary structure of insulin glargine and glulisine under formulation conditions. *Biophysical Chemistry*, 253, 106226. <https://doi.org/10.1016/J.BPC.2019.106226>

National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. (2022, January 24). *Diabetes Gestacional*. <https://www.niddk.nih.gov/health-information/informacion-de-la-salud/diabetes/informacion-general/que-es/gestacional>

Nooren, I. M. A., & Thornton, J. M. (2003). Diversity of protein-protein interactions. *The EMBO Journal*, 22(14), 3486–3492. <https://doi.org/10.1093/EMBOJ/CDG359>

Organización Mundial de la Salud. (2020). *INFORME MUNDIAL SOBRE LA DIABETES*. Retrieved January 23, 2022, from www.who.int

Organización Mundial de la Salud. (2022, September 16). Diabetes. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>

Organización Mundial de la Salud. (2022, September 16). *Enfermedades no transmisibles*. 16 septiembre. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases>

Pagadala, N. S., Syed, K., & Tuszynski, J. (2017). Software for molecular docking: a review. *Biophysical Reviews*, 9(2), 91–102. <https://doi.org/10.1007/S12551-016-0247-1>

Pandini, G., Frasca, F., Mineo, R., Sciacca, L., Vigneri, R., & Belfiore, A. (2002). Insulin/insulin-like growth factor I hybrid receptors have different biological characteristics depending on the insulin receptor isoform involved. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(42), 39684–39695. <https://doi.org/10.1074/JBC.M202766200>

Parodi, K., & José, S. (2016). Diabetes y embarazo. *Rev. Fac. Cienc. Méd. (Impr.)*, 27–35. <http://www.bvs.hn/RFCM/pdf/2016/pdf/RFCMVol13-1-2016-5.pdf>

Pierre-Eugene, C., Pagesy, P., Nguyen, T. T., Neuillé, M., Tschank, G., Tennagels, N., Hampe, C., & Issad, T. (2012). Effect of insulin analogues on insulin/IGF1 hybrid receptors: increased activation by glargine but not by its metabolites M1 and M2. *PLoS One*, 7(7). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0041992>

Plank, J., Bodenlenz, M., Sinner, F., Magnes, C., Görzer, E., Regittnig, W., Endahl, L. A., Draeger, E., Zdravkovic, M., & Pieber, T. R. (2005). A double-blind, randomized,

dose-response study investigating the pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of the long-acting insulin analog detemir. *Diabetes Care*, 28(5), 1107–1112. <https://doi.org/10.2337/DIACARE.28.5.1107>

Prieto Martínez Fernando D., & Medina Franco José L. (2018). Diseño de fármacos asistido por computadora: cuando la informática, la química y el arte se encuentran. *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 21(2), 124–134. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2018.2.139>

Prieto-Martínez, F. D., Arciniega, M., & Medina-Franco, J. L. (2018). Acoplamiento Molecular: Avances Recientes y Retos. *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 21, 65–87. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2018.0.143>

Puche, J. E., & Castilla-Cortázar, I. (2012). Human conditions of insulin-like growth factor-I (IGF-I) deficiency. *Journal of Translational Medicine*, 10(1), 1–29. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-10-224>

RCSB PDB - 7V3P: Cryo-EM structure of the IGF1R/insulin complex. (2022, August 17). <https://www.rcsb.org/structure/7V3P>

Reyes, J.; R. A. (2017, August 17). *RCSB PDB - 5VIZ: X-Ray structure of Insulin Glargine.* 2017-10-18. <https://www.rcsb.org/structure/5VIZ>

Robinson, D. R., Wu, Y. M., & Lin, S. F. (2000). The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene*, 19(49), 5548–5557. <https://doi.org/10.1038/SJ.ONC.1203957>

Roy, A., & Zhang, Y. (2012). Recognizing protein-ligand binding sites by global structural alignment and local geometry refinement. *Structure (London, England: 1993)*, 20(6), 987–997. <https://doi.org/10.1016/J.STR.2012.03.009>

Ruiter, R., Visser, L. E., P van Herk-Sukel, M. P., W Coebergh, J. W., Haak, H. R., Geelhoed-Duijvestijn, P. H., J M Straus, S. M., C Herings, R. M., Ch Stricker, B. H., & C Stricker, B. H. (2011). 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 follow-up study. <https://doi.org/10.1007/s00125-011-2312-4>

Saltiel, A. R., & Kahn, C. R. (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, 414(6865), 799–806. <https://doi.org/10.1038/414799A>

Saltiel, A. R., & Pessin, J. E. (2002). Insulin signaling pathways in time and space. *Trends in Cell Biology*, 12(2), 65–71. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(01\)02207-3](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(01)02207-3)

Sánchez e Islas. (2016). Bases moleculares de la diabetes mellitus tipo 2 | Biología Molecular. Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud, 2e | AccessMedicina | McGraw Hill Medical. In R. A. B. J. eds. Montes A (Ed.), *Biología Molecular. Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud* (2nd ed., Vol. 1). McGraw-Hill Education.

<https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1803§ionid=124156562>

Saponaro, A., Maione, V., Bonvin, A. M. J. J., & Cantini, F. (2020). Understanding Docking Complexes of Macromolecules Using HADDOCK: The Synergy between

Experimental Data and Computations. *Bio-Protocol*, 10(20).

<https://doi.org/10.21769/BIOPROTOC.3793>

Saxena, A., Sangwan, R. S., & Mishra, S. (2013). Fundamentals of Homology Modeling Steps and Comparison among Important Bioinformatics Tools: An Overview.

Science International, 1(7), 237–252. <https://doi.org/10.17311/SCIINTL.2013.237.252>

Schäffer, L., & Ljungqvist, L. (1992). Identification of a disulfide bridge connecting the alpha-subunits of the extracellular domain of the insulin receptor. *Biochemical and*

Biophysical Research Communications, 189(2), 650–653.

[https://doi.org/10.1016/0006-291X\(92\)92250-2](https://doi.org/10.1016/0006-291X(92)92250-2)

Sciacca, L., le Moli, R., & Vigneri, R. (2012). Insulin analogs and cancer. *Frontiers in Endocrinology*, 3(FEB), 21. <https://doi.org/10.3389/FENDO.2012.00021/BIBTEX>

Sciacca, L., Cassarino, M. F., Genua, M., Vigneri, P., Giovanna Pennisi, M., Malandrino, P., Squatrito, S., Pezzino, V., & Vigneri, R. (2014). Biological Effects of Insulin and Its Analogs on Cancer Cells With Different Insulin Family Receptor Expression. *Journal of Cellular Physiology*, 229(11), 1817–1821.

<https://doi.org/10.1002/JCP.24635>

Sciacca, L., Vella, V., Frittitta, L., Tumminia, A., Manzella, L., Squatrito, S., Belfiore, A., & Vigneri, R. (2018). Long-acting insulin analogs and cancer. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 28(5), 436–443.

<https://doi.org/10.1016/J.NUMECD.2018.02.010>

Shooter, G. K., Magee, B., Soos, M. A., Francis, G. L., Siddle, K., & Wallace, J. C. (1996). Insulin-like growth factor (IGF)-I A- and B-domain analogues with altered type 1 IGF and insulin receptor binding specificities. *Journal of Molecular Endocrinology*, *17*(3), 237–246. <https://doi.org/10.1677/JME.0.0170237>

Siebenmorgen, T., & Zacharias, M. (2020). Computational prediction of protein–protein binding affinities. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, *10*(3), e1448. <https://doi.org/10.1002/WCMS.1448>

Singh, P., Alex, J. M., & Bast, F. (2013). Insulin receptor (IR) and insulin-like growth factor receptor 1 (IGF-1R) signaling systems: novel treatment strategies for cancer. *Medical Oncology 2013 31:1*, *31*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1007/S12032-013-0805-3>

Slaaby, R., Schäffer, L., Lautrup-Larsen, I., Andersen, A. S., Shaw, A. C., Mathiasen, I. S., & Brandt, J. (2006). Hybrid Receptors Formed by Insulin Receptor (IR) and Insulin-like Growth Factor I Receptor (IGF-IR) Have Low Insulin and High IGF-1 Affinity Irrespective of the IR Splice Variant *. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(36), 25869–25874. <https://doi.org/10.1074/JBC.M605189200>

Slaaby, R. (2015). Specific insulin/IGF1 hybrid receptor activation assay reveals IGF1 as a more potent ligand than insulin. *Scientific Reports 2015 5:1*, *5*(1), 1–5. <https://doi.org/10.1038/srep07911>

Smith, B. J., Huang, K., Kong, G., Chan, S. J., Nakagawa, S., Menting, J. G., Hu, S. Q., Whittaker, J., Steiner, D. F., Katsoyannis, P. G., Ward, C. W., Weiss, M. A., &

Lawrence, M. C. (2010). Structural resolution of a tandem hormone-binding element in the insulin receptor and its implications for design of peptide agonists. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(15), 6771–6776. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1001813107>

Smith, G. D., Pangborn, W. A., & Blessing, R. H. (2003). The structure of T6 human insulin at 1.0 Å resolution. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 59(Pt 3), 474–482. <https://doi.org/10.1107/S0907444902023685>

Sommerfeld, M. R., Müller, G., Tschank, G., Seipke, G., Habermann, P., Kurrle, R., & Tennagels, N. (2010). In Vitro Metabolic and Mitogenic Signaling of Insulin Glargine and Its Metabolites. *PLOS ONE*, 5(3). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0009540>

Soos, M. A., Whittaker, J., Lammers, R., Ullrich, A., & Siddle, K. (1990). Receptors for insulin and insulin-like growth factor-I can form hybrid dimers. Characterisation of hybrid receptors in transfected cells. *Biochemical Journal*, 270(2), 383. <https://doi.org/10.1042/BJ2700383>

Soos, M. A., Field, C. E., & Siddle, K. (1993). Purified hybrid insulin/insulin-like growth factor-I receptors bind insulin-like growth factor-I, but not insulin, with high affinity. *Biochemical Journal*, 290(Pt 2), 419. <https://doi.org/10.1042/BJ2900419>

Sparrow, L. G., McKern, N. M., Gorman, J. J., Strike, P. M., Robinson, C. P., Bentley, J. D., & Ward, C. W. (1997). The disulfide bonds in the C-terminal domains of the

human insulin receptor ectodomain. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(47), 29460–29467. <https://doi.org/10.1074/JBC.272.47.29460>

Studer, G., Rempfer, C., Waterhouse, A. M., Gumienny, R., Haas, J., & Schwede, T. (2019). QMEANDisCo-distance constraints applied on model quality estimation. *Bioinformatics*, 1765–1771. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz828>

Studer, G., Tauriello, G., Bienert, S., Biasini, M., Johner, N., & Schwede, T. (2021). ProMod3—A versatile homology modelling toolbox. *PLOS Computational Biology*, 17(1), e1008667. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PCBI.1008667>

THE MOLECULAR BASIS OF INSULIN ACTION. (2002). *Insulin Signaling*, 82–118. <https://doi.org/10.1201/B12794-13>

Uchikawa, E., Choi, E., Shang, G., Yu, H., & Xiao-Chen, B. (2019). Activation mechanism of the insulin receptor revealed by cryo-EM structure of the fully liganded receptor-ligand complex. *ELife*, 8. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.48630>

Ullrich, A., Gray, A., Tam, A. W., Yang-Feng, T., Tsubokawa, M., Collins, C., Henzel, W., le Bon, T., Kathuria, S., & Chen, E. (1986). Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. *The EMBO Journal*, 5(10), 2503. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1986.tb04528.x>

Varadi, M., Anyango, S., Deshpande, M., Nair, S., Natassia, C., Yordanova, G., Yuan, D., Stroe, O., Wood, G., Laydon, A., Zidek, A., Green, T., Tunyasuvunakool, K., Petersen, S., Jumper, J., Clancy, E., Green, R., Vora, A., Lutfi, M., ... Velankar, S.

(2022). AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Research*, 50(D1), D439–D444. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAB1061>

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 and IGF Research*, 20(6), 427–431. <https://doi.org/10.1016/J.GHIR.2010.10.002>

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(5), F63–F75. <https://doi.org/10.1530/ERC-12-0026>

Vega Castro, N., & Reyes, E. (2020). *Introducción al análisis estructural de proteínas y glicoproteínas* (Coordinación de publicaciones - Facultad de Ciencias coopub_fcbog@unal.edu.c, Ed.; 1st ed.). Centro Editorial de la Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, Editado por la Centro Editorial de la Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá,.

Venkatraman, V., Yang, Y. D., Sael, L., & Kihara, D. (2009). Protein-protein docking using region-based 3D Zernike descriptors. *BMC Bioinformatics*, 10. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-407>

Vigneri, R., Sciacca, L., & Vigneri, P. (2020). Rethinking the Relationship between Insulin and Cancer. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 31(8), 551–560. <https://doi.org/10.1016/J.TEM.2020.05.004>

Wang, F., Carabino, J. M., & Vergara, C. M. (2003). Insulin glargine: a systematic review of a long-acting insulin analogue. *Clinical Therapeutics*, 25(6), 1541–1577. [https://doi.org/10.1016/S0149-2918\(03\)80156-X](https://doi.org/10.1016/S0149-2918(03)80156-X)

Ward, Garrett, & Lou, et al. (2013). *The Structure of the Type 1 Insulin-Like Growth Factor Receptor - Madame Curie Bioscience Database - NCBI Bookshelf*. Madame Curie Bioscience Database [Internet]. Austin (TX): Landes Bioscience. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6216/>

Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F. T., De Beer, T. A. P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., & Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W296–W303. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKY427>

Webb, B., & Sali, A. (2016). Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER. *Current Protocols in Bioinformatics*, 54, 5.6.1-5.6.37. <https://doi.org/10.1002/CPBI.3>

Werner, T., Morris, M. B., Dastmalchi, S., & Church, W. B. (2012). Structural modelling and dynamics of proteins for insights into drug interactions. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(4), 323–343. <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2011.11.011>

White, M. F., & Kahn, C. R. (2021). Insulin action at a molecular level – 100 years of progress. *Molecular Metabolism*, 52, 101304. <https://doi.org/10.1016/J.MOLMET.2021.101304>

Whittaker, J., Groth, A. v., Mynarcik, D. C., Pluzek, L., Gadsbøll, V. L., & Whittaker, L. J. (2001). Alanine Scanning Mutagenesis of a Type 1 Insulin-like Growth Factor Receptor Ligand Binding Site *. *Journal of Biological Chemistry*, 276(47), 43980–43986. <https://doi.org/10.1074/JBC.M102863200>

Whittaker, J., & Whittaker, L. (2005). Characterization of the functional insulin binding epitopes of the full-length insulin receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(22), 20932–20936. <https://doi.org/10.1074/JBC.M411320200>

Whittaker, L., Hao, C., Fu, W., & Whittaker, J. (2008). High-Affinity Insulin Binding: Insulin Interacts with Two Receptor Ligand Binding Sites†. *Biochemistry*, 47(48), 12900–12909. <https://doi.org/10.1021/BI801693H>

Williams, C. J., Headd, J. J., Moriarty, N. W., Prisant, M. G., Videau, L. L., Deis, L. N., Verma, V., Keedy, D. A., Hintze, B. J., Chen, V. B., Jain, S., Lewis, S. M., Arendall, W. B., Snoeyink, J., Adams, P. D., Lovell, S. C., Richardson, J. S., & Richardson, D. C. (2018). MolProbity: More and better reference data for improved all-atom structure validation. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 27(1), 293–315. <https://doi.org/10.1002/PRO.3330>

Williams, P. F., Mynarcik, D. C., Gui Qin Yu, & Whittaker, J. (1995). Mapping of an NH-terminal Ligand Binding Site of the Insulin Receptor by Alanine Scanning Mutagenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 270(7), 3012–3016. <https://doi.org/10.1074/JBC.270.7.3012>

Xu, Y., Kong, G. K. W., Menting, J. G., Margetts, M. B., Delaine, C. A., Jenkin, L. M., Kiselyov, V. v., de Meyts, P., Forbes, B. E., & Lawrence, M. C. (2018). How ligand binds to the type 1 insulin-like growth factor receptor. *Nature Communications* 2018 9:1, 9(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03219-7>

Yamaguchi, Y., Flier, J. S., Benecke, H., Ransil, B. J., & Moller, D. E. (1993). Ligand-binding properties of the two isoforms of the human insulin receptor. *Endocrinology*, 132(3), 1132–1138. <https://doi.org/10.1210/EN.132.3.1132>

Ye, L., Maji, S., Sanghera, N., Gopalasingam, P., Gorbunov, E., Tarasov, S., Epstein, O., & Klein-Seetharaman, J. (2017). Structure and dynamics of the insulin receptor: implications for receptor activation and drug discovery. *Drug Discovery Today*, 22(7), 1092–1102. <https://doi.org/10.1016/J.DRUDIS.2017.04.011>

Yuriev, E., & Ramsland, P. A. (2013). Latest developments in molecular docking: 2010-2011 in review. *Journal of Molecular Recognition*, 26(5), 215–239. <https://doi.org/10.1002/JMR.2266>

Zhang, L. I., & Skolnick, J. (1998). What should the Z-score of native protein structures be? *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 7(5), 1201. <https://doi.org/10.1002/PRO.5560070515>

Zhang, X., Yu, D., Sun, J., Wu, Y., Gong, J., Li, X., Liu, L., Liu, S., Liu, J., Wu, Y., Li, D., Ma, Y., Han, X., Zhu, Y., Wu, Z., Wang, Y., Ouyang, Q., & Wang, T. (2020). Visualization of Ligand-Bound Ectodomain Assembly in the Full-Length Human IGF-1

Receptor by Cryo-EM Single-Particle Analysis. *Structure*, 28(5), 555-561.e4.

<https://doi.org/10.1016/J.STR.2020.03.007>