



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA

CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA

Tema: Estudios bioinformáticos para la identificación de posibles dianas terapéuticas en la enfermedad de *Esclerosis Lateral Amiotrófica* (ELA)

Trabajo de Titulación, Modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniero Bioquímico, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Autor: Iván Gabriel López Pérez

Tutor: Ing. Cristian Fernando Galarza Galarza, MSc.

Ambato-Ecuador

Septiembre-2021

APROBACIÓN DEL TUTOR

MSc. Cristian Fernando Galarza Galarza

CERTIFICA

Que el presente trabajo de titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Trabajo de Titulación bajo la modalidad de Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería de Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 29 de julio del 2021.

MSc. Cristian Fernando Galarza Galarza

C.I: 1803160272

TUTOR

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Iván Gabriel López Pérez, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniero Bioquímico, son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas bibliográficas.



Iván Gabriel López Pérez

C.I. 1722825344

AUTOR

APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Docentes Calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación, de la modalidad proyecto de investigación el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:

.....

Presidente del Tribunal

.....

Dra. Lorena De los Ángeles Núñez Villacís

C.I 1804256905

.....

Mg. Juan De Dios Espinoza Moya

C.I 1803201431

Ambato, 26 de agosto del 2021

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Trabajo de Titulación o parte de él, como documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Trabajo de Titulación, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



Iván Gabriel López Pérez

C.I. 1722825344

AUTOR

DEDIDACTORIA

En especial a mi madre y hermana por ser las personas que han estado en cada etapa de mi vida, enseñándome que las cosas se consiguen con esfuerzo y dedicación, inculcándome valores para ser una mejor persona, por estar siempre dispuesta a apoyarme en las decisiones que he tomado, repitiéndome la frase “no le te más al éxito”.

A mis abuelos, Alcides y María por ser un pilar fundamental en mi vida, quienes me han convertido en la persona que soy, brindándome el apoyo cada vez que los he necesitado.

A mis tíos, Ricardo, Ramiro, Luis, William, Fabián y Christian, quienes a través de sus consejos me motivan a seguir adelante y han estado prestos a escucharme y me motivan cumplir mis metas.

AGRADECIMIENTO

En primer lugar, agradezco a Dios por estar en cada uno de los momentos más difíciles en mi vida, brindándome fortaleza y sabiduría al momento de tomar decisiones.

A la Facultad de Ciencias e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología, carrera de Ingeniería Bioquímica por brindarme las pautas y fortalecer mis valores, a través de los excelentes profesores que tuve el agrado de conocer.

Agradezco a mi tutor de tesis MSc. Christian Galarza quien ha sabido guiarme en todo el proyecto a través de su conocimiento, para que el trabajo se logre de la mejor manera y apoyándome para adquirir más habilidades, siempre mostrando profesionalismo, compromiso y amabilidad.

Un agradecimiento especial a Anahy Bejarano quien me apoyó durante mi vida estudiantil, dispuesta a estrechar su mano en los momentos más difíciles, brindándome el apoyo moral y consejos para continuar con mis objetivos.

A mis amigos Kevin, Elizabeth, Bryan y Kevin C. que se han convertido en mi segunda familia, con los que he compartido desvelos, estrés, aventuras y siempre han estado presente, brindándome el apoyo moral.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

A. PAGINAS PRELIMINARES

APROBACIÓN DEL TUTOR	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN.....	iii
APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO	iv
DERECHOS DE AUTOR	v
DEDIDACTORIA	vi
AGRADECIMIENTO	vii
RESUMEN	xii
ABSTRACT.....	xiii
CAPÍTULO I	14
MARCO TEÓRICO.....	14
1.1 Antecedentes investigativos.....	14
1.1.1 Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA)	14
1.1.2 Mecanismos Moleculares de ELA	15
1.1.3 Enfoques terapéuticos	17
1.1.4 Bioinformática	20
1.2 Objetivos	23
1.2.1 Objetivo general.....	23
1.2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	23
CAPÍTULO II.....	24
METODOLOGÍA	24
2.1 Materiales y equipos	24
2.1.1 Materiales.....	24
2.1.2 Equipos	24
2.2 Métodos.....	24
2.2.1 Selección de bibliografía.....	24
2.2.2 Selección de genes	26
2.2.3 Integración de los datos.....	26
2.2.4 Validación de genes seleccionados	27
2.2.5 Prueba de viabilidad de las dianas terapéuticas	27
2.2.6 Búsqueda de moléculas que podrían interaccionar con las dianas.....	28

2.2.7 Cribado Virtual	28
2.2.8 Análisis de la toxicidad de las moléculas.....	29
CAPÍTULO III.....	30
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
3.1 Análisis y discusión	30
3.1.1 Análisis de la Esclerosis Lateral Amiotrófica.....	30
3.1.2 Análisis de las bases de datos	31
3.1.3 Análisis de la integración de datos.....	41
3.1.4 Análisis de la validación de los genes seleccionados.....	47
3.1.5 Prueba de viabilidad de las dianas terapéuticas	49
3.1.6 Análisis de interacción molecular	52
3.1.7 Análisis de la toxicidad de las moléculas.....	56
CAPÍTULO IV.....	58
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	58
4.1 Conclusiones	58
4.2 Recomendaciones	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ruta molecular de la ELA en la base de datos KEGG (Yi et al., 2020) ...	32
Figura 2. Red Biológica de la disfunción causada por estrés oxidativo	42
Figura 3. Red Biológica con atributos del transporte axonal.....	43
Figura 4. Red biológica de agregación de proteínas	44
Figura 5. Red Biológica de la excitotoxicidad.....	45
Figura 6. Estructura 3D de la proteína Transitional endoplasmic reticulum ATPase (VCP) con el mejor sitio drugable.	51
Figura 7. Estructura 3D de la proteína Vesicle-associated membrane protein-associated protein B/C (VAPB) con el mejor sitio drugable	52
Figura 8. Dimension de la Grid del sitio más drugable de la proteína Transitional endoplasmic reticulum ATPase (VCP)	53

Figura 9.Dimensión de la Grid del sitio más drugable de la proteína Vesicle-associated membrane protein-associated protein B/C (VAPB)..... 55

Figura 10. Interacción entre la proteína y el la molécula del fármacoAstemizole.... 56

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Genes relevantes involucrados en la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) 33

Tabla 2. Genes relevantes implicados en la Esclerosis Lateral Amiotrófica 40

Tabla 3. Atributos de las redes biológicas 45

Tabla 4. Evaluación de dianas y fármacos asociados a los genes mutados en ELA. 47

Tabla 5. Valores de drugabilidad de las posibles dianas terapéuticas..... 50

Tabla 6. Fármacos asociados a los dominios de las proteínas VCP y VABP 54

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Entradas de la base de datos MalaCards 69

Anexo 2. Listado de genes agrupados en series fenotípicas en la base de datos OMIM 69

Anexo 3. Lista de genes agrupados en la base de datos Harmonizome..... 70

Anexo 4. Genes élite en la base de datos MalaCards 70

Anexo 5 Red Biológica con atributos del estrés oxidativo 71

Anexo 6. Expresión de genes aplicando Hierarchical Cluster en el estrés oxidativo 71

Anexo 7. Expresión de genes aplicando Cluster K-means en el estrés oxidativo 72

Anexo 8. División de zonas en función de la expresión de genes aplicando Cluster K-means en el estrés oxidativo..... 72

Anexo 9. Expresión de genes aplicando Hierarchical Cluster en el transporte axonal 73

Anexo 10. Expresión de genes aplicando Cluster K-means en el transporte axonal.	73
Anexo 11. División de zonas en función de la expresión de genes aplicando Cluster K-means en el transporte axonal.....	74
Anexo 12. Expresión de genes aplicando Hierarchical Cluster en la agregación de proteínas.....	74
Anexo 13. Expresión de genes aplicando Cluster K-means en la agregación de proteínas.....	75
Anexo 14. División de zonas en función de la expresión de genes aplicando Cluster K-means en la agregación de proteínas.....	75
Anexo 15. Expresión de genes aplicando Hierarchical Cluster en la excitotoxicidad.....	76
Anexo 16. Expresión de genes aplicando Cluster K-means en la excitotoxicidad....	76
Anexo 17. División de zonas en función de la expresión de genes aplicando Cluster K-means en la excitotoxicidad.....	77
Anexo 18. Plataforma DrunkBank.....	77
Anexo 19. Medicamentos asociados a al gen Transitional endoplasmic reticulum ATPase (VCP).....	78
Anexo 20. Base de datos Proteins Plus.....	78
Anexo 21. Posición de la Grid del sitio más drugable de la proteína Vesicle-associated membrane protein-associated protein B/C (VAPB).....	79
Anexo 22. Análisis fisicoquímicos en el paquete VEGA.....	79
Anexo 23. Análisis realizados mediante el paquete web pkCSM del fármaco.....	80
Anexo 24. Análisis realizados mediante el paquete web pkCSM del fármaco.....	80

RESUMEN

La identificación de nuevas dianas terapéuticas para la enfermedad de ELA se basa en el diseño de fármacos asistido por computadora (CADD) mediante el análisis de genes como el VCP y VABP frente a la base de datos Drugs-lib, permitiendo analizar el mejor sitio de acción de las proteínas mediante un cribado virtual para comprobar la drugabilidad que poseen.

Se analiza las bases de datos, tales como MalaCards, OMIM, Harmonizome y KEGG para visualizar los genes relevantes de la enfermedad. Así, se escoge los genes elite que tienen correlación entre ellos, estos se agrupan de acuerdo con su disfunción. Además, se crean redes biológicas, estas son validadas con la base de datos DrugBank. A continuación, se analiza la ruta metabólica de los genes que siguen las mutaciones del gen SOD1 y se identifican los dominios más drugables. Finalmente, se analiza las propiedades toxicológicas de los fármacos enlazados.

La búsqueda de dianas terapéuticas que interactúen con fármacos es el objetivo del presente estudio. Los resultados obtenidos mediante el cribado virtual permiten la identificación de fármacos que pueden tener efectos sobre la enfermedad, estos son: Saquinavir y Astemizole, que están asociados a los genes VCP y VABP, respectivamente. El fármaco Astemizole presenta mejores propiedades QSAR.

La importancia del presente estudio es la identificación de los genes con mayor relevancia y la búsqueda de dianas terapéuticas en la Esclerosis Lateral Amiotrófica. La información obtenida podría ser utilizada como punto de partida para la investigación de nuevos fármacos para contrarrestar la neurodegeneración.

Palabras clave: Bioinformática, cribado virtual, Esclerosis Lateral Amiotrófica, diseño de fármacos, acoplamiento molecular.

ABSTRACT

The identification of new therapeutic targets for ALS disease is based on computer-aided drug design (CADD) by analyzing genes such as VCP and VABP against the Drugs-lib database, allowing the best site of action of proteins to be analyzed by virtual screening for drugability.

Databases such as MalaCards, OMIM, Harmonizome and KEGG are analyzed to visualize the relevant disease genes. Elite genes that correlate with each other are chosen and grouped according to their dysfunction. In addition, biological networks are created and validated with the DrugBank database. Next, the metabolic pathway of the genes that follow the SOD1 gene mutations is analyzed and the most druggable domains are identified. Finally, the toxicological properties of the linked drugs are analyzed.

The search for drug-interacting therapeutic targets is the aim of the present study. The results obtained through virtual screening allow the identification of drugs that may have effects on the disease, these are: Saquinavir and Astemizole, which are associated with the VCP and VABP genes, respectively. The drug Astemizole has better QSAR properties.

The importance of the present study is the identification of the most relevant genes and the search for therapeutic targets in Amyotrophic Lateral Sclerosis. The information obtained could be used as a starting point for research into new drugs to counteract neurodegeneration.

Key words: Bioinformatics, virtual screening, Amyotrophic Lateral Sclerosis, drug design, molecular docking.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes investigativos

1.1.1 Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA)

Las enfermedades neuronales han sido caracterizadas por pérdidas progresivas de neuronas en diferentes áreas del sistema central nervioso. En algunos casos ocurre de forma esporádica o a través factores hereditarios. La Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) se considera una enfermedad neurodegenerativa, que afecta a las neuronas motoras superiores e inferiores, agrupadas en la corteza cerebral y la médula espinal, causando dificultad de movilidad, disturbios oculares, disartria, disfagia y dificultad respiratoria (**Morimoto et al., 2019**). Además, se presentan problemas para masticar, tragar y hablar. A pesar de la búsqueda de dianas terapéuticas contra dichos trastornos, el resultado continúa siendo negativo.

1.1.1.1 Epidemiología

Aproximadamente, dos de cada 100.000 personas son afectadas por la ELA en Estados Unidos y Europa cada año (**Valko & Ciesla, 2019**). En América Latina se ha venido estudiando la enfermedad durante varios años, encontrándose una tasa de mortalidad por ELA menor en comparación con otros países. Un estudio realizado en Cuba determinó una tasa de afección de 0,55 de 100.000 personas por año (**Zaldivar et al., 2009**). Por otro lado, Ecuador presenta una de las tasas más bajas de afección en Latinoamérica, siendo la incidencia de 0,2 a 0,6 por 100.000 personas corroborando estudios previos.

Después del primer diagnóstico los pacientes con ELA mueren en un periodo de 3 a 5 años. Dependiendo de la causa, ELA se clasifica como Esclerosis Lateral Amiotrófica esporádica (SALS) o Esclerosis Lateral Amiotrófica familiar (FALS). En la mayoría de casos de SALS, se desconoce el origen de la enfermedad y representan un 90 % de todos los casos; la edad media de pacientes con la enfermedad es de 68 años (**Ralli et**

al., 2019). En el caso de FALS, los pacientes adquirieron la enfermedad de forma y representan el 10 % restante;- empieza a una edad más temprana (52 años) (**Zaldivar et al., 2009**); identificándose mutaciones en más 50 genes. Las mutaciones más comunes se han encontrado en los genes de C9orf72, TARDBP, FUS and SOD1 (**Hardiman et al., 2017**). Además, ciertos factores contribuyen a adquirir la enfermedad mediante la exposición a metales, pesticidas, radiación, fumar y actividad física. Según **Kiernan et al. (2011)** las actividades físicas que involucran lesiones en la cabeza están relacionadas con ELA.

1.1.2 Mecanismos Moleculares de ELA

Diferentes vías moleculares se encuentran involucradas en el desarrollo neurodegenerativo de ELA, siendo la excitotoxicidad, generación de radicales libres, agregación de proteínas citoplasmáticas, mutaciones enzimáticas de superóxido dismutasa (SOD1), disfunción mitocondrial y disrupción de procesos de transporte axonal (**Valko & Ciesla, 2019**) los más importantes.

1.1.2.1 Excitotoxicidad

La excitotoxicidad mediada por células gliales es causada principalmente por la desregulación de la señalización glutamatérgica (mediante un exceso de calcio intracelular) y alteraciones neuronales (**King et al., 2016**). El glutamato está ubicado en sistema nervioso central, cumpliendo la función de estimulante neuronal que se libera mediante vesículas neurotransmisoras. El glutamato liberado se une a varios canales de iones unidos a ligandos o a receptores metabotrópicos (GPCR) (**Kuzma-Kozakiewicz & Kwiecinski, 2011**). La eliminación del glutamato es uno de los pasos cruciales en la fisiología cerebral normal. Los astrocitos cuentan con transportadores del glutamato como por ejemplo el transportador de aminoácidos excitatorios 2 (EAAT2) el cual es un transportador de alta afinidad dependiente de Na⁺ (**Foran & Trotti, 2009**). Varios estudios han identificado niveles bajos de estos transportadores en la médula espinal y corteza cerebral de pacientes con ELA debido al proceso atípico del transcrito del ARNm de EAAT2 (**Bruijn & Cudkowicz, 2006**). Esta alteración en EAAT2 causa un incremento del glutamato y conlleva a la generación y muerte neuronal. Según **Valko et al. (2019)** los niveles de glutamato se ven incrementados tres veces en 80% de los pacientes en comparación con los pacientes control.

1.1.2.2 Disfunción mitocondrial

La mitocondria es responsable de la producción de ATP, generación de especies reactivas de oxígeno, regulación de apoptosis y niveles de calcio. Sin embargo, alteraciones presentes en la mitocondria pueden alterar la producción de energía en las neuronas y provocar la muerte celular. Según **Batra et al. (2019)** los biomarcadores más importantes de la disfunción mitocondrial son las enzimas succinato deshidrogenasa y citocromo c oxidasa. Varios estudios realizados en pacientes con ELA señalan que existe deficiencia de la enzima citocromo c oxidasa.

1.1.2.3 Agregación de proteínas

La agregación de proteínas se caracteriza por un mal plegamiento, alterando las funciones motoras neuronales (**De Paula et al., 2015**). Estos agregados pueden ser tóxicos y afectan a organelos como la mitocondria provocando disrupción de la membrana celular. Por esta razón, varios estudios señalan que la eliminación de estos agregados podrían ser una solución terapéutica contra ELA. Debido al exponente desarrollo de técnicas genéticas, varias proteínas han sido identificadas, involucradas en la fisiología de ELA. Algunos componentes moleculares o proteínas como OPTN, TDP43, FUS, C9ORF72 y UBQLN2 (ubiquitina 2) se encuentran relacionados con la agregación de proteínas (**Blokhuis, 2013**). Choques térmicos regulan el correcto plegado de dichas proteínas y cualquier alteración en la expresión de estas produce mal plegamiento y acumulación de las proteínas (**Batra et al., 2019**).

1.1.2.4 Estrés oxidativo

El incremento de concentración e inmunorreactividad de 3 nitrotirosina (3-NT) han sido identificados como marcadores de estrés oxidativo, ubicados en la médula espinal lumbar y torácica de pacientes que padecen SALS (**Okada et al., 2018**). Según **Valko et al. (2019)** el incremento de la óxido nítrico sintasa (NOS) produce una mayor concentración de óxido nítrico (NO) y por lo tanto provocan la muerte celular. Diferentes autores sugieren que dichas alteraciones no inician la muerte neuronal, sin embargo, contribuyen a la propagación del proceso neurodegenerativo.

1.1.2.5 Células Gliales

En ELA, la excitotoxicidad se encuentra mediada por células gliales las cuales están comprendidos por astrocitos, oligodendrocitos y microglía. Principalmente, los astrocitos regulan el intercambio de agua, iones, neurotransmisores y varios metabolitos (**Ban et al., 2019**); cumpliendo con funciones neuroprotectoras. Además, son subtipos de células gliales más abundantes dentro del sistema nervioso central, comportándose como sensores primarios (**Liddel et al., 2017**). A través del daño neuronal, la microglía libera especies reactivas de oxígeno, citoquinas proinflamatorias y moléculas neurotóxicas (**Lasiene & Yamanaka, 2011**), llevando a la muerte neuronal. Según **Wang et al. (2020)** los macrófagos expresan ciclo oxigenasa 2 y óxido nítrico en gran cantidad, donde las células neuronales son fagocitadas por la infiltración de macrófagos.

Un biomarcador de ELA son las células gliales atípicas, estas presentan sensibilidad a los inhibidores de tirosina quinasa que se dirigen a la familia de receptores del factor de crecimiento de tipo III, incluyendo PDGF-R, c-Kit, FLT3 y CSF-1R (**Trias et al., 2016**). Es así como la inhibición de los receptores de quinasa podría regular la neuroinflamación y disminuir propagación de la enfermedad.

1.1.3 Enfoques terapéuticos

Al no existir una terapia exitosa para pacientes que padecen ELA, se han sugerido varias hipótesis relacionadas a la disfunción causada por el estrés. Según **Franklin et al. (2012)** el sistema de respuesta al estrés involucra varias rutas de señalización conservativa, que ha evolucionado para proteger a las neuronas de diferentes tipos de estrés biológico. Por esta razón se han desarrollado fármacos que permiten estimular algunas de estas vías y como resultado la generación de resiliencia celular.

1.1.3.1 Compuestos que previenen la excitotoxicidad

Se han investigado nuevas hipótesis dando lugar al desarrollo de medicamentos neuroprotectores que bloquean el proceso excitotóxico. Medicamentos como Riluzol, se han sido utilizados para reducir la toxicidad del glutamato en el sistema nervioso central. Es el único fármaco disponible que puede prolongar la supervivencia de los

pacientes con ELA, demostrando que el tiempo de supervivencia incrementa desde 11 hasta 14 meses (**Ralli et al., 2019**). Incertidumbres relacionadas con el mecanismo de acción de este fármaco dificultan los intentos de diseñar un medicamento que aumente la esperanza de vida. Estudios realizados indican que el Riluzol bloquea los canales de sodio sensibles a la tetrodotoxina, reduciendo el paso de calcio y la estimulación de los receptores de glutamato (**Sala et al., 2019**). Sin embargo, no se ha demostrado un efecto directo del antioxidante del fármaco.

1.1.3.2 Compuestos que actúan en la expresión génica de superóxido dismutasa (SOD1)

El 20 % de los casos de FALS causan mutaciones en el gen que codifica la superóxido dismutasa de Cu/Zn (SOD1), ubicándose en el cromosoma 21 (**Kuzma-Kozakiewicz & Kwiecinski, 2011**). Sin embargo, se ha identificado que las mutaciones de SOD1 no solo se involucran con ELA, sino en varias enfermedades neuronales.

Fármacos como 1,3 difenilurea ha sido utilizado para reducir la expresión de **SOD1** (**Valko & Ciesla, 2019**). Por otro lado, mediante modelamiento se han usado complejos de SOD y dopamina para buscar nuevas dianas terapéuticas. Estudios de acoplamiento molecular revelan que la tetrahidrostilbena y hespiridina tienen alta afinidad hacia SOD (**Sehgal et al., 2018**); el cual puede ser usado como potencial agente para desarrollar nuevos fármacos.

1.1.3.3 Compuestos que previenen la disfunción mitocondrial

La disfunción mitocondrial juega un papel importante en varias enfermedades neurodegenerativas. **Batra et al. (2019)** señala que algunos fármacos, utilizados para tratar la enfermedad de Parkinson pueden ayudar en el tratamiento de ELA ya que disminuyen el consumo de oxígeno e incrementan la producción de ATP. Uno de los medicamentos se denomina Dextrometorfano que al combinarse con quinidina, bloquea la actividad enzimática del citocromo P450 provocando su desmetilación (**Smith et al., 2017**). Así mismo, otro compuesto que ha ganado interés en la estabilización de la mitocondria se denomina Melatonina. La melatonina disminuye la liberación del citocromo c, activación y retrasa la progresión de la enfermedad (**Muyderman & Chen, 2014**). Dichos fármacos han mostrado gran potencial para

retrasar la enfermedad, sin embargo, es necesario realizar más estudios con el fin de comprender completamente el mecanismo de acción.

1.1.3.4 Compuesto que afecta la agregación de proteínas

El choque térmico de proteínas actúa como mecanismo de defensa celular con efectos neuroprotectores contra agregados (Valko & Ciesla, 2019). Arimoclomol ha sido reconocido como fármaco que actúa induciendo choques térmicos, demostrando retrasar la enfermedad (Benatar et al., 2018). Varios estudios han mostrado que el uso de este medicamento mejora la supervivencia de neuronas motoras, usando ratones SOD-1^{G93A} como modelos para la administración del fármaco (Hergesheimer et al., 2020).

1.1.3.5 Compuestos antioxidantes que alteran la actividad de la peroxidasa

Según Fujisawa et al. (2016) Edaravone es un derivado de la 2-pirazolina-5-ona con un grupo fenil en la posición 1 y un grupo metilo en la posición 3, el cual es sintetizado a través de la reacción de fenilhidrazina y ester acetoacético. Dicho fármaco es utilizado para el tratamiento degenerativo neuronal y actúa mediante la supresión de la hiperoxidación lipídica (Valko & Ciesla, 2019). Estudios bioquímicos señalan que el efecto de Edaravone elimina peroxinitrito así como radicales piróxilo de los lípidos, revelando gran efecto terapéutico en pacientes con ELA etapa inicial (Okada et al., 2018).

1.1.3.6 Componentes estimulantes de microglía o macrófagos

Es posible que la estimulación de los macrófagos pueda reducir inflamaciones y la progresión de ELA en el sistema neuronal central. Una nueva molécula denominada NP001 ha sido identificada como regulador de los macrófagos (Batra et al., 2019). Mediante herramientas genéticas es posible eliminar el gen SOD1, incrementando la supervivencia y disminuyendo la progresión de la muerte celular (Liddelow et al., 2017). Así mismo, un extracto medicinal denominado *Withania somnifera* (Ashwagandha), el cual tiene efectos antiinflamatorios reduce la actividad de NF-Kb (Ban et al., 2019).

Un ejemplo de inhibidor de la tirosina quinasa se denomina masitinib, el cual es un gran inhibidor altamente selectivo de la quinasa (**Anastassiadis et al., 2011**); se ha demostrado que previene neuroinflamación en ELA y varias enfermedades neurodegenerativas. Según **Trias et al. (2016)** masitinib reduce microgliosis y la aparición de células gliales aberrantes, mostrando un efecto protector cuando el fármaco se administra después de la parálisis.

1.1.3.7 Tratamiento con cloridrato de ropinirol

Cloridrato de ropinirol es un estimulador de receptores de la dopamina con una estructura química de alcaloide no ergótico (**Morimoto et al., 2019**). Dicho fármaco ha sido utilizado en la enfermedad de Parkinson, mostrando efectos positivos en la estimulación de receptores de la dopamina y propiedades neuroprotectoras. Dado que las mitocondrias son fuente especies de oxígeno reactivas, moléculas catiónicas dirigidas a la mitocondria con actividad antioxidante como el ropinirol muestran ser agentes protectores de las mitocondrias en ELA (**Okano et al., 2020**).

1.1.4 Bioinformática

La bioinformática se ha convertido en una herramienta muy utilizada en los últimos años. A través del análisis computacional, se realizan modelamientos matemáticos de secuencias biológicas, almacenamiento de datos de ADN con la finalidad de identificar posibles mecanismos detrás de enfermedades humanas, animales y plantas. Además, la bioinformática comprende diferentes disciplinas de la ciencia como genómica, transcriptómica, proteómica y filogenética molecular. De la misma forma, es utilizada en el descubrimiento de fármacos que son comparados entre pacientes que portan la enfermedad frente a controles. Según **Xia (2017)**, el objetivo es comparar los síntomas de las enfermedades asociados a las mutación genética, modificaciones epigenética y otros factores ambientales que regulan la expresión del gen. Así mismo, la identificación de nuevas dianas puede eliminar o predecir el mal funcionamiento celular.

1.1.4.1 Diseño de fármacos asistido por computadora

El diseño de fármacos asistido por computadora (CADD) por sus siglas en inglés, llamado también diseño molecular asistido por computadora es una de las herramientas

más utilizadas el proceso de diseño de medicamentos, en el que se utiliza diferentes programas computacionales. Además, el campo de la bioquímica, biología molecular y biología celular, asistidas por el desarrollo de la genómica y proteómica, han permitido identificar gran número de dianas terapéuticas biológicas (**Jain, 2017**). Los métodos computacionales del diseño de fármacos se basan en que los compuestos farmacológicamente activos actúan por la interacción con la diana, estos pueden ser proteínas o nucleótidos (**Choudhary et al., 2011**). Por otro lado, algunas estrategias para CADD pueden variar, dependiendo de la información disponible de la diana o ligando. Las técnicas de CADD ayudan a la obtención de información acerca de la proteína que puede ser dirigida en una enfermedad y los posibles ligandos que pueden inhibir estas proteínas. Según **Metwally & Hathout (2015)**, la aplicación de CADD acelera el proceso de desarrollo de fármacos, optimiza e identifica nuevos medicamentos a través del descubrimiento de información química y biológica sobre los posibles ligandos o dianas; y utiliza simulación para eliminar compuestos que tienen propiedades indeseables y selecciona los mejores candidatos.

1.1.4.1.1 Proyección virtual o virtual screening

La proyección virtual es una técnica utilizada para el descubrimiento de fármacos *in silico*, en el que las bases de datos de estructuras 3D, son evaluadas bajo este método. A través del uso de esta técnica, se espera que las moléculas sean más susceptibles al enlazamiento de la diana. Por lo tanto, el virtual screening ayuda en la identificación de los mejores resultados para enlazar al receptor ubicado en la proteína o enzima y solo estas serán sintetizadas. Adicionalmente, la proyección virtual identifica componentes que pueden ser tóxicos o presentar propiedades desfavorables como la afinidad, selectividad, absorción, metabolismo, viabilidad (**Hassan et al., 2017**).

1.1.4.2 Docking o acoplamiento molecular

Mediante diferentes metodologías es posible identificar la interacción entre pequeños ligandos y la molécula objetivo, determinando si puede comportar como sitio de unión de dos o más moléculas constituyentes con una estructura determinada (**Menchaca et al., 2013**). Varios programas basados en diferentes algoritmos han sido desarrollados para realizar estudios de acoplamiento molecular. El proceso de acoplamiento se divide en tres partes: preparación del ligando y las macromoléculas, definición del tipo de

acoplamiento (rígido o flexible) y establecer la estrategia de búsqueda para la conformación del ligando (sistemático o estocástico) **(Prieto-Martínez et al., 2018)**.

1.1.4.2.1 Preparación del ligando y proteínas

En primer lugar, es considerable obtener la estructura proteica, preferiblemente estructuras tridimensionales con alta resolución y afinidad a ligandos o sustratos naturales. Estas pueden encontrarse en la base de datos de proteínas (PDB), sin embargo, en algunas ocasiones la información contenida en los archivos es insuficientes y necesita ser corregida **(Halperin et al., 2002)**. Diferentes software pueden ser utilizados para dicha acción, según **Feher et al. (2012)** es importante comparar los resultados del acoplamiento usando el mismo protocolo de preparaciones para todos los cálculos del acoplamiento. Además, el proceso de preparación del ligando y la proteína debe realizarse por separado.

1.1.4.2.2 Acoplamiento flexible o rígido

A continuación de la preparación del ligando, se debe elegir el tipo de acoplamiento. En el caso del acoplamiento flexible, los residuos son seleccionados para determinar el cálculo de la energía mediante herramientas bioinformáticas como Vina, Autodock, ICM, MOE **(Prieto-Martínez et al., 2018)**. A través de este proceso ocurre el ablandamiento y permite la flexibilidad del residuo e interacción con el ligando. Ambos se encuentran para cambiar la conformación y obtener un encaje perfecto utilizando la mínima energía **(Khan et al., 2018)**.

En el caso del acoplamiento rígido, no se permite la alteración espacial que interactúan durante el modelado molecular **(Agarwal & Mehrotra, 2016)**. Según **Schweiker et al. (2020)** los algoritmos que buscan el acoplamiento rígido tratan al sitio objetivo como rígido e inmóvil y enlazan al ligando dentro de una cavitación predefinida. Es decir, las estructuras del ligando y la proteína no sufren cambios conformacionales al momento de interactuar entre ellas. Sin embargo, ocurren cambios en la rotación y traslación de ambas moléculas. El algoritmo más común para realizar el acoplamiento es un receptor rígido y un ligando flexible **(Gaba et al., 2015)**

1.1.4.2.3 Funciones de puntuación

La fuerza de interacción del ligando dependerá de la selección del algoritmo de acoplamiento y drugabilidad del dominio, donde se realizará una búsqueda conformacional y una selección de la solución óptima en función de la puntuación (Prieto-Martínez et al., 2018). En esta etapa se evalúa la interacción entre el fármaco y la proteína. Adicionalmente, en este proceso ocurren un gran número de conformaciones que involucran la variación de la estructura del ligando, según Khan et al. (2018) estas puede ser internamente (rotación del ángulo de torsión) o externamente (rotaciones y traducciones). Dichas conformaciones generan energía que puede ser calculada como energía total del sistema, con la finalidad de identificar la unión del complejo ligando-proteína con la menor energía posible.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo general

- Utilizar técnicas bioinformáticas para encontrar nuevas dianas terapéuticas para la enfermedad de ELA que puedan servir como base para la investigación y desarrollo de nuevos fármacos.

1.2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Comprender las bases genéticas y moleculares de la ELA.
- Buscar las posibles dianas terapéuticas en las bases de datos biológicas OMIM, KEGG, MalaCards y Harmonizome.
- Diseñar las redes biológicas para los genes que presentan variaciones genéticas asociadas a la enfermedad mediante Cytoscape (GeneMania).
- Validar e identificar los genes seleccionados en la base de datos DrugBank.
- Comprobar la viabilidad de las dianas terapéuticas basados en la estructura molecular mediante la base de datos Proteins Plus.
- Identificar las moléculas que podrían interaccionar con los dominios seleccionados para seleccionar compuestos bioactivos que se utilizarán en el descubrimiento de nuevos fármacos mediante Autodocktools y MTIOpenScreen.

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1 Materiales y equipos

2.1.1 Materiales

- Software para bioinformática:
 - MalaCards
 - OMIM
 - Harmonizome
 - Autodock Vina
 - DrugBank
 - Proteins Plus
 - MTIOpenScreen
 - AutoDockTools
 - Cytoscape (GeneMania)
 - Vega

2.1.2 Equipos

- Computadora personal

2.2 Métodos

2.2.1 Selección de bibliografía

Se utilizó bases de datos como MalaCards, KEGG, OMIM, Harmonizome, NCBI, PubMed para encontrar información acerca de los genes y las disfunciones causadas por ELA.

A continuación, se detalla cada una de las bases de datos:

2.2.1.1 MalaCards

Al ingresar en el buscador se identificó varias entradas relacionadas con la enfermedad, así como otras asociadas a esta. Como punto inicial se escogió la entrada

que presentó mayor puntuación, denominada Amyotrophic Lateral Sclerosis 1 con un puntaje de 229.074 y un MIFTS de 87. El primer valor se obtiene al sumar los algoritmos de base 10 de los recuentos de las anotaciones pobladas y el segundo, hace referencia al nivel de información que tiene cada una de las entradas, siendo 101 el valor máximo (Rappaport et al., 2013).

2.2.1.2 Harmonizome

En la página principal de Harmonizome se observó distintos tipos de entradas de información, entre los que se encuentran conjunto de datos, genes y conjuntos de genes. Al momento de introducir la enfermedad, se realizó con el nombre de la enfermedad en inglés, Amyotrophic Lateral Sclerosis. Al escoger como entrada “genes”, se evidenció que no presentaban un valor referente al nivel de implicación con la enfermedad. De este modo, se especificó un “conjunto de genes” en el buscador, para obtener mayor información de estos. Dentro la tabla generada, se encontró información acerca del nombre completo del gen o proteína, así como, los valores observados se encontraban en un rango entre 1-3, indicando la fuerza relativa de cada asociación funcional. Por este motivo, se procedió a escoger genes que presentaban un valor cercano a 3.

2.2.1.3 OMIM

Para la búsqueda de información en la base de datos OMIM se ingresó el nombre completo de la enfermedad, donde se evidenció diferentes entradas de información, sin embargo, se escogió el primer resultado, denominado Amyotrophic Lateral Sclerosis 1. A continuación se observó que existe una lista que muestra la relación entre el fenotipo y los genes. De igual manera, se observó el tipo de herencia que estos presentan, siendo recesivo y dominante autosomal. Además, al desplegarse la pestaña de fenotipos se generó una lista con genes adicionales relacionados con la enfermedad.

2.2.1.4 KEGG

La base de datos KEGG proporcionó mayor orientación relacionada a las rutas metabólicas que siguen cada uno de los genes. Se ingresó la enfermedad con el nombre en inglés como Amyotrophic Lateral Sclerosis. Posteriormente, se generaron varias entradas, donde se escogió la ruta que sigue la enfermedad. En este caso se encontró

una breve descripción de la enfermedad junto con los genes más implicados. De igual manera, se observó información de varios autores que han aportado en la construcción de la ruta genética.

2.2.2 Selección de genes

La selección de los genes se realizó en función de la puntuación que presenta cada una de las bases de datos mencionadas. Se obtuvo 59 genes que fueron organizados mediante una hoja de cálculo, donde se evidenció el nombre del gen, la disfunción y la puntuación. Al colocarse en orden descendente de acuerdo con la puntuación más alta, se comprobó que existen genes poco relevantes para ser considerados. Por este motivo, se decidió disminuir el número de genes, mediante la agrupación de estos según la disfunción que presentan. Las disfunciones escogidas fueron el estrés oxidativo, agregación de proteínas, altas concentraciones de glutamato y transporte axonal.

2.2.3 Integración de los datos

El software Cytoscape (GeneMania) se empleó para generar hipótesis sobre la función, análisis de listas y priorización de genes para ensayos funcionales (**Montejo et al., 2014**).

Se realizó los siguientes pasos:

- a. Se ingresa en el software los genes mutados según la disfunción molecular.
- b. Genera la red biológica mediante Cytoscape (GeneMania).

Se generó columnas con información de la red localizada en la parte inferior derecha, dentro de dicha lista se encontró el nombre de los genes, los genes de consulta, número de nodos, la puntuación; las columnas restantes hacen referencia al grado de centralidad que presenta cada uno de los genes. En este sentido, los nodos con mejor puntuación y mayor número de interacciones se tonaron de color verde y forma circular. Adicionalmente, se aplicó el plugin *Hierarchical cluster* y se obtuvo un gráfico en el que se generó una agrupación de genes mediante un dendograma, el cual indicaba el orden de agrupación efectuado de forma jerárquica, donde el grupo más representativo se encontraba de color verde. De la misma manera, la función *K-Means*

cluster genera un gráfico donde se agrupan los genes con similar puntuación. Finalmente, la selección de genes se realizó en función del score y el número de nodos más elevado.

2.2.4 Validación de genes seleccionados

Se utilizó como base de datos DrugBank para buscar información acerca de los medicamentos y las funciones que cumplen, ingresando el nombre de los genes y especificando que se busca información acerca de las dianas. Se encontró varias entradas de medicamentos enlazadas a proteínas. Cada entrada tiene varios campos de datos entre ellos los ensayos realizados, los targets y las fases de experimentación en la que se encuentra. La mitad corresponde a información química o de medicamentos y la otra, a datos de proteínas o dianas farmacológicas.

2.2.5 Prueba de viabilidad de las dianas terapéuticas

Para verificar la viabilidad de las dianas terapéuticas se identificó la “drugabilidad” de los dominios seleccionados, usando el servicio web Proteins Plus del Centro para bioinformática de la Universidad de Hamburgo. Los nombres de las proteínas se ingresaron en el servicio web, generando un entorno en el que se ofrece distintas herramientas de análisis molecular como predicción de hidrógenos, interacciones proteína-proteína, predicción geométrica, datos de afinidad de proteína-ligando, elucidación estructural, diagramas de interacción 2D, acoplamiento de proteína-ligando, búsqueda numérica y química textual en PDB. En este caso, se obtuvo el valor de la “drugabilidad” mediante el análisis de *DoGSiteScorer*. En esta lista de dominios, se escogió el sitio que presentó mejor puntuación.

A continuación, se observó la ruta metabólica de los genes seleccionados y se eligió los que compartían la misma la ruta y disfunción. De este modo, la proteína VCP mostró un volumen de la cavidad de 347.073 \AA^3 , profundidad de 18.62 \AA y una proporción de aminoácidos apolares de 0.46. Por otro lado, la proteína VAPB presentó cuatro sitios de unión, del cual se seleccionó el sitio que aparece por defecto. Adicionalmente, se obtuvo el valor del volumen (1465.86 \AA^3), la profundidad (27.41 \AA) y una proporción de aminoácidos apolares (0.40).

2.2.6 Búsqueda de moléculas que podrían interactuar con las dianas

Se comprobó que la estructura 3D del dominio obtenido mediante la herramienta Proteins Plus, se encontraba en la Protein Data Bank (PDB). Por otro lado, se utilizó el software Autodocktools para calcular las dimensiones de la Grid y las coordenadas de su centro. El dominio seleccionado de la proteína VCP se representó de color amarillo, el cual indica los residuos de aminoácidos que forman la posible diana, obteniendo los siguientes valores:

Dimensión de la Grid VCP:

X= 50

Y = 50

Z = 50

Coordenadas del centro de la Grid Residuo 0

X= 23.724

Y = -1.782

Z = 2.657

Dimensión de la Grid VABP:

X=-40

Y=40

Z=-40

Coordenadas del centro de la Grid Residuo 0

X= -2.108

Y= 0.153

Z= -0.034

Por otro lado, se utilizó el archivo .pdb de los dominios seleccionados y los parámetros de la Grid calculados con Autodocktools y se procedió a realizar el cribado virtual.

2.2.7 Cribado Virtual

Se aplicó la herramienta Autodock Vina que se encuentra en el servicio web MTIOpenScreen. El software permitió realizar cálculos utilizando datos de pequeñas moléculas, las mismas que son propias del programa, así como otras que fueron

generadas. A continuación, se usó la estructura 3D de la proteína en formato .pdb, eliminando previamente el inhibidor presente en ella y los disolventes presentes en la estructura.

Por otro lado, se seleccionó la opción Custom parameters de la herramienta para introducir las coordenadas del sitio de unión y sus dimensiones, buscando que los cálculos se realicen específicamente en esa zona. Se obtuvo estos parámetros extrayendo el inhibidor de la estructura 3D y se guardó en formato .pdb.

Finalmente, se descargó los resultados que contienen una lista de los compuestos de la base de datos en función de la energía de unión con la proteína, además, la estructura de la molécula en formato pdb se usó para poder visualizar el sitio de unión de las proteínas.

2.2.8 Análisis de la toxicidad de las moléculas

Se usó el paquete VEGA, con modelos QSAR para relacionar la actividad biológica con descriptores moleculares o información fisicoquímica de una estructura química (**Granados-Tavera et al. , 2019**). Posteriormente, se realizó pruebas de mutagenicidad, carcinogénesis y hepatotoxicidad introduciendo los códigos SMILES (Simplified molecular-input line-entry system). Además, se comparó estos resultados con inhibidores conocidos con la diana.

Finalmente, se analizó las propiedades de las moléculas elegidas utilizando el programa web pkCSM con el que se realizó pruebas de ADMET (Absorción, Distribución, Metabolismo, Excreción, Toxicidad), a partir de los códigos SMILES de las moléculas encontradas.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Análisis y discusión

3.1.1 Análisis de la Esclerosis Lateral Amiotrófica

Se reporta que la ELA es una de las enfermedades más letales, caracterizada por la degeneración neuronal. Afecta principalmente a la médula espinal y tronco encefálico, causando atrofia muscular, parálisis y la muerte. Además, al presentarse dichos desordenes, contribuyen a la generación de disfagia y disartria (**Da Costa Franceschini & Mourão, 2015**).

La razón fundamental del comienzo de la enfermedad no ha sido identificada en el caso de la Esclerosis lateral Amiotrófica esporádica (sALS), por sus siglas en inglés. **Singer et al. (2019)** sugiere que el entorno como el género, la región geográfica, ejercicio físico, trauma, exposición a productos agroquímicos y consumo de sustancias psicoactivas (tabaco) pueden influenciar en la mutación de genes. Por otro lado, varios estudios señalan que los mecanismos fundamentales de la neurodegeneración se encuentran enmarcados por el estrés oxidativo, disfunción en el transporte axonal, agregación de proteínas, acumulación de glutamato, disfunción mitocondrial y neuro inflamación.

En la actualidad, dos clases de medicamentos han sido aprobados, por la agencia de Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA). El primer tratamiento utiliza un fármaco denominado Riluzol, prolongando el tiempo de supervivencia de 2-3 meses y un 9% de ganancia en la probabilidad de sobrevivir un año (**Shahi & Padalkar, 2014**). El mecanismo total de acción del fármaco es desconocido, sin embargo, disminuye los efectos excitotóxicos que produce el incremento del glutamato (**Valko & Ciesla, 2019**). Por otro lado, Edavarone es el segundo medicamento aprobado por la FDA y la Agencia de Medicamentos Europea (EMA), el cual presenta efectos antioxidantes al eliminar peróxidos lipídicos y radicales hidroxilo (**Okada et al., 2018**). Así mismo, el mecanismo de acción es incierto ya que el uso del fármaco en distintas etapas de ELA presenta mayor efectividad, prolongando la vida del paciente.

3.1.2 Análisis de las bases de datos

Los 59 genes elite comparados entre las bases de datos y las rutas metabólicas analizadas en KEGG, se utilizaron para verificar que los genes que están afectados se encuentran relacionados, siguiendo la ruta de estos. En la base de datos MalaCards se ha encontrado que la enfermedad de ELA es producida, principalmente, por las mutaciones de estos genes. Mediante la correlación de los datos encontrados en Harmonizome, se pudo verificar que existe gran relación entre los genes, así como genes adicionales que se encuentran directamente causando la neurodegeneración. Por otro lado, la base de datos OMIM no muestra ningún valor relacionado a la relevancia de los genes implicados en la enfermedad, sin embargo, se ratifica que estos, están asociados a las disfunciones neurodegenerativas debido a lista fenotípica presente en dicha base de datos, confirmando que estos se encuentran en el grupo de genes élite (Tabla 1). Asimismo, 26 genes identificados en las bases de datos de MalaCards, Harmonizome y OMIM presentan una tonalidad roja en las rutas moleculares mutadas, presentes en KEGG. A pesar de no mostrar ningún valor referente, el color de los genes indica la relevancia que tienen los genes mutados en la ELA (Figura 1).

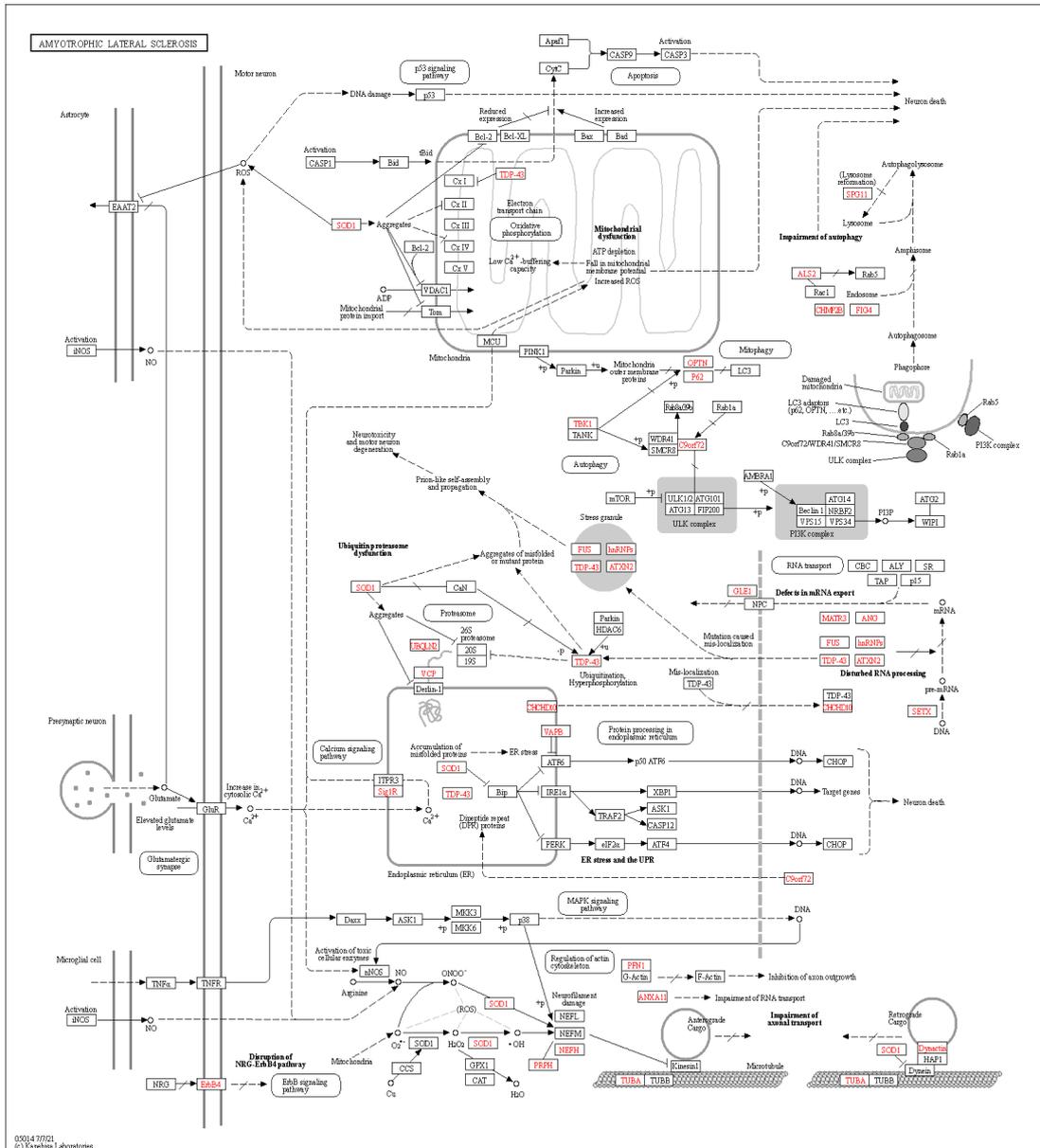


Figura 1. Ruta molecular de la ELA en la base de datos KEGG (Yi et al., 2020)

Tabla 1. Genes relevantes involucrados en la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA)

#	Genes	Disfunción	proteína	Base de Datos			
				MalaCards	OMIM	Harmonizome	KEGG
1	SOD1	Estrés oxidativo	superóxido dismutasa 1	1733.78	Si	8,131	Si
2	DCTN1	Defectos en el transporte axonal	Subunidad de dinactina 1	1421.85	Si	5,536	-
3	VCP	Estrés retículo endoplasmático	Proteína con valosina	894.82	Si	8,070	Si
4	UBQLN2	Estrés granular	Ubiquilina 2	889.34	Si	4,112	Si
5	OPTN	Excitotoxicidad	Optineurina	888.98	Si	5,990	Si
6	TARDBP	Disfunción mitocondrial	TAR DNA-binding protein 43	802.35	Si	8,896	-
7	SQSTM1	Estrés retículo endoplasmático	Sequestosoma 1(p62)	793.57	Si	2,880	-
8	FUS	Agregación de proteínas en el citoplasma	Fused in sarcoma	791.11	Si	8,114	Si
9	FIG4	Fosforilación y estrés oxidativo	Polyphosphoinositid e phosphatase	788.57	Si	5,105	Si

10	ERBB4	Fosforilación y estrés oxidativo	Quinasa erbB-4	780.21	Si	7,042	Si
11	VAPB	Estrés de retículo endoplasmático	Vesicle-associated membrane protein-associated protein B/C	775.28	-	4,826	Si
12	ANG	Pérdida de la función angiogénica	Antiogenina	771.43	Si	4,784	Si
13	MATR3	Homeostasis mitocondrial	Matrin 3	762.12	Si	7,736	Si
14	HNRNPA1	Disfunción mitocondrial	Ribonucleoproteína A2 nuclear heterogénea	761.69	Si	8,029	Si
15	PFN1	Alteraciones del citoesqueleto y transporte axonal	Profilina 1	761.37	Si	6,352	Si
16	NEFH	Defectos de transporte axonal	Polipéptido pesado de neurofilamentos	722.12	Si	5,594	Si
17	PRPH	Fosforilación y estrés oxidativo	Periferina	704.43	Si	4,273	-

18	C9orf72	Agregados peptídicos de ARN citoplasmático	C9orf72	473.93	Si	4,392	Si
19	TUBA4A	Alteraciones del citoesqueleto y transporte axonal	Cadena de tubulina α -4A	409.91	Si	7,570	-
20	MRNIP	Estrés oxidativo	MRN complex-interacting protein	400	-	-	-
21	RNASE4	Pérdida de angiogénica	Ribonucleasa 4	400	-	4,372	-
22	DAO	Estrés oxidativo	Nucleolar protein dao-5	385.35	-	-	-
23	CHMP2B	Defectos de transporte axonal	Charged multivesicular body protein 2b	363.11	Si	3,854	-
24	CHCHD10	Disfunción mitocondrial	Coiled-Coil-Helix-Domain Containing 10	361.62	Si	3,353	Si
25	GLE1	Estrés granular, disfunción de mARN	Nucleoporin GLE1	360.77	-	3,793	Si

26	PON1	Oxidación lipídica y detoxificación de organofosfatos	Paraoxonasa 1	359.08	-	4,896	-
27	PON3	Oxidación lipídica y detoxificación de organofosfatos	Paraoxonasa 3	358.24	-	3,952	-
28	CCNF	Ubiquitinación anormal y agregación proteica	Ciclina F	356.22	Si	7,795	
29	CFAP410	Disfunción mitocondrial	Cilia and flagella asociado a proteina 410	355.69	-		-
30	ANXA11	Agregación de proteínas	Annexina A11	355.34	Si	5,219	-
31	PON2	Oxidación lipídica y detoxificación de organofosfatos	Serum paraoxinasa 2	355.3	-	5,859	-
32	UBQLN4	Transporte axonal	Ubiquilina 4	305.71	-	4,698	-
33	ATXN2	Disfunción en el metabolismo del ARN	Ataxina 2	63.14	Si	5,077	Si
34	TBK1	Neuroinflamación	Quinasa de unión a tank 1	35.85	Si	5,829	Si

35	TREM2	Estrés oxidativo	Triggering receptor expressed on myeloid cells 2	32.31	-	2,962	-
36	PPARGC1 A	Disfunción mitocondrial	Peroxisoma proliferator-activated receptor gamma coactivador 1-alpha	31.79	-	6,026	-
37	NEK1	Defectos de transporte axonal	NIMA	31.7	Si	4,722	-
38	EPHA4	Defectos de transporte axonal	Efrina tipo-A receptor 4	31.36	-	5,149	-
39	TAF15	Defectos en la transcripción del gen de la ARN polimerasa II	Factor 2N asociado a la proteína de unión TATA	31.34	-	6,824	-
40	GLT8D1	Excitotoxicidad	Glicosiltransferasa 8 dominio- proteina 1	30.33	Si	3,172	-
41	KIF5A	Defectos de transporte axonal	Quinasina cadena pesada isoform 5A	-	Si	3,913	-
42	TIA1	Estrés granular	Nucleolisina TIA-1 isoforma p40	-	-	5,956	-

43	DNAJC7	Agregación de proteínas	DnaJ homolog subfamily C member 7	-	-	4,579	-
44	C21orf2	Defectos de transporte axonal	Cilia- and flagella- associated protein 410	-	-	4,020	-
45	cdk5	Fosforilación y estrés oxidativo	Mitochondrial tRNA methylthiotransferas e	-	-	6,910	-
46	KIFAP3	Defectos de transporte axonal	Kinesin-associated protein 3	-	-	4,093	-
47	TDP-43	Agregación	TAR DNA-binding protein 43	-	Si	-	Si
48	GRN	Neuroinflamación	Progranulina	-	Si	-	Si
49	hnRNPA2B 1	Disfunción mitocondrial	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	-	-	-	Si
50	MAPT	Defectos de transporte axonal	Microtubule- associated protein tau	-	Si	-	-

51	SIGMAR1	Estrés de retículo endoplasmático	Receptor intracelular no opioide Sigma 1	-	Si	4,838	-
52	SPG11	Defectos de transporte axonal	Spatacsina	933.15	Si	4,229	Si
53	ALS3	Defectos de transporte axonal	amyotrophic lateral sclerosis 3	58.61	-	-	-
54	SETX	Disfunción en el metabolismo del ARN	Senataxina	1584.52	Si	5,546	Si
55	SPAST	Estrés oxidativo	Spastin	-	Si	-	-
56	ELP3	Agregación de proteínas	proteína del complejo alargador 3	-	Si	-	-
57	LMNB1	Estrés oxidativo	Lamin-B1	-	Si	-	-
58	EWSR1	Estrés oxidativo	proteína 1 asociada a EWS ARN	-	Si	-	-
59	ALS2	Excitotoxicidad	Alsina	-	Si	4,533	Si

Elaborado por: Iván López

Por otra parte, los datos ratificados en las bases de datos evidencian que existen genes que comparten la misma disfunción molecular. De este modo, se afirma que los genes identificados como “elite” hacen referencia a la asociación con la causa de las mutaciones de la enfermedad, ya que estas se encuentran respaldadas por fuentes de confianza. (Voss, 2019). En este sentido, se señala que las disfunciones que mayor repercusión tienen en la ELA son: estrés oxidativo, transporte axonal, agregación de proteínas, altas concentraciones de glutamato. (Tabla 2).

Tabla 2. *Genes relevantes implicados en la Esclerosis Lateral Amiotrófica*

#	Gen	Disfunción
1	SOD1	Estrés oxidativo
2	VCP	Estrés oxidativo
3	SQSTM1	Estrés oxidativo
4	VAPB	Estrés oxidativo
5	PRPH	Estrés oxidativo
6	DAO	Estrés oxidativo
7	PON1	Estrés oxidativo
8	PON3	Estrés oxidativo
9	PON2	Estrés oxidativo
10	TREM2	Estrés oxidativo
11	CDK5	Estrés oxidativo
12	SIGMAR1	Estrés oxidativo
13	SPAST	Estrés oxidativo
14	LMNB1	Estrés oxidativo
15	EWSR1	Estrés oxidativo
16	MRNIP	Estrés oxidativo
17	DCTN1	Defectos de transporte axonal
18	PFN1	Defectos de transporte axonal
19	KIF5A	Defectos de transporte axonal
20	TUBA4A	Defectos de transporte axonal
21	CHMP2B	Defectos de transporte axonal

22	KIFAP3	Defectos de transporte axonal
23	UBQLN4	Defectos de transporte axonal
24	NEK1	Defectos de transporte axonal
25	EPHA4	Defectos de transporte axonal
26	C21orf2	Defectos de transporte axonal
27	ALS3	Defectos de transporte axonal
28	MAPT	Defectos de transporte axonal
29	SPG11	Defectos de transporte axonal
30	FUS	Agregación de proteínas
31	TDP-43	Agregación de proteínas
32	C9orf72	Agregación de proteínas
33	CCNF	Agregación de proteínas
34	ANXA11	Agregación de proteínas
35	DNAJC7	Agregación de proteínas
36	ELP3	Agregación de proteínas
37	OPTN	Excitotoxicidad
38	CASP-8	Excitotoxicidad
39	GLT8D1	Excitotoxicidad
40	ALS2	Excitotoxicidad

Elaborado por: Iván López

3.1.3 Análisis de la integración de datos

Los resultados indican que los 40 genes escogidos se asocian a cuatro subdivisiones, representando las diferentes disfunciones. La información obtenida desde Cytoscape (GeneMania) se ha utilizado para realizar la integración de los genes seleccionados, de este modo, la información obtenida de la selección de nodos de las redes biológicas elucidó el grupo de genes más influyente en la ELA. En el caso del estrés oxidativo los nodos más representativos son MRNP, SIGMAR1, VAPB, VCP, PON1, PON2, PON3, SOD1 (Figura 2). Consecuentemente, el gen SOD1 presenta el mayor número de nodos, siendo el más relevante en la disfunción ya mencionada. Un estudio similar realizado por **Skolariki (2020)**

señala que el gen SOD1 es uno de los más frecuentes asociados a la ELA junto con TARDBP y FUS/TLS, además, se estima que aproximadamente 100 mutaciones en el gen están relacionadas con la ELA familiar.

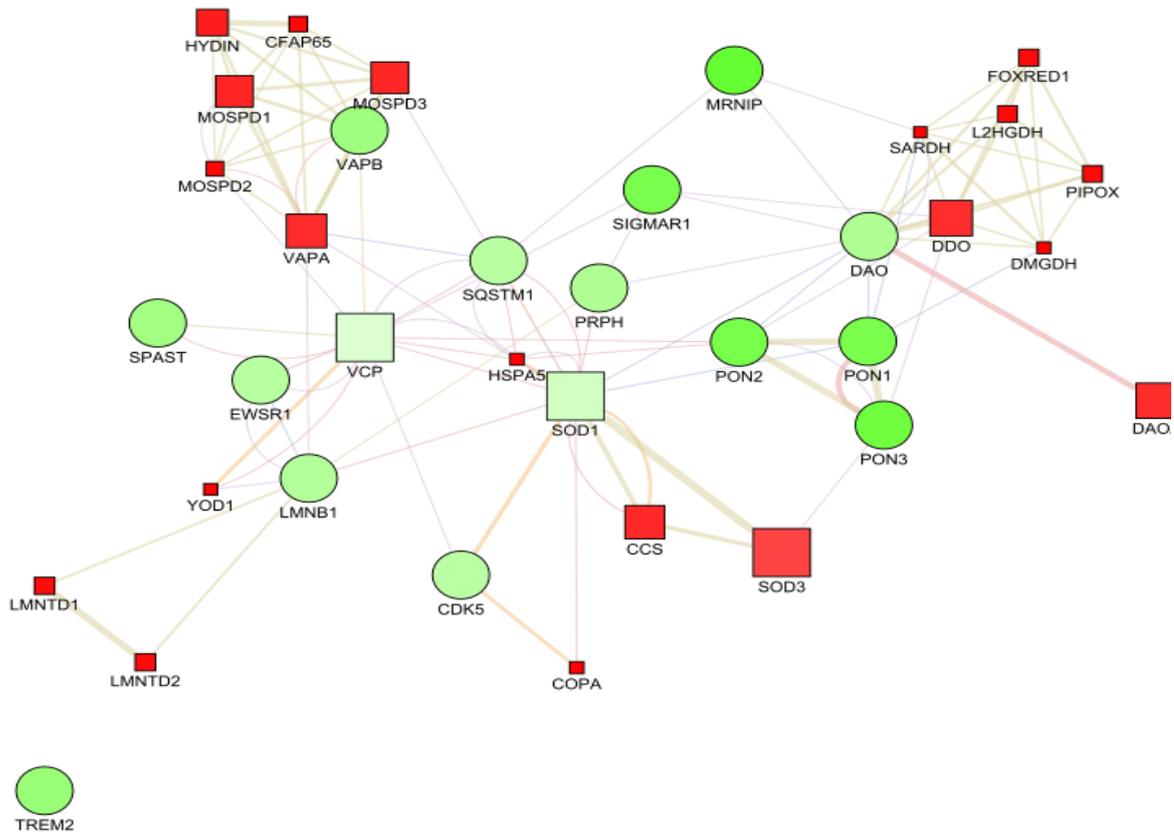


Figura 2. Red Biológica de la disfunción causada por estrés oxidativo

Entre los 40 genes, se presentan seis que están asociados con la disfunción del transporte axonal (DCTN1, PFN1, KIF5A, KIFAP3, MAPT y SPG11), sin embargo, los resultados difieren ya que los genes DCTN1 y KIFAP3 muestran menor expresión (Figura 3), no obstante, en la base de datos MalaCards y Harmonizome se observan como genes relevantes de la enfermedad. En este enfoque, **Liu (2015)** señala que en eucariotas como la levadura existen algoritmos con bajo rendimiento para descifrar las regulaciones del gen a partir de los datos de expresión. Adicionalmente, el score encontrado en Cytoscape (GenaMania) utiliza el coeficiente de correlación de Pearson (**Montejo et al., 2014**), donde el nivel de expresión se genera en función de los experimentos realizados, señalando que podría ser una de las

causas principales del nivel bajo de expresión. Por otra parte, ambos genes muestran 12 y 13 nodos, respectivamente, con lo que son los que mayor relación presentan en la mutación.

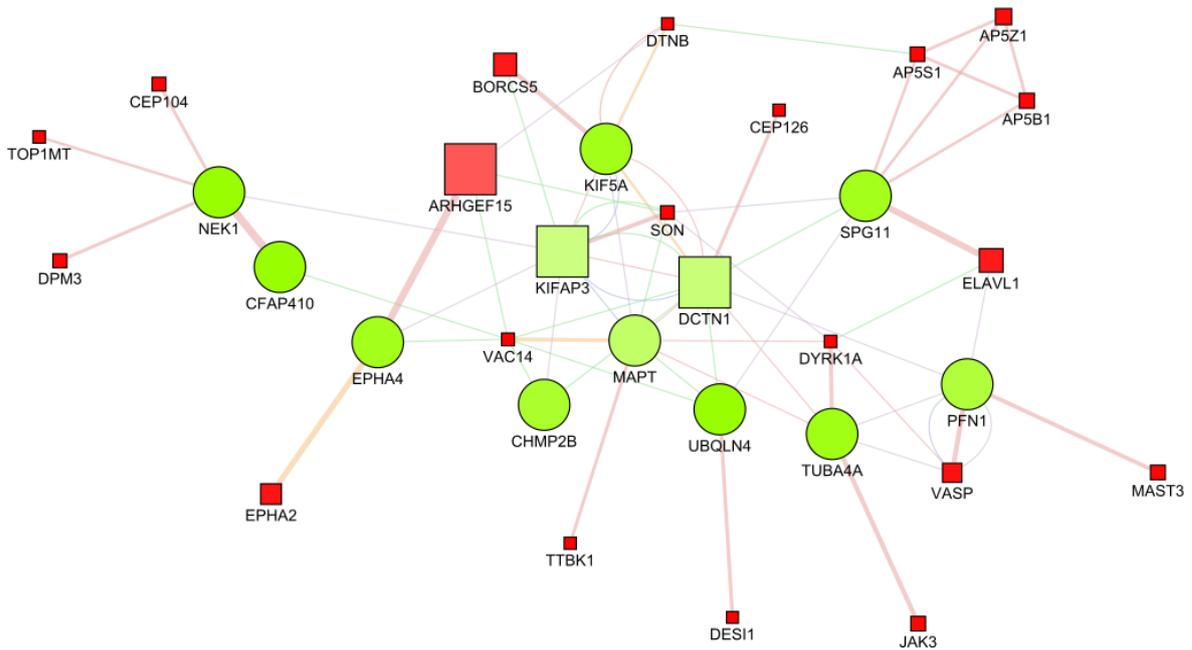


Figura 3. Red Biológica con atributos del transporte axonal

Los genes FUS, DNAJC7, TARDPB, C9orf72, CCNF, ELP3 y ANXA11 presentan una tonalidad verde intenso, mostrando asociación a la disfunción causada por la agregación de proteínas (Figura 4). De acuerdo con los datos de expresión y nodos, los genes FUS y TARDPB son las más altas en la disfunción, ya que están relacionados con varios genes localizados en el núcleo, además, ambos pertenecen a la familia de las ribonucleoproteínas heterogéneas, donde se unen a los genes promotores del pre-ARNm y regulan la transcripción (Ederle et al., 2018). De la misma manera, Blokhuis et al. (2013) ratifica que ambos genes se encuentran altamente implicados en la ELA.

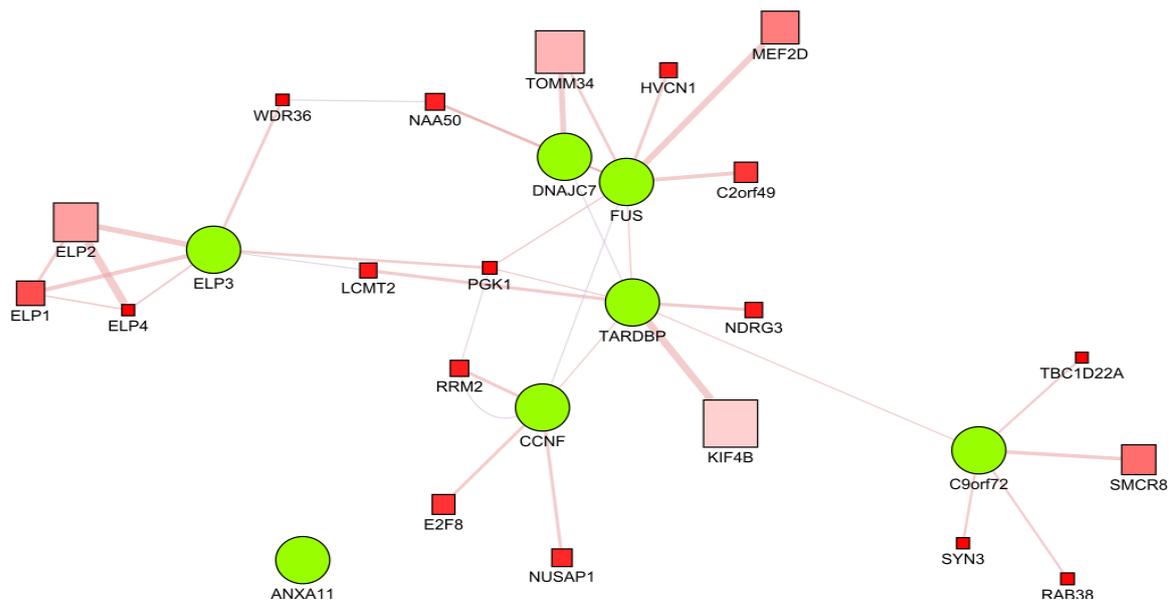


Figura 4. Red biológica de agregación de proteínas

Los genes más representativos en la excitotoxicidad son CASP-8, OPTN, EAAT2, GLT8D1 y ALS2, donde los valores de expresión se encuentran entre 0.87- 0.96, los cuales indican que juegan un rol importante en la ELA (Figura 5). Según **Pradhan & Bellingham (2021)** la excitotoxicidad es una de las mayores causas que desencadena la mutación de genes causantes de la ELA. Por otro lado, el gen OPTN y CASP-8 pueden actuar como diana en el tratamiento de la ELA ya que la inhibición de estos, reduce la deficiencia neurológica e incrementa los niveles de neurofilamentos y reduce el edema cerebral (**Nakazawa et al., 2016**). Adicionalmente, los atributos generados indican que la CASP-8 presenta 40 interacciones, infiriendo que el gen se encuentra interconectado con varias disfunciones, así como con diferentes enfermedades neurodegenerativas. Los análisis realizados muestran la relevancia que presentan los genes consultados ordenados por orden jerárquico (ver Anexo 20), encabezado por el gen GLT8D1, sin embargo, el gen no presenta varias interacciones a diferencia de CASP-8. La principal razón se encuentra en el conjunto de genes consultados ingresados en Cytoscape, los cuales no se encuentran relacionados en el mismo proceso biológico (**Morris et al., 2012**). De la misma forma, se confirmaron que en las agrupaciones y subdivisiones formadas se encuentra los dos genes más relevantes que producen excitotoxicidad (ver anexo 21 y 22).

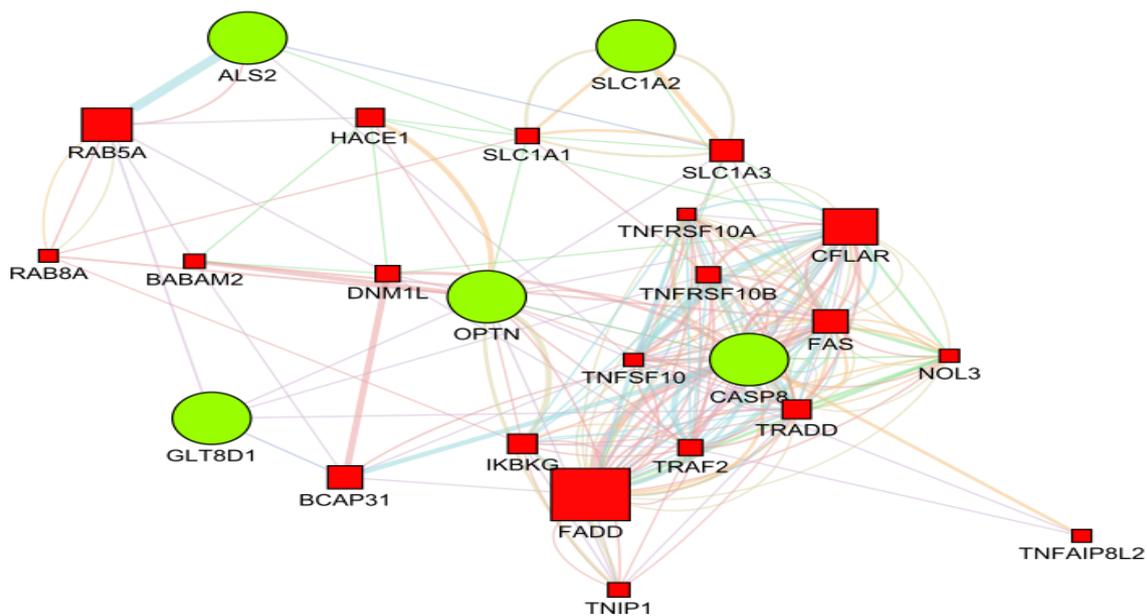


Figura 5. Red Biológica de la excitotoxicidad

Finalmente, la aplicación de los plugins *Hierarchical cluster* y *K-Means cluster* ratifican los datos obtenidos ya que estos algoritmos agrupan a los nodos que se encuentran más cercanos de acuerdo a los atributos de la red y generan subdivisiones en k grupos de forma que el valor del elemento se asigna al *cluster* con la media más cercana (Schreiber, 2011). De este modo, la información obtenida ha sido corroborada con la bibliografía y las bases de datos consultadas por lo que los genes identificados juegan un papel importante en la ELA. Por lo tanto, los resultados muestran que 25 genes presentan un número de interacciones superior a 7 y un nivel de expresión mayor a 0,4. Ambos parámetros mencionados se utilizaron para generar los valores presentes en la tabla 3.

Tabla 3. Atributos de las redes biológicas

#	Gene	Disfunción	Número de interacciones	Puntuación
1	SOD1	Estrés oxidativo	25	0.458
2	VCP	Estrés oxidativo	21	0.412
3	SQSTM1	Estrés oxidativo	10	0,561
4	VAPB	Estrés oxidativo	15	0,678

5	PRPH	Estrés oxidativo	12	0.609
6	DAO	Estrés oxidativo	21	0.607
7	PON1	Estrés oxidativo	16	0.840
8	PON3	Estrés oxidativo	16	0.890
9	PON2	Estrés oxidativo	11	0.852
10	TREM2	Estrés oxidativo	10	0.70
11	CDK5	Estrés oxidativo	13	0.553
12	SIGMAR1	Estrés oxidativo	8	0.840
13	SPAST	Estrés oxidativo	9	0.666
14	LMNB1	Estrés oxidativo	15	0.591
15	EWSR1	Estrés oxidativo	10	0.567
16	DCTN1	Defectos de transporte axonal	13	0,475
17	PFN1	Defectos de transporte axonal	7	0,587
18	KIF5A	Defectos de transporte axonal	8	0,649
19	KIFAP3	Defectos de transporte axonal	12	0,456
20	MAPT	Defectos de transporte axonal	9	0,504
21	SPG11	Defectos de transporte axonal	7	0,645
22	FUS	Agregación de proteínas	9	0,454
23	TARDPB	Agregación de proteínas	8	0,455

24	OPTN	Excitotoxicidad	18	0,908
25	CASP-8	Excitotoxicidad	40	0,872

Elaborado por: Iván López

3.1.4 Análisis de la validación de los genes seleccionados

En DrugBank encontramos entradas de medicamentos enlazadas a proteínas, donde cada entrada tiene varios campos de datos, la mitad corresponde a información química o de medicamentos y la otra, a datos de proteínas o dianas farmacológicas (Hosen et al., 2012). La información obtenida señala que únicamente el gen SOD1 ha servido como diana terapéutica para ELA, al que se relaciona el medicamento denominado Copper (Tabla 4). A pesar de que los 24 genes restantes no presentan asociaciones de dianas y medicamentos para ELA, existen fármacos relacionados a los genes: VCP, DAO, PON1, PON3, CDK5, PFN1, MAPT, SPG11 y CASP-8. Algunos de estos medicamentos ya han sido aprobados, pero no se han utilizado para tratar la ELA. Otros fármacos continúan en la etapa de investigación, desarrollo o experimentación.

Tabla 4. *Evaluación de dianas y fármacos asociados a los genes mutados en ELA*

#	Nombre	Gen	Diana terapéutica para ELA	Fármacos asociados al gen	Fármacos asociados ELA
1	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	SOD1	Si	24	Copper
2	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	VCP	No	2	-
3	Sequestosome-1	SQSTM1	No	-	-
4	Vesicle-associated membrane protein-associated protein B/C	VAPB	No	-	-
5	Peripherin	PRPH	No	-	-
6	D-amino-acid oxidase	DAO	No	8	-
7	Serum paraoxonase/arylesterase 1	PON1	No	10	-
8	Serum paraoxonase/lactonase 3	PON3	No	4	-
9	Serum paraoxonase/arylesterase 2	PON2	No	-	-

10	Triggering receptor expressed on myeloid cells 2	TREM2	No	-	-
11	Cyclin-dependent-like kinase 5	CDK5	No	8	-
12	Sigma non-opioid intracellular receptor 1	SIGMAR1	No	2	-
13	Spastin	SPAST	No	-	-
14	Lamin-B1	LMNB1	No	-	-
15	RNA-binding protein EWS	EWSR1	No	-	-
16	Dynactin subunit 1	DCTN1	No	-	-
17	Profilin-1	PFN1	No	2	-
18	Kinesin heavy chain isoform 5A	KIF5A	No	-	-
19	Kinesin-associated protein 3	KIFAP3	No	-	-
20	Microtubule-associated protein tau	MAPT	No	4	Flortaucipir F-18
21	Spatacsin	SPG11	No	4	-
22	RNA-binding protein FUS	FUS	No	-	-
23	TAR DNA-binding protein 43	TDP-43	No	-	-
24	Optineurin	OPTN	No	1	-
25	Caspase-8	CASP-8	No	2	-

Elaborado por: Iván López

Por otra parte, existen dos medicamentos aprobados, el Riluzol y Edavarona, no obstante, no fueron presentados en el presente trabajo ya que los genes mutados no se encontraban en la lista generada a través de las bases de datos. El fármaco Riluzol es un neuroprotector que bloquea las neurotransmisiones glutamatérgicas en el sistema nervioso central (**Bellingham, 2011**), sin embargo, este fármaco se encuentra asociado a los genes SCN5A y SLC7A11; encargados de la regulación de iones de sodio (**Vallerga et al., 2020**). El segundo medicamento, Edavarona elimina radicales libres, por ser una molécula de bajo peso molecular con buenas propiedades hidrosolubles y liposolubles, es terapéuticamente ventajoso para atravesar la barrera hematoencefálica y mediar los efectos nootrópicos y neuroprotectores (**Cho & Shukla, 2021**). En este caso no se presenta una diana en particular asociada al gen, sin embargo, se ha comprobado que ayuda a reducir los niveles de estrés oxidativo producido por la enzima SOD1.

3.1.5 Prueba de viabilidad de las dianas terapéuticas

Los datos obtenidos del análisis muestran que el valor de drugabilidad de las proteínas VCP, VAPB, DAO, PON1, TREM2, CDK5, SIGMAR1, SPAST, LMNB1, DCTN1, PFN1, KIF5A, TDP-43 y CASP-8 se encuentran entre 0.5-0.8 (Tabla 5). El servicio web DoGSiteScore calcula automáticamente las propiedades físico químicas para la predicción de proteínas-ligandos, donde un factor entre 0.5 -1 corresponden a una buena drugabilidad (Michel et al., 2020). En este sentido, se observa que los genes VCP y VAPB se encuentran en la ruta metabólica del gen SOD1, estos presentan una drugabilidad de 0.65 y 0.81, respectivamente. En el descubrimiento de fármacos, la drugabilidad se define como la unión que puede ocurrir en un sitio biológico con buena potencia nanomolar y al mismo tiempo presenta biodisponibilidad oral y progresión clínica (Finan et al., 2017). Por lo tanto, dichos genes son de interés en el presentes estudio ya que se encuentran relacionados por la disfunción y la ruta molecular. Las mutaciones en la ruta metabólica de SOD1 afectan a los genes ya mencionados (ver Anexo 4), desencadenando alteraciones en el sistema ubiquitina-proteasoma, encargado de degradar proteínas dañadas, no necesarias o mal plegadas (Thibaudeau & Smith, 2019). Un estudio realizado por Adiutori et al. (2021), afirma que 38 genes presentes en diferentes bases de datos de enfermedades humanas se encuentran asociados a las mutaciones causadas por la ELA. En ambos estudios se ha identificado que la mayoría de las mutaciones se centran en el estrés oxidativo, donde el gen SOD1 juega un papel importe. Este, se encuentra en el citoplasma, núcleo, lisosomas y mitocondria, catalizando los radicales libres en moléculas de oxígeno junto con el peróxido de hidrógeno menos reactivo (H₂O₂) y eliminando los radicales libres que causan el estrés oxidativo (Guissart et al., 2020).

Por otra parte, a pesar de la gran cantidad de información que existe en las bases de datos proteicas, no se encontró el 25 % de las dianas en la base de datos Protein Data Bank, correspondientes a la Serum paraoxonasa/lactonasa 3, Serum paraoxonasa/arylesterasa 2, Kinesin-associated protein 3, y Spatacsin, deduciendo que los genes ya mencionados son homólogos a las proteínas PON1 y KIF5A.

Tabla 5. *Valores de drugabilidad de las posibles dianas terapéuticas*

#	Proteínas	Gen	Drugabilidad	Proteins Plus	Protein Data Bank
1	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	VCP	0.65	3qq7	Si
2	Sequestosome-1	SQSTM1	0,35	1q02	Si
3	Vesicle-associated membrane protein-associated protein B/C	VAPB	0.81	2knv	Si
4	Peripherin	PRPH	-	-	-
5	D-amino-acid oxidase Serum	DAO	0.81	3cuk	Si
6	paraoxonase/arylesterase 1 Serum	PON1	0.83	1v04	Si
7	paraoxonase/lactonase 3 Serum	PON3	-	-	-
8	paraoxonase/arylesterase 2	PON2	-	-	-
9	Triggering receptor expressed on myeloid cells 2	TREM2	0.78	5eli	Si
10	Cyclin-dependent-like kinase 5	CDK5	0.85	1H4L	Si
11	Sigma non-opioid intracellular receptor 1	SIGMAR1	0.77	5HK2	Si
12	Spastin	SPAST	0.83	3VFD	Si
13	Lamin-B1	LMNB1	0.74	2KPW	Si
14	RNA-binding protein EWS	EWSR1	0.27	2CPE	Si
15	Dynactin subunit 1	DCTN1	0.8	3E2U	Si
16	Profilin-1	PFN1	0.68	1PFL	Si
17	Kinesin heavy chain isoform 5A	KIF5A	0.88	4UY0	Si
18	Kinesin-associated protein 3	KIFAP3	-	-	-
19	Microtubule-associated protein tau	MAPT	0.3	2MZ7	Si
20	Spatacin	SPG11	-	-	-
21	RNA-binding protein FUS	FUS	0.45	2LCW	Si
22	TAR DNA-binding protein 43	TDP-43	0.58	1WF0	Si

23	Optineurin	OPTN	0.24	2LO4	Si
24	Caspase-8	CASP-8	0.81	1I4E	Si

Elaborado por: Iván López

En la figura 1 se observa el sitio de unión de la proteína VCP, donde el volumen de la cavidad es de 471.10 \AA^3 , profundidad de 13.29 \AA y una proporción de aminoácidos apolares de 0.30. Las tres características ya mencionadas son las más utilizadas para describir las propiedades de un sitio que presenta drugabilidad. **Stank et al. (2016)** menciona que el número de regiones y cavidades se encuentran relacionadas con el tamaño de la proteína, sin embargo, no existe una correlación entre el tamaño de la proteína y del sitio de enlace. Un estudio similar realizado por **Kakizuka, (2015)** señala que se ha encontrado un inhibidor derivado del naftaleno el cual podía contrarrestar la actividad ATPasa de la VCP sin mostrar toxicidad.



Figura 6. Estructura 3D de la proteína Transitional endoplasmic reticulum ATPase (VCP) con el mejor sitio drugable.

Por otra parte, la proteína VAPB presenta cuatro sitios de unión (Figura 2), donde el valor del volumen es mayor con respecto a la VCP, esto se debe a que la longitud de la secuencia y el volumen del sitio de unión están correlacionados (**Daberdaku, 2018**). Asimismo, la tasa de aminoácidos apolares es cercana a la de aminoácidos polares (0.39), evidenciando que en el sitio activo se encuentran aminoácidos como Asn, Cys, Gln, Gly, Ser, Thr y Tyr. De esta forma, se deduce que el dominio seleccionado podría interactuar positivamente, ya que la acción del medicamento junto a los receptores de los aminoácidos producirían una acción

directa (Marc, 2011). Por otra parte, los aminoácidos ubicados afuera de la cavidad de unión pueden tener un gran efecto en las propiedades del sitio de unión.

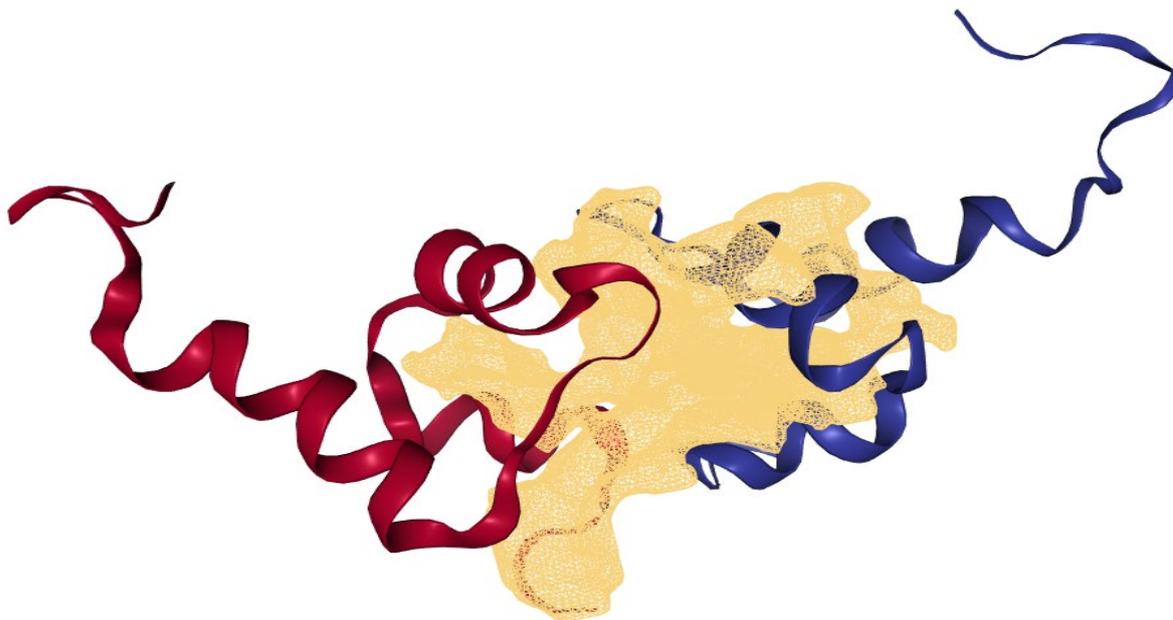


Figura 7. Estructura 3D de la proteína Vesicle-associated membrane protein-associated protein B/C (VAPB) con el mejor sitio drugable

Es importante señalar que la identificación de los mejores sitios drugables de una proteína sirven como base para el desarrollo y análisis *in vitro* e *in vivo* de fármacos, ya que el 80% de proyectos falla y solamente el 20% logra comercializar los medicamentos. En este caso, con los resultados obtenidos se valida y añade fiabilidad de los dominios seleccionados para el desarrollo y comercialización de fármacos. Por otra parte, se debe realizar análisis adicionales a los dominios no seleccionados ya que en ambas proteínas se evidenciaba al menos tres sitios drugables superior a 0.5 como trabajo futuro.

3.1.6 Análisis de interacción molecular

Los resultados muestran que el dominio seleccionado de la proteína VCP es el adecuado para ser utilizado como posible diana terapéutica (Figura 8). En este caso, el fármaco que presentó mayor energía se denomina Saquinavir ($-6,29 \frac{\text{Kcal}}{\text{mol}}$) el cual fue elegido en función de la energía de interacción. El medicamento es utilizado para el tratamiento de VIH,

actuando como inhibidor de la proteasa VIH en combinación de ritovanir (Jayaswal et al., 2014)

El sitio activo presenta puentes de hidrógeno que interactúan con los residuos ARG68, VAL87, ASN90, PRO137, TYR138, PHE152, LEU153, ARG155 y GLU141, además, muestran que el fármaco presenta flexibilidad, con lo que se evidencia un incremento potencial para interactuar con el ligando. Es importante mencionar que la formación de puentes de hidrógeno se encuentra asociados con la estabilidad de la estructura proteica-ligando. Así mismo, la preparación de la proteína al utilizar Autodocktools y el cálculo correcto de las coordenadas del centro de la Grid contribuyen con la detección de fármacos al realizar el virtual screening.

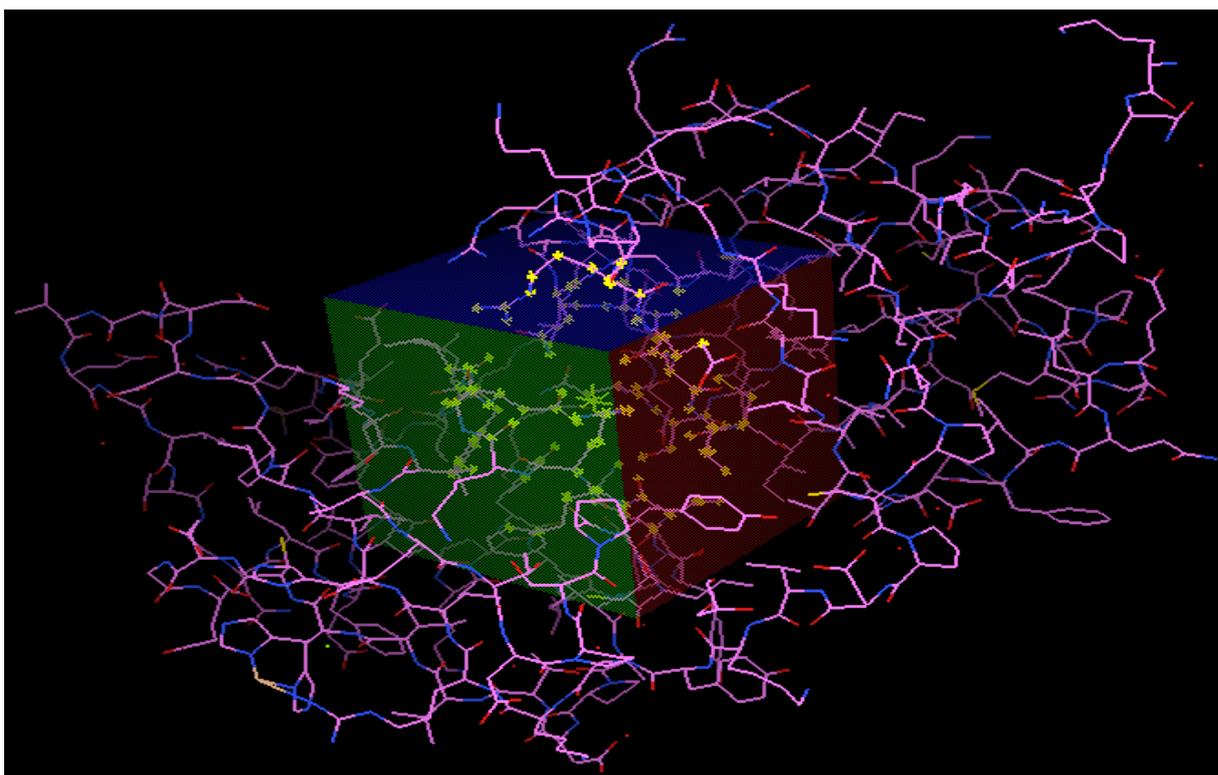


Figura 8. Dimension de la Grid del sitio más drugable de la proteína Transitional endoplasmic reticulum ATPase (VCP)

Según **Mishra et al. (2015)** menciona que la fusión de los átomos hidrógeno (no polares) juega un papel importante en el cálculo del proceso del acoplamiento. De este modo, se ratifica que el dominio elegido como diana es adecuado para el enlazamiento de Saquinavir, debido a que los residuos que componen el sitio de unión presentan aminoácidos apolares (Figura 9). Adicionalmente, dos puentes de hidrógeno se formaron con el residuo His 41, evidenciando que es clave en el sitio de unión. Por otro lado, el fármaco pertenece a la clase de H1 antihistamina el cual es uno de los seis componentes químicamente similar al Eeyarestatin, dicho medicamento es un inhibidor encargado de bloquear la degradación de las proteínas mal plegadas (**Gamayun et al., 2019**).

En efecto, seis fármacos presentan un score entre $-2,12 \frac{Kcal}{mol}$ y $-6,92 \frac{Kcal}{mol}$, considerable para la interacción con la proteína (Tabla 6), sin embargo, la selección del mejor fármaco no depende únicamente de la puntuación, se considera el valor de correlación de Pearson, asociado al fármaco Eeyarestatin. Así mismo, los datos se validaron mediante un estudio realizado por **Huang et al. (2014)** señala que residuos (apolares) de la proteína SOD1 interaccionan con el fármaco hesperidina, el cual presenta enlaces de hidrógeno en el Glu100, así como, en residuos cercanos (Gln22, Pro28, Lys23, Glu21 y Lys30).

Tabla 6. *Fármacos asociados a los dominios de las proteínas VCP y VABP*

#	Nombre del fármaco	Puntuación del docking Z	Valor de correlación con Eeyarestatina
1	Ebastina	-6.92	N/A
2	Saquinavir	-6.29	0.11
3	Astemizole	-5.98	0.3
4	Iloprost	-4.11	0.05
5	Niclosamide	-3.37	0.387

6	Clotrimazole	-2.77	0.33
7	Ivermectin	-2.12	0.37

Elaborado por: Iván López

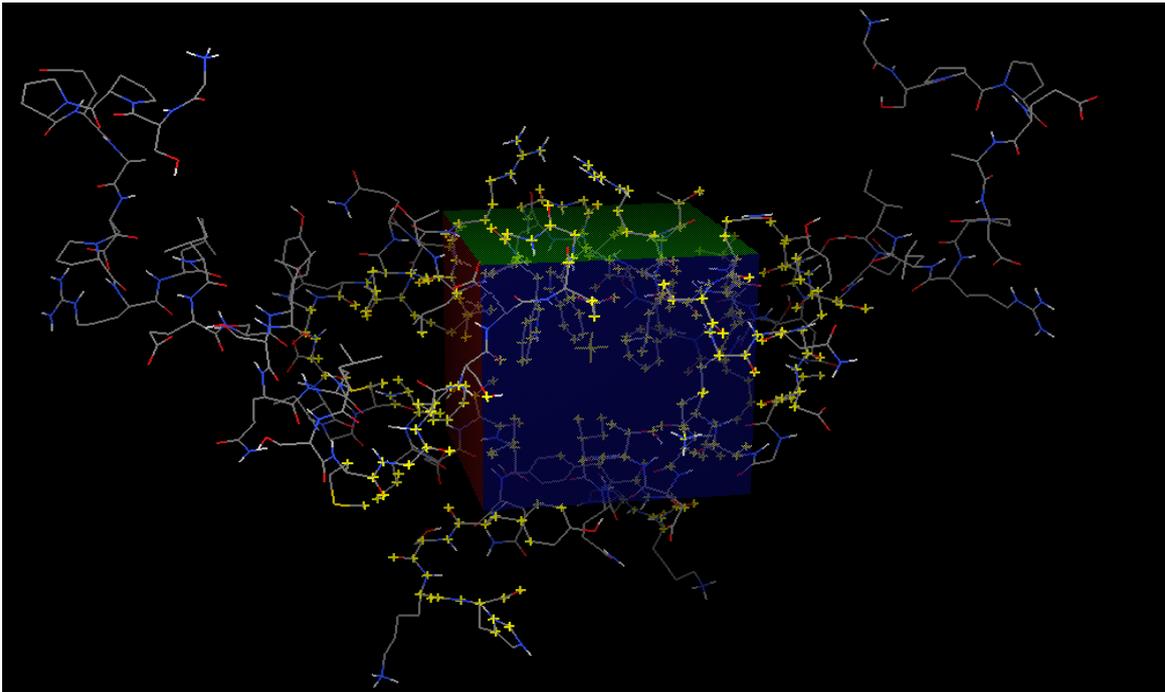


Figura 9. Dimensión de la Grid del sitio más drugable de la proteína Vesicle-associated membrane protein-associated protein B/C (VAPB)

Por otro lado, el fármaco Astemizole genera puentes de hidrogeno en el sitio activo (LEU 29, ARG 32, THR 35, ASP 39, ALA42, LEU 44, ILE 47 Y TIR 49). Actualmente, no existe un inhibidor de las proteínas VABP, sin embargo, al encontrarse en la ruta metabólica del gen SOD1, la inhibición de este puede resultar en la supresión de dicho gen. La energía de interacción es de $-5,98 \frac{Kcal}{mol}$, por lo que, el sitio de acción se encuentra estable mediante los enlaces de hidrógeno. El fármaco es utilizado para tratar síntomas alérgicos, sin embargo en dosis altas, conducen a producir arritmias (X. Wang et al., 2020). Se evidencia que el sitio

de unión muestra residuos flexibles en un rango de 1-4 Å, indicando estabilidad. Por lo que se infiere que el medicamento, ayuda a contrarrestar la ELA.

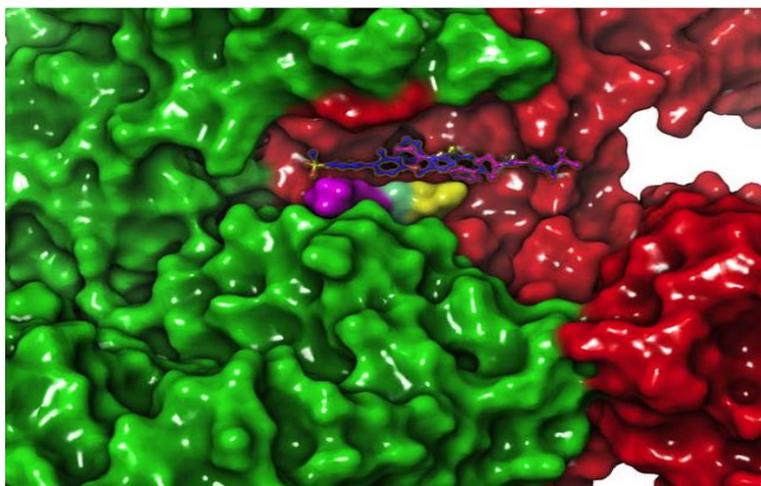


Figura 10. *Interacción entre la proteína VABP y la molécula del fármaco Astemizole*

3.1.7 Análisis de la toxicidad de las moléculas

Los análisis QSAR muestran una correlación entre la estructura química y la actividad biológica. Saquinavir y Astemizole no presentan actividad mutagénica y tampoco carcinogénica, ambos parámetros se encuentran relacionados al evaluar la actividad biológica de fármacos (Saini & Kumar, 2012). Sin embargo, Saquinavir mostró hepatotoxicidad, señalando que genera un daño al hígado por la exposición de este. Según Alshehri (2020) la hepatotoxicidad ocurre a través de diferentes mecanismos: como apoptosis de hepatocitos, daño biliar e inhibición de las células T y mitocondria, además, la constante exposición a fármacos conlleva a dicha enfermedad. Es importante resaltar, que todos los medicamentos se metabolizan primeramente en el hígado, por lo que este parámetro debería encontrarse en la evaluación de todos los medicamentos, sin embargo, el medicamento Astemizole no presenta hepatotoxicidad. Un estudio realizado por Jo et al. (2020) señala que, se ha demostrado que el medicamento desencadena problemas gastrointestinales incluyendo diarrea, molestia abdominal y náuseas, por este motivo se ha señalado al compuesto bajo la clasificación tóxica.

La absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad juegan un papel importante en el desarrollo de fármacos, siendo una etapa crucial para reducir los fallos presentados a la hora de la síntesis. De este modo, se identificó que el fármaco Saquinavir cumple la función de transportador de *P-glycoprotein substrat (P-gp)*, así mismo, la solubilidad en el agua e intestino indican que el fármaco liberado se sintetiza completamente en este. Por otra parte, el volumen estable de distribución del fármaco (VD_{ss}) no proporciona información acerca del mecanismo de distribución, sino la tasa del compuesto a separarse del plasma (**Berellini & Lombardo, 2019**). El valor de excreción muestra que el medicamento no presenta una pérdida de la sustancia secretada por las vías urinarias. En este caso, pueden ser secretadas por el sudor, lagrimas o respiración. Este parámetro de la toxicidad se confirmó mediante el presente análisis confirmando que el fármaco presenta hepatotoxicidad. De la misma manera, el análisis el medicamento Astemizole presenta mejor absorción, con un valor de 86.518 %, mostrando mejor síntesis en el intestino. Del mismo modo, el valor de distribución VD_{ss} (-0.044 logL/kg) indica que la acción del fármaco tiende a una menor separación del plasma, indicando que el medicamento esta unido a las proteínas. La información referente al metabolismo corrobora que el fármaco muestra características de inhibición. Mediante el proceso renal se observa que el fármaco es liberado, además, el valor de liberación líquida del fármaco es de 0,969, el cual indica que el cuerpo libera en su totalidad el mismo. Finalmente, los datos de toxicidad muestran que el fármaco genera hepatotoxicidad, corroborando la información obtenida a través de análisis QSAR.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

- Se observó la ruta metabólica del gen SOD1 (diana terapéutica principal) para la identificación de los genes que se encuentran afectados directamente con la mutación, ya que este se asocia con distintas disfunciones neurodegenerativas, principalmente, por la localización de este. En base a dicha información, el presente estudio ratifica que el gen se encuentra relacionado con los genes VCP y VABP, encargados de regular los radicales libres, así como, alteraciones en el sistema ubiquitina-proteasoma.
- Se utilizó técnicas bioinformáticas para encontrar nuevas dianas terapéuticas para la enfermedad de la ELA, donde las proteínas VCP y VABP sirven como receptores para los fármacos Saquinavi y Astemizole, respectivamente. Además, la evaluación de QSAR y ADMET señala que el medicamento Astemizole presenta mejores propiedades de absorción, excreción y metabolismo para contrarrestar la ELA, sirviendo como diana terapéutica para el desarrollo de fármacos.
- Se identificó que existen 59 genes “elite” que se encuentran implicados directamente con la enfermedad, los datos se ratifican con las bases de datos biológicas OMIM, KEGG, MalaCards y Harmonizome. Adicionalmente, estos servirán como futuras dianas terapéuticas, ya que en el presente estudio se evaluó únicamente dos genes, debido a la capacidad de procesamiento computacional que se necesita y la restricción del uso de supercomputadores para esta tarea.
- Se diseñó redes biológicas a través de Cytoscape (GeneMania) para los genes que presentan mayor relevancia terapéutica para lo cual se tomó como referencia el score e interacciones que poseen los nodos, evidenciando que los genes VCP y VABP, poseen 21 y 15 nodos, así como un nivel de expresión de 0.41 y 0.68, respectivamente. De la misma forma, estos se encuentran asociados a disfunciones adicionales ya que siguen la ruta metabólica del gen SOD1.

- Se validaron los genes seleccionados en la base de datos DrugBank, identificando que únicamente existe un gen como diana terapéutica. Los 24 genes no presentaban dianas terapéuticas para ELA, en algunos casos los medicamentos se encontraban asociados a distintas enfermedades, otros fármacos continúan en la etapa de investigación, desarrollo o experimentación.
- Se comprobaron los dominios de interacción de las proteínas VCP y VABP en el paquete Proteins Plus en el que los sitios de acción presentaban una drugabilidad de 0.65 y 0.81, señalando que la proteína VABP posee un mejor sitio de acción ya que existe mayor presencia de residuos apolares e interacciones de hidrógeno lo que facilita la acción de forma directa y estabilidad de la proteína-ligando.

4.2 Recomendaciones

- Debido al uso de computadores personales para este tipo de proyectos, para obtener los resultados del cribado en menor tiempo se sugiere reducir la proteína utilizando herramientas bioinformáticas, puesto que, la información de la proteína completa puede tardar varios días en procesarse y en muchos de los casos se generan errores que no se pueden corregir, lo que causa mucha pérdida de tiempo en el desarrollo del proyecto.
- Verificar continuamente los servicios web de las herramientas bioinformáticas, puesto que, algunos servicios que se planificaron utilizar, ya no se encontraban disponibles al momento de desarrollar el presente trabajo.
- Los nodos generados en función del score superior a 0.5 son los de mayor importancia ya que muestran los genes que se encuentran sobreexpresados dentro de la disfunción, así como, las interacciones que presenta cada nodo, por lo que hay que tener mucho cuidado al momento de seleccionarlos.
- Se debe preparar el archivo de tal forma que se utilice determinadas bases de datos de ligandos objetivo para las proteínas target que hemos identificado, para que el proceso en computadores personales sea más eficiente.
- El diseño de fármacos es un campo experimental muy amplio por lo que se recomienda el uso de estas herramientas para el análisis previo de las interacciones entre los distintos

dominios, sitios de acción y ligandos. Esta tarea permite acercarse al diseño final del fármaco con lo cual se optimiza el tiempo de desarrollo.

- Gestionar la creación de una unidad de Bioinformática en la que se pueda implementar de ser posible una supercomputadora para el acceso a pruebas y ejecución de pipelines de los estudiantes que desarrollan proyectos de bioinformática dentro de las carreras de Ingeniería Bioquímica y Biotecnología.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adiutori, R., Puentes, F., Bremang, M., Lombardi, V., Zubiri, I., Aarum, J., & Street, N. (2021). *Analysis of circulating protein aggregates as a route of investigation into neurodegenerative disorders Short title: Circulating protein aggregates and neurodegeneration*. 1–42.
- Agarwal, S., & Mehrotra, R. (2016). An Overview of Molecular Simulation. *JSM Chemistry*, 4(2), 1024.
- Alshehri, M., & Wahab Amjad, Muhammad Mudawi, M. (2020). Drugs-Inducing Hepatotoxicity. *Asian Journal of Pharmaceutical Research and Health Care*, 12(3), 148–156. doi: 10.18311/ajprhc/2020/25518
- Anastassiadis, T., Deacon, S. W., Devarajan, K., Ma, H., & Peterson, J. R. (2011). Comprehensive assay of kinase catalytic activity reveals features of kinase inhibitor selectivity. *Nature Biotechnology*, 29(11), 1039–1045. doi: 10.1038/nbt.2017
- Ban, J., Sámano, C., Mladinić, M., & Munitić, I. (2019). Glia in amyotrophic lateral sclerosis and spinal cord injury: Common therapeutic targets. *Croatian Medical Journal*, 60(2), 109–120. doi: 10.3325/cmj.2019.60.109
- Bellingham, M. C. (2011). A Review of the Neural Mechanisms of Action and Clinical Efficiency of Riluzole in Treating Amyotrophic Lateral Sclerosis: What have we Learned in the Last Decade? *CNS Neuroscience and Therapeutics*, 17(1), 4–31. doi: 10.1111/j.1755-5949.2009.00116.x
- Benatar, M., Wu, J., Andersen, P. M., Atassi, N., David, W., Cudkowicz, M., & Schoenfeld, D. (2018). Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of arimoclomol in rapidly progressive SOD1 ALS. *Neurology*, 90(7), e565–e574. doi: 10.1212/WNL.0000000000004960
- Berellini, G., & Lombardo, F. (2019). An accurate in vitro prediction of human VDSs based on the Oie-Tozer equation and primary physicochemical descriptors. 3. Analysis and assessment of predictivity on a large dataset. *Drug Metabolism and Disposition*, 47(12), 1380–1387. doi: 10.1124/dmd.119.088914
- Blokhuis, A. M., Groen, E. J. N., Koppers, M., Van Den Berg, L. H., & Pasterkamp, R. J. (2013). Protein aggregation in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathologica*, 125(6), 777–794. doi: 10.1007/s00401-013-1125-6
- Bruijn, L. I., & Cudkowicz, M. (2006). Therapeutic targets for amyotrophic lateral sclerosis: Current treatments and prospects for more effective therapies. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 6(3), 417–428. doi: 10.1586/14737175.6.3.417

- Cho, H., & Shukla, S. (2021). Role of edaravone as a treatment option for patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Pharmaceuticals*, *14*(1), 1–14. doi: 10.3390/ph14010029
- Choudhary, L. K., Shuklas, A., Zade, S., & Charde, R. (2011). (C.a.D.D.) - a New - Modern Software Based Approach in Drug Design and Discovery. *International Journal of Pharmaceutical Chemistry*, *1*(1). doi: 10.7439/ijpc.v1i1.131
- Da Costa Franceschini, A., & Mourão, L. F. (2015). Dysarthria and dysphagia in Amyotrophic Lateral Sclerosis with spinal onset: A study of quality of life related to swallowing. *NeuroRehabilitation*, *36*(1), 127–134. doi: 10.3233/NRE-141200
- Daberduku, S. (2018). Identification of protein pockets and cavities by euclidean distance transform. *PeerJ*, *6*(3). doi: 10.7287/peerj.preprints.27314v2
- De Paula, C. Z., Gonçalves, B. D. C., & Vieira, L. B. (2015). An overview of potential targets for treating amyotrophic lateral sclerosis and huntington's disease. *BioMed Research International*, *2015*. doi: 10.1155/2015/198612
- Ederle, H., Funk, C., Abou-Ajram, C., Hutten, S., Funk, E. B. E., Kehlenbach, R. H., ... Dormann, D. (2018). Nuclear egress of TDP-43 and FUS occurs independently of Exportin-1/CRM1. *Scientific Reports*, *8*(1), 1–18. doi: 10.1038/s41598-018-25007-5
- Feher, M., & Williams, C. I. (2012). Numerical errors and chaotic behavior in docking simulations. *Journal of Chemical Information and Modeling*, *52*(3), 724–738. doi: 10.1021/ci200598m
- Finan, C., Gaulton, A., Kruger, F. A., Lumbers, R. T., Shah, T., Engmann, J., ... Casas, J. P. (2017). The druggable genome and support for target identification and validation in drug development. *Science Translational Medicine*, *9*(383), 1–40. doi: 10.1126/scitranslmed.aag1166
- Foran, E., & Trotti, D. (2009). Glutamate transporters and the excitotoxic path to motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *Antioxidants and Redox Signaling*, *11*(7), 1587–1602. doi: 10.1089/ars.2009.2444
- Franklin, T. B., Saab, B. J., & Mansuy, I. M. (2012). Neural Mechanisms of Stress Resilience and Vulnerability. *Neuron*, *75*(5), 747–761. doi: 10.1016/j.neuron.2012.08.016
- Fujisawa, A., & Yamamoto, Y. (2016). Edaravone, a potent free radical scavenger, reacts with peroxynitrite to produce predominantly 4-NO-edaravone. *Redox Report*, *21*(3), 98–103. doi: 10.1179/1351000215Y.0000000025
- Gaba, M., Shaheed, A., Ajit, B., Jujhar, S., & Memorial, S. (2015). *An overview on Molecular Docking International Journal of Drug Development & Research*. *02*(February 2010), 1–14.
- Gamayun, I., O'Keefe, S., Pick, T., Klein, M. C., Nguyen, D., McKibbin, C., ... Cavalié, A.

- (2019). Eeyarestatin Compounds Selectively Enhance Sec61-Mediated Ca²⁺ Leakage from the Endoplasmic Reticulum. *Cell Chemical Biology*, 26(4), 571-583.e6. doi: 10.1016/j.chembiol.2019.01.010
- Granados-Tavera, K., Tilvez, E. A., & Ahumado-Monterrosa, M. (2019). Modelado de las Relaciones Cuantitativas Estructura-Actividad (QSAR) de Análogos del Tipifarnib con Actividad Antichagásica. *Información Tecnológica*, 30(1), 3–14. doi: 10.4067/s0718-07642019000100003
- Guissart, C., Mouzat, K., Kantar, J., Louveau, B., Vilquin, P., Polge, A. & Lumbroso, S. (2020). Premature termination codons in SOD1 causing Amyotrophic Lateral Sclerosis are predicted to escape the nonsense-mediated mRNA decay. *Scientific Reports*, 10(1), 1–7. doi: 10.1038/s41598-020-77716-5
- Halperin, I., Ma, B., Wolfson, H., & Nussinov, R. (2002). Principles of docking: An overview of search algorithms and a guide to scoring functions. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, 47(4), 409–443. doi: 10.1002/prot.10115
- Hardiman, O., Al-Chalabi, A., Chio, A., Corr, E. M., Logroscino, G., Robberecht, W., & Van Den Berg, L. H. (2017). Amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Reviews Disease Primers*, 3. doi: 10.1038/nrdp.2017.71
- Hassan, I., Bream, A. S., El-Sayed, A., & Yousef, A. M. (2017). International Journal of Advanced Research in Biological Sciences Assessment of disinfection by-products levels in Aga surface water plant and its distribution system, Dakhliya, Egypt. *Int. J. Adv. Res. Biol. Sci.*, 4(4), 37–43. doi: 10.22192/ijarbs
- Hergesheimer, R., Lanznaster, D., Vourc'h, P., Andres, C., Bakkouche, S., Beltran, S. & Couratier, P. (2020). Advances in disease-modifying pharmacotherapies for the treatment of amyotrophic lateral sclerosis. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 21(9), 1103–1110. doi: 10.1080/14656566.2020.1746270
- Hosen, S., Saha, D., Dash, R., Emran, T., Alam, A., & Junaid, M. (2012). Drug Bank: An Update-Resource for in Silico Drug Discovery. *Research Journal of Pharmaceutical Dosage Forms and Technology*, 4(3), 166–171.
- Huang, H. J., Chang, T. T., Chen, H. Y., & Chen, C. Y. C. (2014). Finding inhibitors of mutant superoxide dismutase-1 for amyotrophic lateral sclerosis therapy from traditional Chinese medicine. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014. doi: 10.1155/2014/156276
- Jain, A. (2017). Computer aided drug design. *Journal of Physics: Conference Series*, 884(1), 504–509. doi: 10.1088/1742-6596/884/1/012072
- Jayaswal, A., Mishra, A., Mishra, H., & Shah, K. (2014). Evaluation of novel Saquinavir analogs for resistance mutation compatibility and potential as an HIV-Protease inhibitor drug. *Bioinformatics*, 10(4), 227–232. doi: 10.6026/97320630010227

- Jo, K., Kim, H., Khadka, P., Jang, T., Kim, S. J., Hwang, S. H., & Lee, J. (2020). Enhanced intestinal lymphatic absorption of saquinavir through supersaturated self-microemulsifying drug delivery systems. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 15(3), 336–346. doi: 10.1016/j.ajps.2018.11.009
- Kakizuka, A. (2015). VCP, a Major ATPase in the Cells, as a Novel Drug Target for Currently Incurable Disorders. *Innovative Medicine*, 61–69. doi: 10.1007/978-4-431-55651-0_5
- Khan, T., Lawrence, A. J., Azad, I., Raza, S., & Khan, A. R. (2018). Molecular Docking Simulation with Special Reference to Flexible Docking Approach. *JSM Chem*, 6(1), 1053. Retrieved from <http://zinc.docking.org/>
- Kiernan, M. C., Vucic, S., Cheah, B. C., Turner, M. R., Eisen, A., Hardiman, O., ... Zoing, M. C. (2011). Amyotrophic lateral sclerosis. *The Lancet*, 377(9769), 942–955. doi: 10.1016/S0140-6736(10)61156-7
- King, A. E., Woodhouse, A., Kirkcaldie, M. T. K., & Vickers, J. C. (2016). Excitotoxicity in ALS: Overstimulation, or overreaction? *Experimental Neurology*, 275, 162–171. doi: 10.1016/j.expneurol.2015.09.019
- Kuzma-Kozakiewicz, M., & Kwiecinski, H. (2011). New therapeutic targets for amyotrophic lateral sclerosis. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 15(2), 127–143. doi: 10.1517/14728222.2011.542152
- Lasiene, J., & Yamanaka, K. (2011). Glial cells in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology Research International*, 2011. doi: 10.1155/2011/718987
- Liddelow, S. A., Guttenplan, K. A., Clarke, L. E., Bennett, F. C., Bohlen, C. J., Schirmer, L., ... Barres, B. A. (2017). Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*, 541(7638), 481–487. doi: 10.1038/nature21029
- Liu, Q., Song, R., & Li, J. (2015). Inference of gene interaction networks using conserved subsequential patterns from multiple time course gene expression datasets. *BMC Genomics*, 16(12), S4. doi: 10.1186/1471-2164-16-S12-S4
- Marc, J. (2011). 7. Pharmacogenetics of Drug Receptors. *Ejifcc*, 19(1), 48–53. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27683290>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4975341>
- Menchaca, Thuluz, Portilla, Claudia & Zepeda, R. (2013). Past, Present, and Future of Molecular Docking. *Intech*, 32(July), 137–144. Retrieved from <http://www.intechopen.com/books/trends-in-telecommunications-technologies/gps-total-electron-content-tec-prediction-at-ionosphere-layer-over-the-equatorial-region>
<http://www.asociatiamhc.ro/wp-content/uploads/2013/11/Guide-to-Hydropower.pdf>

- Metwally, A. A., & Hathout, R. M. (2015). Computer-Assisted Drug Formulation Design: Novel Approach in Drug Delivery. *Molecular Pharmaceutics*, *12*(8), 2800–2810. doi: 10.1021/mp500740d
- Michel, M., Homan, E. J., Wiita, E., Pedersen, K., Almlöf, I., Gustavsson, A. L. & Warpman Berglund, U. (2020). In silico Druggability Assessment of the NUDIX Hydrolase Protein Family as a Workflow for Target Prioritization. *Frontiers in Chemistry*, *8*(May), 1–15. doi: 10.3389/fchem.2020.00443
- Mishra, V., Kashyap, S., & Hasija, Y. (2015). Ligand based virtual screening for identifying potent inhibitors against viral neuraminidase: An in silico approach. *Journal of Taibah University for Science*, *9*(1), 20–26. doi: 10.1016/j.jtusci.2014.04.007
- Montejo, J., Zuberi, K., Rodriguez, H., Bader, G. D., & Morris, Q. (2014). GeneMANIA: Fast gene network construction and function prediction for Cytoscape. *F1000Research*, *3*, 1–7. doi: 10.12688/f1000research.4572.1
- Morimoto, S., Takahashi, S., Fukushima, K., Saya, H., Suzuki, N., Aoki, M., & Nakahara, J. (2019). Ropinirole hydrochloride remedy for amyotrophic lateral sclerosis – Protocol for a randomized, double-blind, placebo-controlled, single-center, and open-label continuation phase I/IIa clinical trial (ROPALS trial). *Regenerative Therapy*, *11*, 143–166. doi: 10.1016/j.reth.2019.07.002
- Morris, J. S., Ph, D., Kuchinsky, A., Pico, A., & Institutes, G. (2012). Analysis and Visualization of Biological Networks with Cytoscape. *UCSF (Workshop)*, 65. Retrieved from <http://www.cgl.ucsf.edu/Outreach/Workshops/NIH-Oct-2012/Cytoscape/Analysis and Visualization of Biological Networks with Cytoscape v6.pdf>
- Muyderman, H., & Chen, T. (2014). Mitochondrial dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis - A valid pharmacological target? *British Journal of Pharmacology*, *171*(8), 2191–2205. doi: 10.1111/bph.12476
- Nakazawa, S., Oikawa, D., Ishii, R., Ayaki, T., Takahashi, H., Takeda, H. & Tokunaga, F. (2016). Linear ubiquitination is involved in the pathogenesis of optineurin-associated amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Communications*, *7*. doi: 10.1038/ncomms12547
- Okada, M., Yamashita, S., Ueyama, H., Ishizaki, M., Maeda, Y., & Ando, Y. (2018). Long-term effects of edaravone on survival of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *ENeurologicalSci*, *11*(February), 11–14. doi: 10.1016/j.ensci.2018.05.001
- Okano, H., Yasuda, D., Fujimori, K., Morimoto, S., & Takahashi, S. (2020). Ropinirole, a New ALS Drug Candidate Developed Using iPSCs. *Trends in Pharmacological Sciences*, *41*(2), 99–109. doi: 10.1016/j.tips.2019.12.002
- Padalkar, A., & Shahi, S. (2014). Micro particles : An approach for betterment of drug delivery system. *International Journal of Pharmaceutical Researches and*

Developments, (January 2011). Retrieved from
<https://www.researchgate.net/publication/216063311>

- Pradhan, J., & Bellingham, M. C. (2021). Neurophysiological mechanisms underlying cortical hyper-excitability in amyotrophic lateral sclerosis: A review. *Brain Sciences*, *11*(5). doi: 10.3390/brainsci11050549
- 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*(May), 0–23. doi: 10.22201/fesz.23958723e.2018.0.143
- Ralli, M., Lambiase, A., Artico, M., de Vincentiis, M., & Greco, A. (2019). Amyotrophic lateral sclerosis: Autoimmune pathogenic mechanisms, clinical features, and therapeutic perspectives. *Israel Medical Association Journal*, *21*(7), 438–443.
- Rappaport, N., Nativ, N., Stelzer, G., Twik, M., Guan-Golan, Y., Stein, T. I. & Lancet, D. (2013). MalaCards: An integrated compendium for diseases and their annotation. *Database*, *2013*, 1–14. doi: 10.1093/database/bat018
- Saini, V., & Kumar, A. (2012). QSAR Analysis of Saquinavir Analogues (Peptidomimetics) as Potent HIV-Protease Inhibitors. *South Asian Journal of Experimental Biology*, *2*(3), 118-127–127.
- Sala, G., Arosio, A., Conti, E., Beretta, S., Lunetta, C., Riva, N. & Tremolizzo, L. (2019). Riluzole selective antioxidant effects in cell models expressing amyotrophic lateral sclerosis endophenotypes. *Clinical Psychopharmacology and Neuroscience*, *17*(3), 438–442. doi: 10.9758/cpn.2019.17.3.438
- Schreiber, F. (2011). Analysis and visualization of biological networks. *Informatik-Spektrum*, *32*(4), 301–309. doi: 10.1007/s00287-009-0351-8
- Schweiker, S. S., & Levonis, S. M. (2020). Navigating the intricacies of molecular docking. *Future Medicinal Chemistry*, *12*(6), 469–471. doi: 10.4155/fmc-2019-0355
- Sehgal, S. A., Hammad, M. A., Tahir, R. A., Akram, H. N., & Ahmad, F. (2018). Current Therapeutic Molecules and Targets in Neurodegenerative Diseases Based on in silico Drug Design. *Current Neuropharmacology*, *16*(6), 649–663. doi: 10.2174/1570159x16666180315142137
- Shahi, S., & Pharmaceuticals, L. (2014). *Micro particles : An approach for betterment of drug delivery system*. (January 2011).
- Skolariki, K. (2020). *Gene Network Visualization and Functional Enrichment Analysis in Genes Associated with Amyotrophic Lateral Sclerosis*. (June). doi: 10.31021/jnn.20203148
- Smith, R., Piore, E., Myers, K., Sirdofsky, M., Goslin, K., Meekins, G. & Pattee, G. (2017).

- Enhanced Bulbar Function in Amyotrophic Lateral Sclerosis: The Nuedexta Treatment Trial. *Neurotherapeutics*, 1–12. doi: 10.1007/s13311-016-0508-5
- Stank, A., Kokh, D. B., Fuller, J. C., & Wade, R. C. (2016). Protein Binding Pocket Dynamics. *Accounts of Chemical Research*, 49(5), 809–815. doi: 10.1021/acs.accounts.5b00516
- Steven M. Singer, Marc Y. Fink, V. V. A. (2019). Potential Environmental Factors in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Physiology & Behavior*, 176(3), 139–148. doi: 10.1016/j.ncl.2015.07.009.Potential
- Thibaudeau, T. A., & Smith, D. M. (2019). A practical review of proteasome pharmacology. *Pharmacological Reviews*, 71(2), 170–197. doi: 10.1124/pr.117.015370
- Trias, E., Ibarburu, S., Barreto-Núñez, R., Babdor, J., Maciel, T. T., Guillo, M., & Barbeito, L. (2016). Post-paralysis tyrosine kinase inhibition with masitinib abrogates neuroinflammation and slows disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neuroinflammation*, 13(1), 1–12. doi: 10.1186/s12974-016-0620-9
- Valko, K., & Ciesla, L. (2019). Amyotrophic lateral sclerosis. In *Progress in Medicinal Chemistry* (1st ed., Vol. 58). Elsevier B.V. doi: 10.1016/bs.pmch.2018.12.001
- Vallerga, C. L., Zhang, F., Fowdar, J., McRae, A. F., Qi, T., Nabais, M. F. & Gratten, J. (2020). Analysis of DNA methylation associates the cystine–glutamate antiporter SLC7A11 with risk of Parkinson’s disease. *Nature Communications*, 11(1), 1–10. doi: 10.1038/s41467-020-15065-7
- Voss, S. E. (2019). Resource Review. *Ear and Hearing*, 40(6), 1481. doi: 10.1097/AUD.0000000000000790
- Wang, X., Lu, J., Ge, S., Hou, Y., Hu, T., Lv, Y., ... He, H. (2020). *Microbial Pathogenesis Astemizole as a drug to inhibit the effect of SARS-COV-2 in vitro.* (January).
- Wang, Y., & Patani, R. (2020). Novel therapeutic targets for amyotrophic lateral sclerosis: ribonucleoproteins and cellular autonomy. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 24(10), 971–984. doi: 10.1080/14728222.2020.1805734
- Xia, X. (2017). Bioinformatics and Drug Discovery. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 17(15), 1709–1726. doi: 10.2174/1568026617666161116143440
- Yi, Y., Fang, Y., Wu, K., Liu, Y., & Zhang, W. (2020). Comprehensive gene and pathway analysis of cervical cancer progression. *Oncology Letters*, 19(4), 3316–3332. doi: 10.3892/ol.2020.11439
- Zaldivar, T., Gutierrez, J., Lara, G., Carbonara, M., Logroscino, G., & Hardiman, O. (2009). Reduced frequency of ALS in an ethnically mixed population: A population-based

mortality study. *Neurology*, 72(19), 1640–1645. doi:
10.1212/WNL.0b013e3181a55f7b

ANEXOS

Search results for amyotrophic lateral sclerosis

2127 hits were found for amyotrophic lateral sclerosis

#	Family	MCID	Name	MIFTS	Score
1	⊆	AMY091	Amyotrophic Lateral Sclerosis 1	87	331.317
2	⊆	LTR001	Lateral Sclerosis	57	224.589
3	⊆	AMY027	Amyotrophic Lateral Sclerosis-Parkinsonism/dementia Complex 1	57	149.840
4	⊆	MLT020	Multiple Sclerosis	79	135.661
5	⊆	FRN044	Frontotemporal Dementia and/or Amyotrophic Lateral Sclerosis 1	64	133.100
6	⊆	AMY106	Amyotrophic Lateral Sclerosis 10 with or Without Frontotemporal Dementia	45	114.303
7	⊆	AMY045	Amyotrophic Lateral Sclerosis 4 Juvenile	49	111.741
8	⊆	AMY058	Amyotrophic Lateral Sclerosis 2 Juvenile	41	108.270
9	⊆	AMY090	Amyotrophic Lateral Sclerosis 8	44	103.459
10	⊆	AMY085	Amyotrophic Lateral Sclerosis 9	36	100.577
11	⊆	AMY083	Amyotrophic Lateral Sclerosis 11	39	98.950
12	⊆	AMY057	Amyotrophic Lateral Sclerosis 16 Juvenile	39	97.382
13	⊆	FRN059	Frontotemporal Dementia and/or Amyotrophic Lateral Sclerosis 7	49	97.161
14	⊆	AMY023	Amyotrophic Lateral Sclerosis Type 6	36	95.085

Anexo 1. Entradas de la base de datos MalaCards

Amyotrophic lateral sclerosis - PS105400 - 37 Entries

[View corresponding clinical synopses as a table](#)

Location [▲]	Phenotype [⚡]	Inheritance [⚡]	Phenotype mapping key [⚡]	Phenotype MIM number [⚡]	Gene/Locus [⚡]	Gene/Locus MIM number [⚡]
1p36.22	Amyotrophic lateral sclerosis 10, with or without FTD	AD	3	612069	TARDBP	605078
1p36.22	Frontotemporal lobar degeneration, TARDBP-related	AD	3	612069	TARDBP	605078
2p13.1	{Amyotrophic lateral sclerosis, susceptibility to}	AD, AR	3	105400	DCTN1	601143
2q33.1	Amyotrophic lateral sclerosis 2, juvenile	AR	3	205100	ALS2	606352
2q34	Amyotrophic lateral sclerosis 19	AD	3	615515	ERBB4	600543
2q35	Amyotrophic lateral sclerosis 22 with or without frontotemporal dementia	AD	3	616208	TUBA4A	191110
3p11.2	Frontotemporal dementia and/or amyotrophic lateral sclerosis 7	AD	3	600795	CHMP2B	609512
4q33	{Amyotrophic lateral sclerosis, susceptibility to, 24}	AD	3	617892	NEK1	604588
5q31.2	Amyotrophic lateral sclerosis 21	AD	3	606070	MATR3	164015

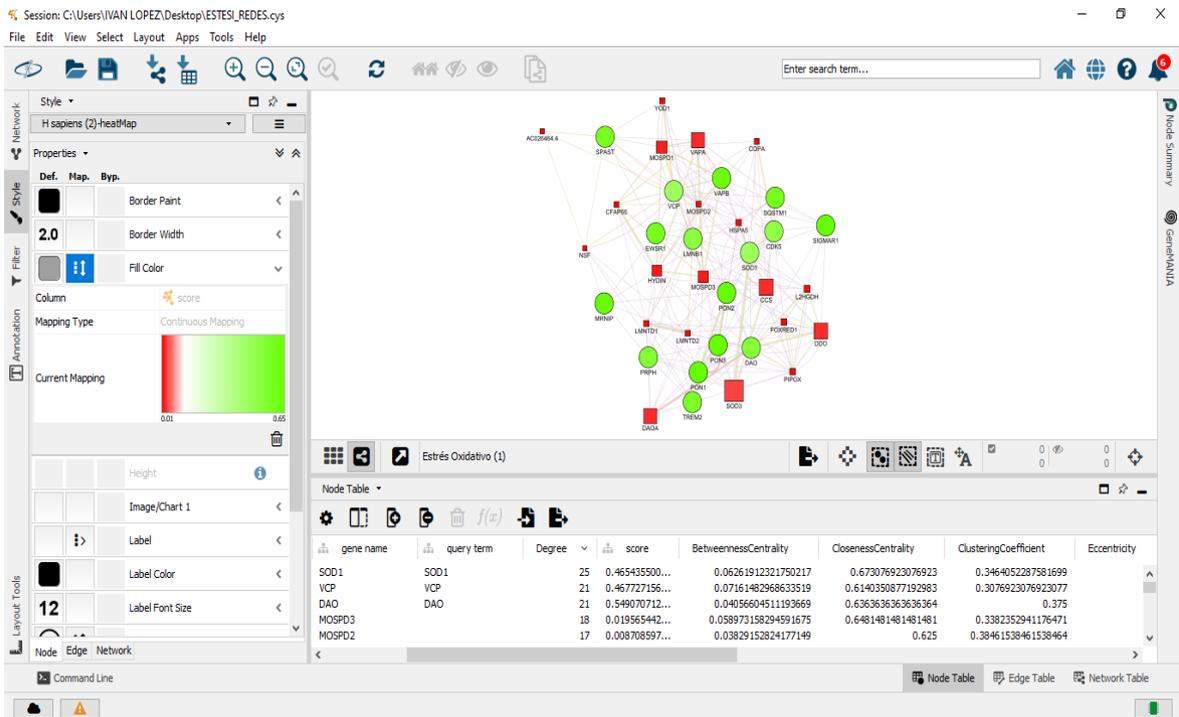
Anexo 2. Listado de genes agrupados en series fenotípicas en la base de datos OMIM

Symbol	Name	Standardized Value
SOD1	superoxide dismutase 1, soluble	2.88009
PTGS2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)	2.88009
CAMK1G	calcium/calmodulin-dependent protein kinase 1G	2.88009
TP53	tumor protein p53	2.88009
TNFRSF21	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21	2.88009
TARDBP	TAR DNA binding protein	2.88009
GSTP1	glutathione S-transferase pi 1	2.88009
CHMP2B	charged multivesicular body protein 2B	2.88009
SIGMAR1	sigma non-opioid intracellular receptor 1	2.88009
PLA2G4A	phospholipase A2, group IVA (cytosolic, calcium-dependent)	2.88009
GFAP	glial fibrillary acidic protein	2.88009
UNC13A	unc-13 homolog A (C. elegans)	2.88009
DPP6	dipeptidyl-peptidase 6	2.88009
SOD2	superoxide dismutase 2, mitochondrial	2.88009
DBR1	debranching RNA lariats 1	2.88009
SQSTM1	sequestosome 1	2.88009
SLC1A2	solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter), member 2	2.88009
CD40LG	CD40 ligand	2.88009
GSR	glutathione reductase	2.88009
SLC6A1	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter), member 1	2.88009

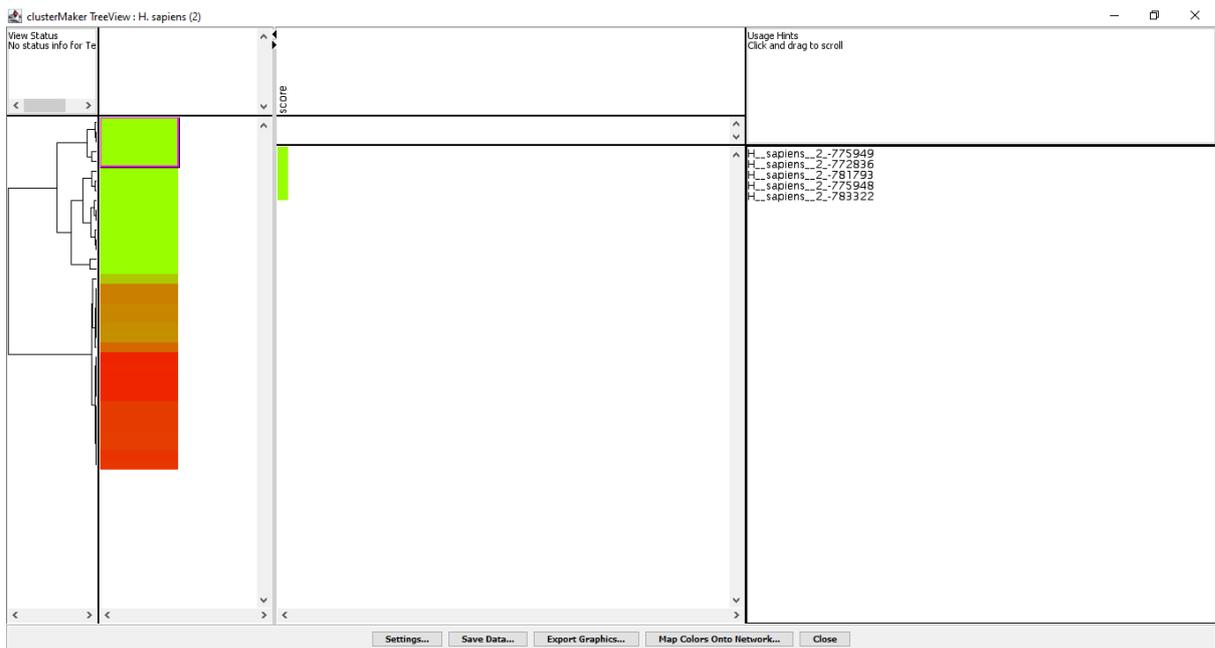
Anexo 3. Lista de genes agrupados en la base de datos Harmonizome

Genes for Amyotrophic Lateral Sclerosis 1						
Genes related to Amyotrophic Lateral Sclerosis 1 (44 elite genes): (showing 50, show less) (show all 487)						
#	Symbol	Description	Category	Score	Evidence	PubMed IDs
1	SOD1 *	Superoxide Dismutase 1	Protein Coding	1733.66	Molecular basis known ⁵⁷ Pathogenic ⁶ Causative germline mutation ⁵⁸ Causative variation ⁷² Genetic Tests ⁴⁹ Likely pathogenic ⁶ DISEASES inferred ^{15 15} Novoseek inferred ⁵⁴ GeneCards inferred via: Disorders Gene name Variants (show sections)	7501156 20577002 25109764 (more)
2	DCTN1 *	Dynactin Subunit 1	Protein Coding	1421.85	Molecular basis known ⁵⁷ Pathogenic ⁶ Causative variation ⁷² Genetic Tests ⁴⁹ Susceptibility factor ⁵⁷ Risk factor ⁶ Candidate gene tested ⁵⁸ DISEASES inferred ^{15 15} Novoseek inferred ⁵⁴	23143281 12627231 27573046 (more)
3	VCP *	Valosin Containing Protein	Protein Coding	894.82	Pathogenic ⁶ Causative germline mutation ⁵⁸ Genetic Tests ⁴⁹	15034582 21145000 21984748 (more)

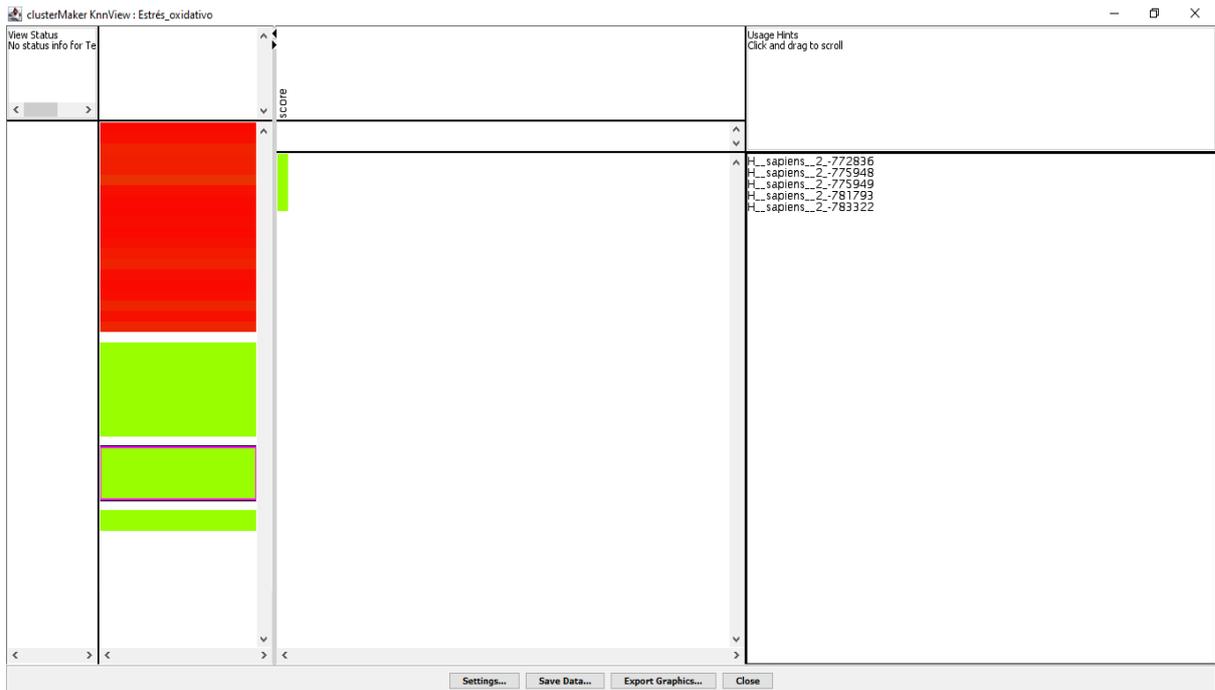
Anexo 4. Genes elite en la base de datos MalaCards



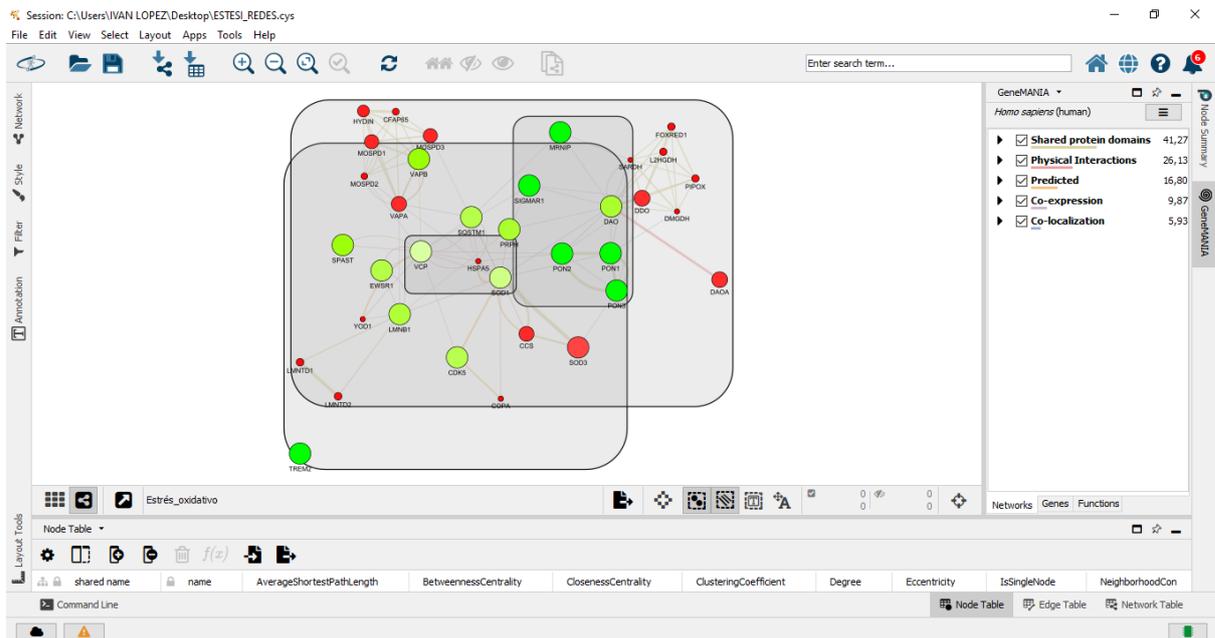
Anexo 5 Red Biológica con atributos del estrés oxidativo



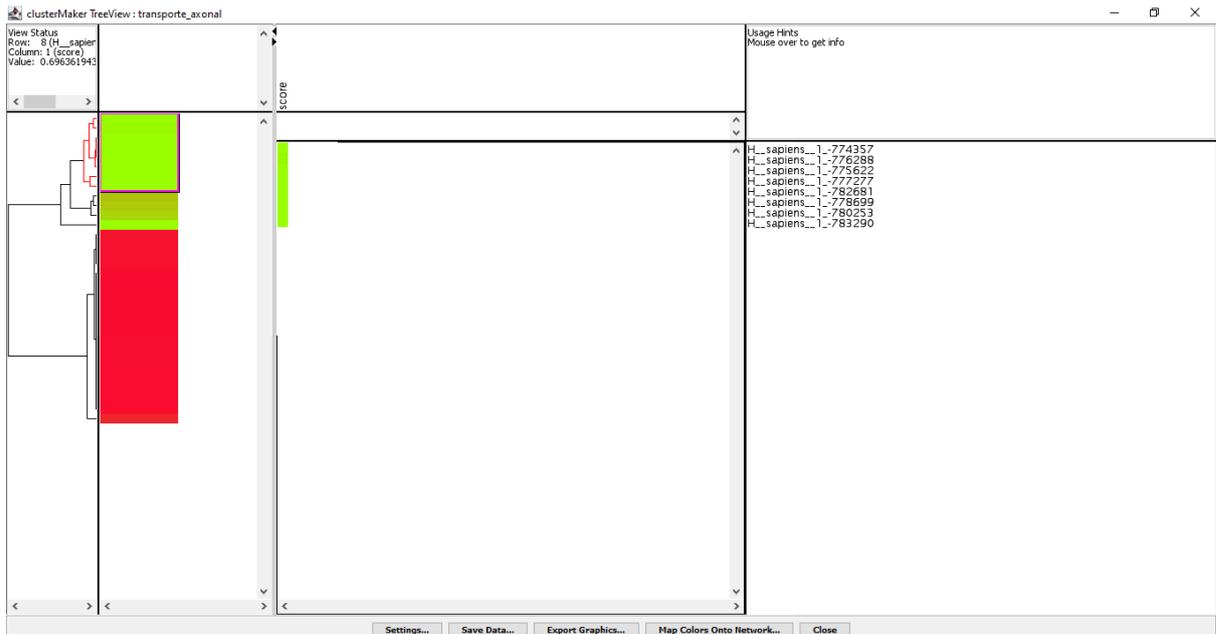
Anexo 6. Expresión de genes aplicando Hierarchical Cluster en el estrés oxidativo



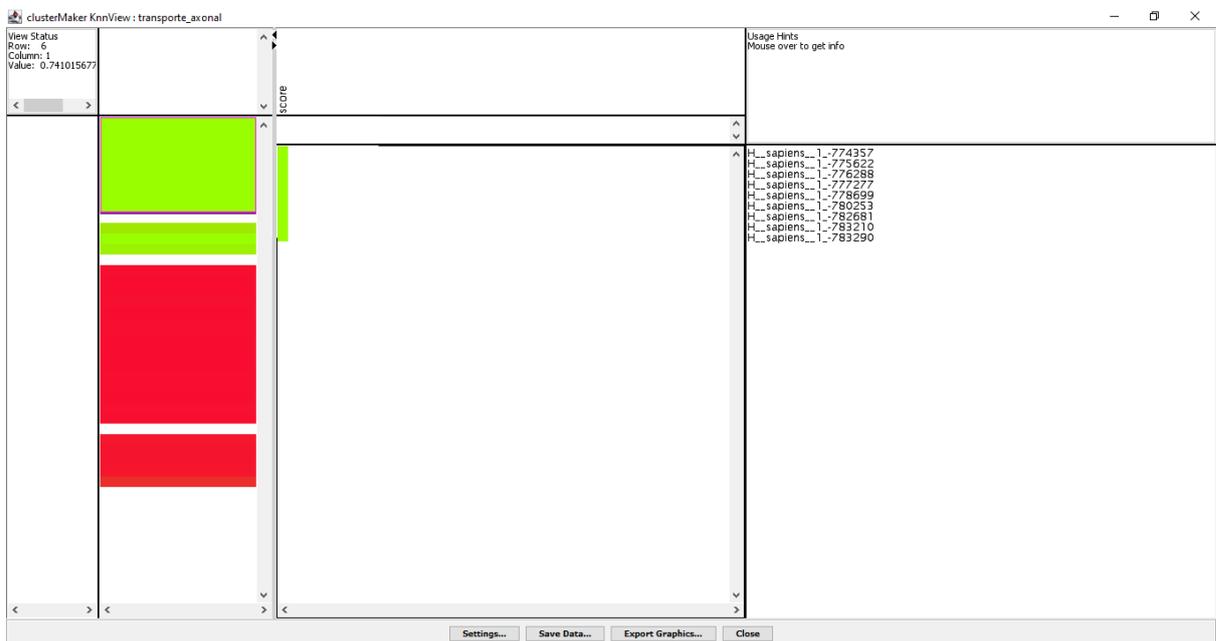
Anexo 7. Expresión de genes aplicando Cluster K-means en el estrés oxidativo



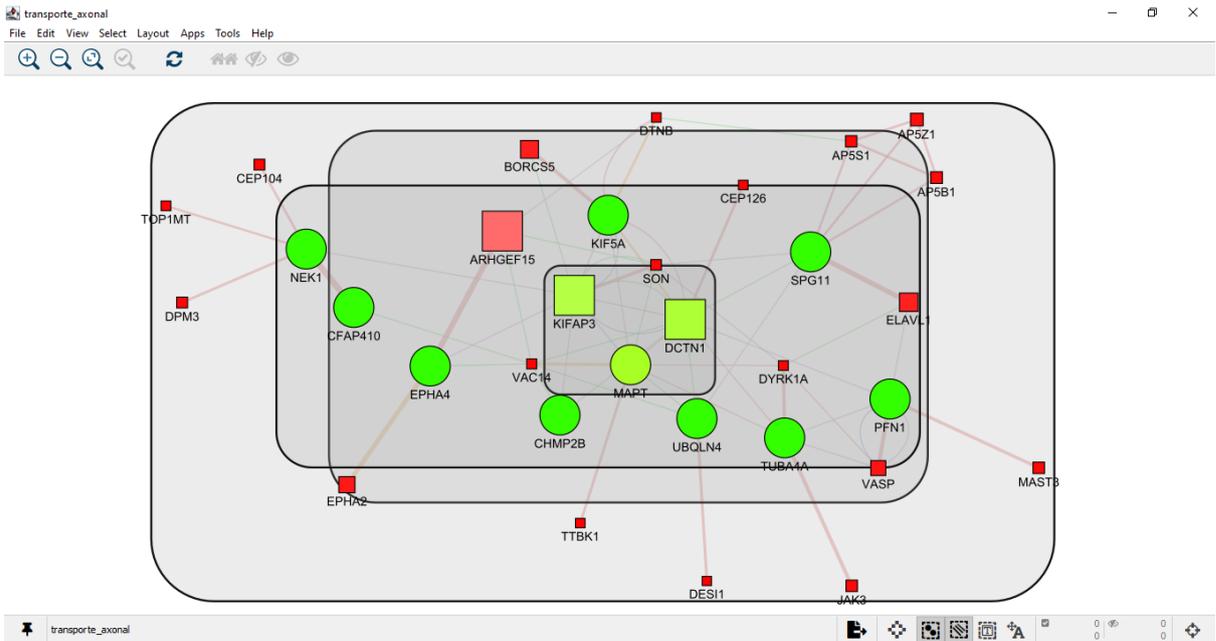
Anexo 8. División de zonas en función de la expresión de genes aplicando Cluster K-means en el estrés oxidativo



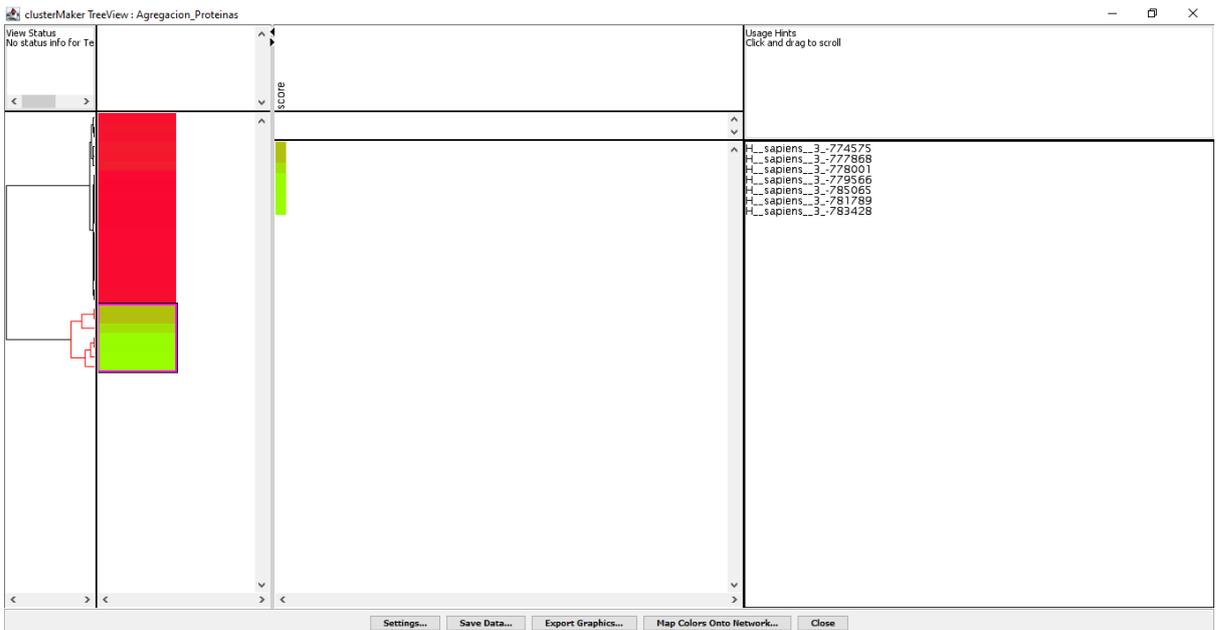
Anexo 9. *Expresión de genes aplicando Hierarchical Cluster en el transporte axonal*



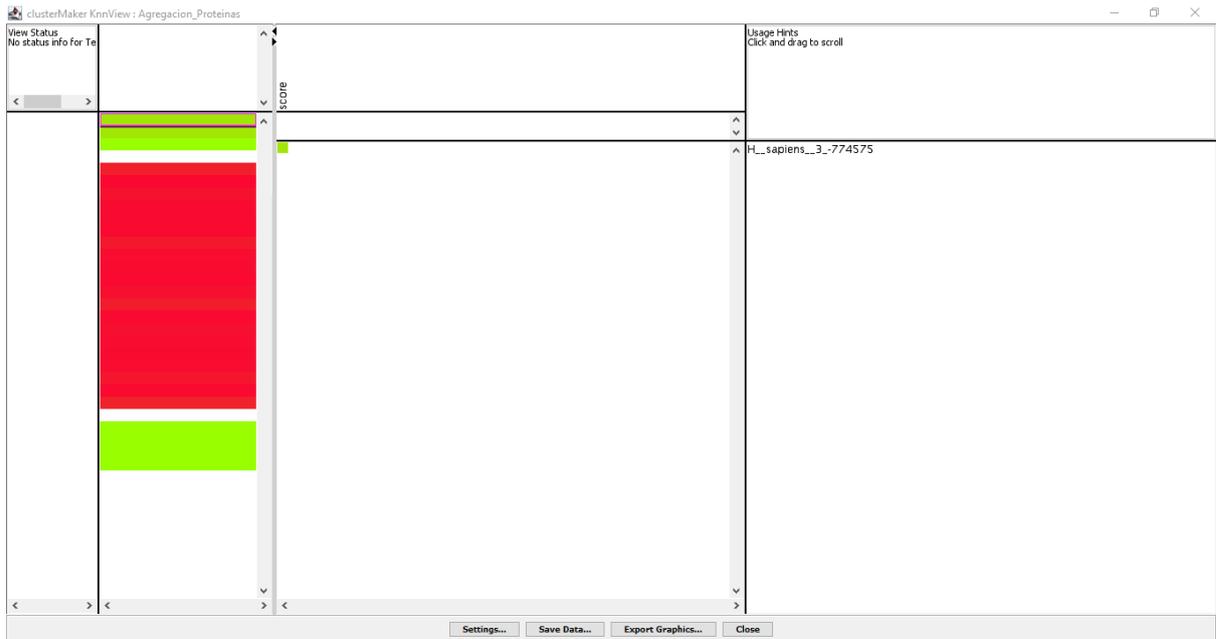
Anexo 10. *Expresión de genes aplicando Cluster K-means en el transporte axonal*



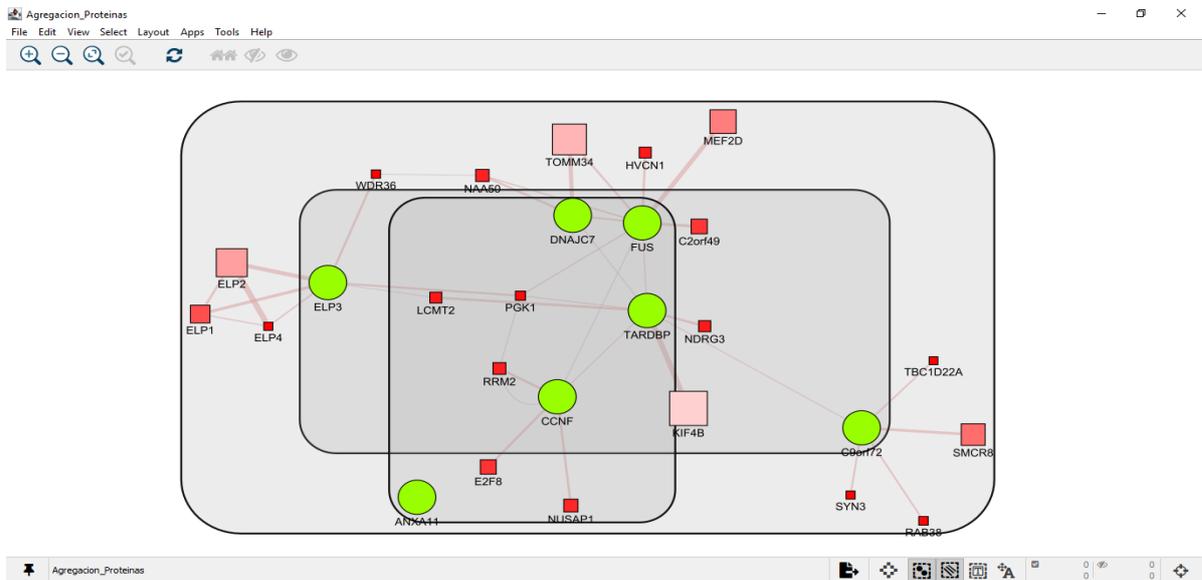
Anexo 11. División de zonas en función de la expresión de genes aplicando Cluster K-means en el transporte axonal



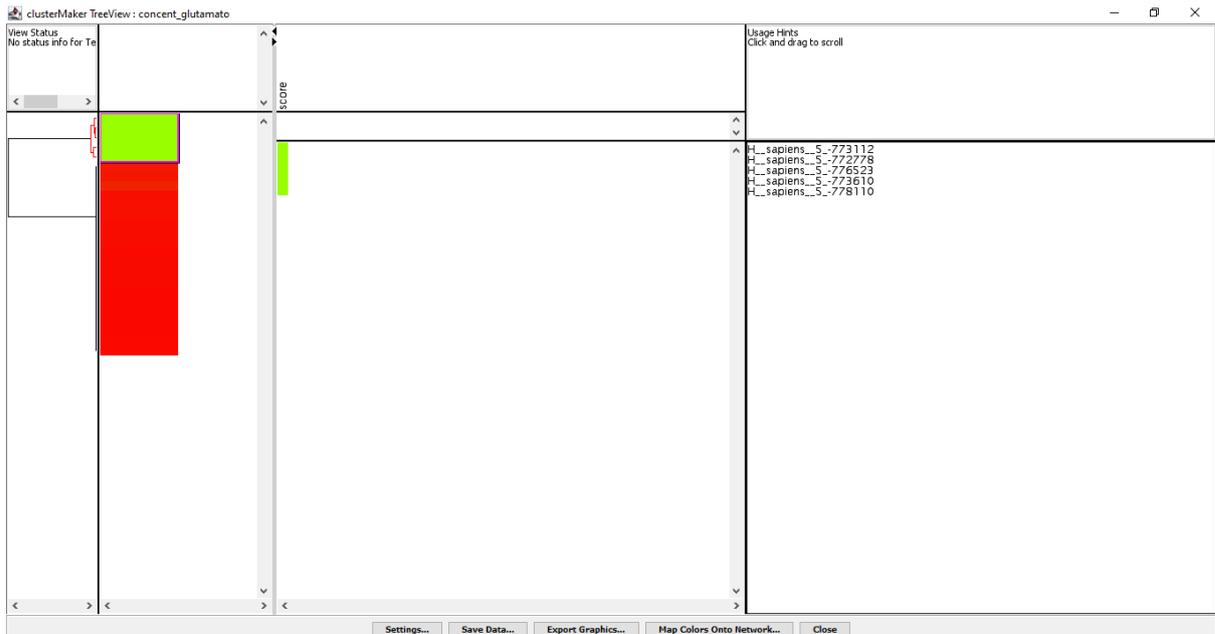
Anexo 12. Expresión de genes aplicando Hierarchical Cluster en la agregación de proteínas



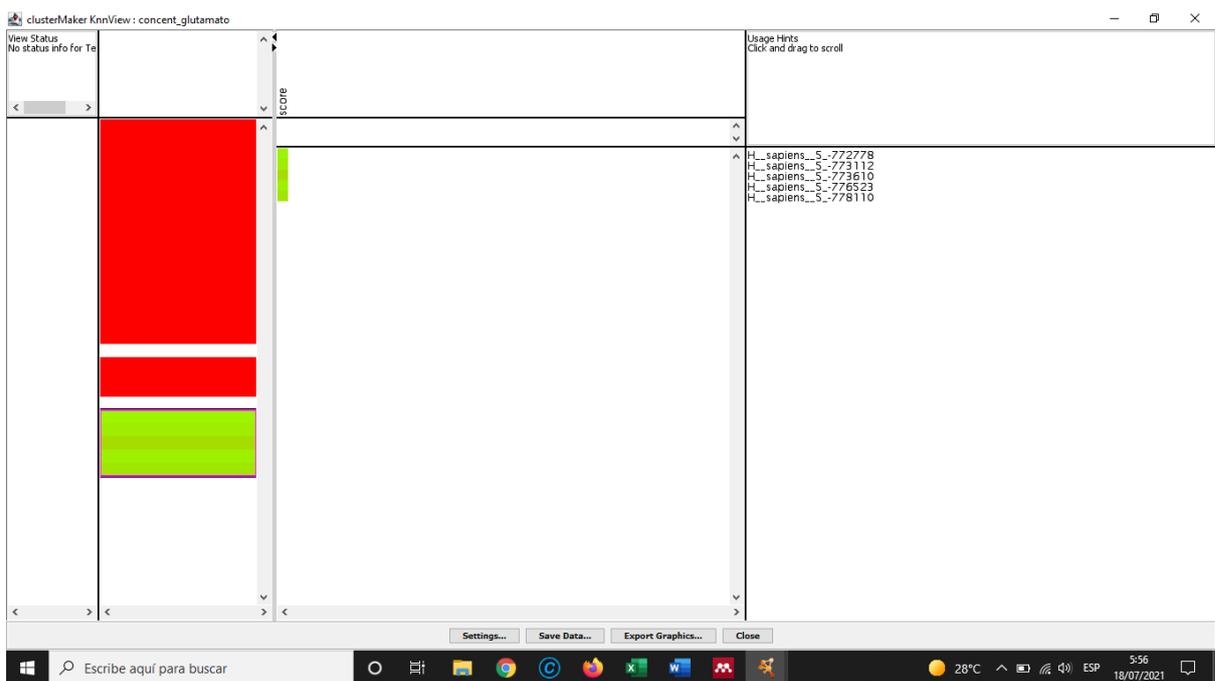
Anexo 13. *Expresión de genes aplicando Cluster K-means en la agregación de proteínas*



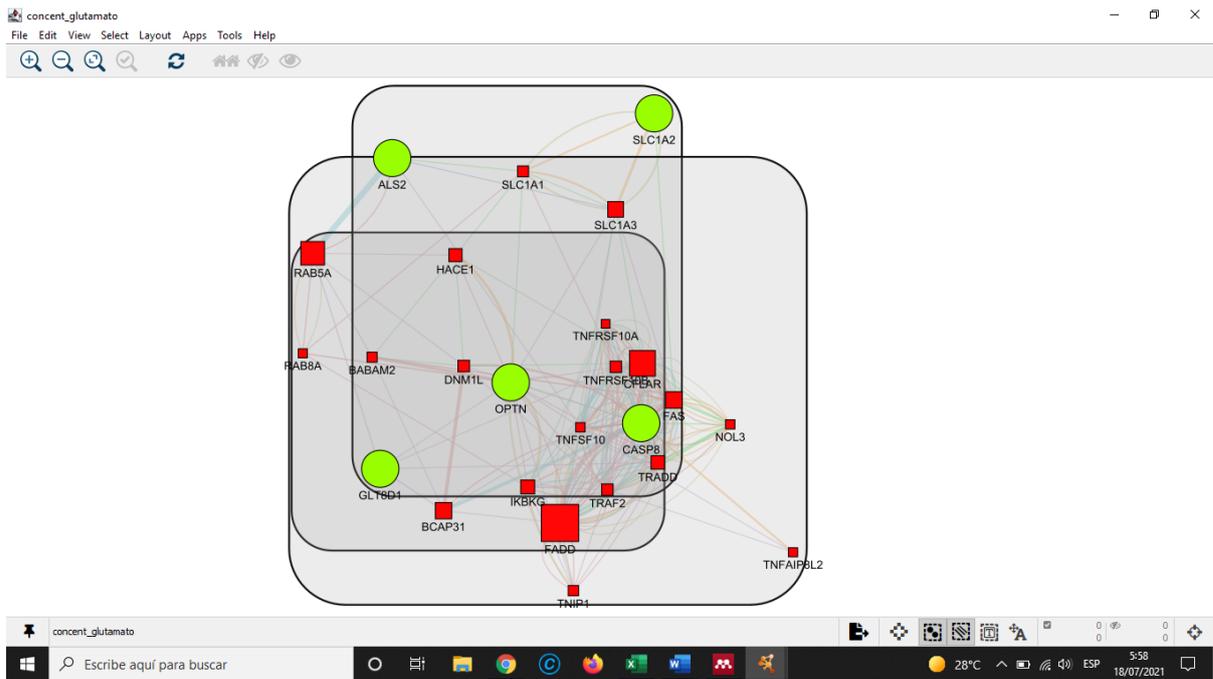
Anexo 14. *División de zonas en función de la expresión de genes aplicando Cluster K-means en la agregación de proteínas*



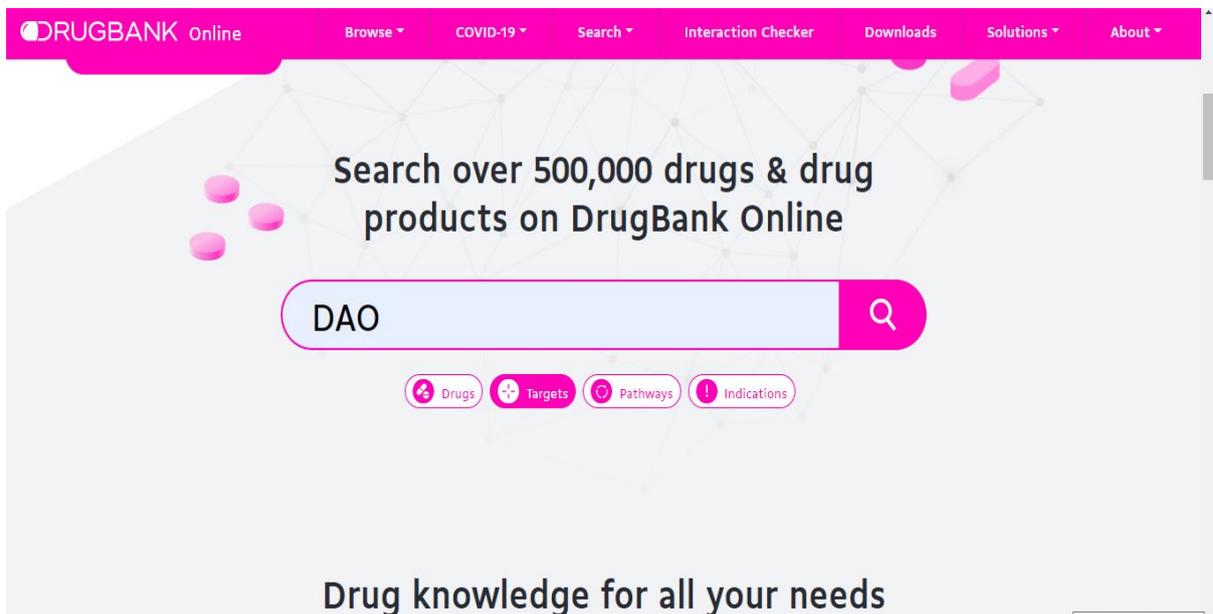
Anexo 15. *Expresión de genes aplicando Hierarchical Cluster en la excitotoxicidad*



Anexo 16. *Expresión de genes aplicando Cluster K-means en la excitotoxicidad*



Anexo 17. División de zonas en función de la expresión de genes aplicando Cluster K-means en la excitotoxicidad



Anexo 18. Plataforma DrunkBank

DRUGBANK Online Browse ▾ COVID-19 ▾ Search ▾ Interaction Checker Downloads Solutions ▾ About ▾

Transitional endoplasmic reticulum ATPase

DETAILS

Name Transitional endoplasmic reticulum ATPase

Kind protein

Organism Humans

Protein

NAME	UNIPROT ID
Transitional endoplasmic reticulum ATPase	P55072 Details

DRUG RELATIONS

Drug Relations Show 10 entries Search

DRUGBANK ID	NAME	DRUG GROUP	PHARMACOLOGICAL ACTION?	ACTIONS	DETAILS
DB04395	Phosphoaminophosphonic Acid-Adenylate Ester	experimental	unknown		Details

Anexo 19. *Medicamentos asociados a al gen Transitional endoplasmic reticulum ATPase (VCP)*


 Universität Hamburg
 DER FORSCHUNG | DER LEHRE | DER BILDUNG

ZBH - Center for Bioinformatics



PDB-Code or search term:

Upload Protein (PDB format): Ningún archivo seleccionado
 Upload Ligand (SDF format): Ningún archivo seleccionado

[Advanced search](#)



Anexo 20. *Base de datos Proteins Plus*

RPBS Web Portal (guest) set email sign-in sign-out refresh workspace

Search [more] Welcome Forms Data Bookmarks **Jobs** Tutorials

Overview MTIOpenScreen - 07/28/21 20:14:28 ✖

<https://mobyte.rpbs.univ-paris-diderot.fr/data/jobs/MTIOpenScreen/Y18694732655048>

update get help back to form remove job

job progress report

parameters

Demonstration Mode

Example run of the service with the 4AG8 protein receptor and our curated database. False

Protein receptor

Programs: Drugs, Peptides, Sequence, Structure, Test

Tutorials: Data formats, Howto cite, Overview, PDBInput, Policy, Registration, Stepbystep

Data Bookmarks: [overview] _3DStructure : VCP.pdb, Receptor_3DStructure : receptor_file.data

Jobs: [overview] MTIOpenScreen - 07/28/21 20:14:28

Services Help Pages

Escribe aquí para buscar 13°C Despejado ESP 22:01 28/07/2021

Anexo 21. Posición de la Grid del sitio más drugable de la proteína Vesicle-associated membrane protein-associated protein B/C (VAPB)

VEGA in silico platform - version 1.1.5

Insert chemicals

INSERT SELECT EXPORT PREDICT

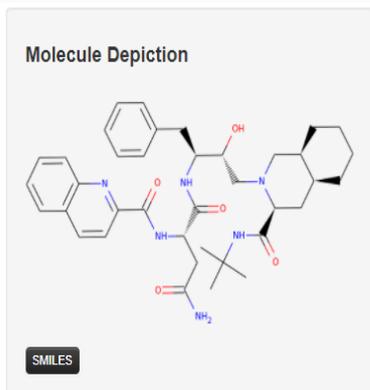
Insert SMILES:

Import File

ID	SMILES
Molecule 0	<chem>O=C4c5c(O)cc(OC2OC(COC1OC(C)C(O)C1(O))C...</chem>

Delete All Delete

Anexo 22. Análisis fisicoquímicos en el paquete VEGA



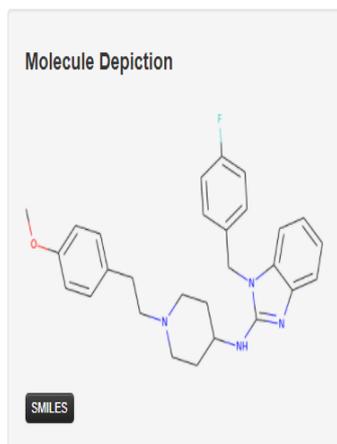
Molecule properties:

Descriptor	Value
Molecular Weight	670.855
LogP	3.0924
#Rotatable Bonds	12
#Acceptors	7
#Donors	5
Surface Area	287.964

Property	Model Name	Predicted Value	Unit
Absorption	Water solubility	-3.936	Numeric (log mol/L)
Absorption	Caco2 permeability	0.701	Numeric (log Papp in 10 ⁻⁶ cm/s)
Absorption	Intestinal absorption (human)	59.099	Numeric (% Absorbed)
Absorption	Skin Permeability	-2.735	Numeric (log Kp)
Absorption	P-glycoprotein substrate	Yes	Categorical (Yes/No)
Absorption	P-glycoprotein I inhibitor	Yes	Categorical (Yes/No)
Absorption	P-glycoprotein II inhibitor	Yes	Categorical (Yes/No)
Distribution	VDss (human)	0.631	Numeric (log L/kg)
Distribution	Fraction unbound (human)	0.022	Numeric (Fu)
Distribution	BBB permeability	-0.982	Numeric (log BB)
Distribution	CNS permeability	-3.614	Numeric (log PS)
Metabolism	CYP2D6 substrate	No	Categorical (Yes/No)
Metabolism	CYP3A4 substrate	Yes	Categorical (Yes/No)
Metabolism	CYP1A2 inhibitor	No	Categorical (Yes/No)

Anexo 23. Análisis realizados mediante el paquete web pkCSM del fármaco

Pharmacokinetic Properties



Property	Model Name	Predicted Value	Unit
Absorption	Water solubility	-2.958	Numeric (log mol/L)
Absorption	Caco2 permeability	0.237	Numeric (log Papp in 10 ⁻⁶ cm/s)
Absorption	Intestinal absorption (human)	86.518	Numeric (% Absorbed)
Absorption	Skin Permeability	-2.735	Numeric (log Kp)
Absorption	P-glycoprotein substrate	Yes	Categorical (Yes/No)
Absorption	P-glycoprotein I inhibitor	Yes	Categorical (Yes/No)
Absorption	P-glycoprotein II inhibitor	Yes	Categorical (Yes/No)
Distribution	VDss (human)	-0.044	Numeric (log L/kg)

Anexo 24. Análisis realizados mediante el paquete web pkCSM del fármaco