

Bioinformatic Studies for the Identification of Possible Therapeutic Targets in Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) Disease

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

Iván López Pérez¹; Alex Valencia Silva²; Luis Varela Polit³; Cristian Galarza Galarza^{2*}

ABSTRACT

Amyotrophic Lateral Sclerosis is a neurodegenerative disease characterized by the progressive loss of neurons in different areas of the central nervous system. The most relevant genes grouped by the dysfunction they cause were obtained. Twenty-six elite genes were selected, and interaction networks were designed to identify the most important connections between the proteins synthesized by these genes. Genes that follow the SOD1 metabolic pathway were chosen, and domains were selected that meet the best drugability criteria. The receptors were validated using the DrugBank database. The Valosin Containing Protein (VCP) and VAMP Associated Protein B and C (VAPB) genes were identified in relation to the disease, and the protein receptors transitional endoplasmatic reticulum and Vesicle-associated membrane protein-associated protein B/C with their targets Saquinavir and Astemizole, two commercial drugs whose toxicological properties were analyzed to ensure their applicability. Saquinavir presented better properties in the evaluation of Quantitative Structure-Activity Relationship, Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion and Toxicity. Likewise, Astemizole presented greater stability, due to the hydrogen bonds in it.

Keywords: ALS, Therapeutic Target, Computer Aided Drug Design.

RESUMEN

La Esclerosis Lateral Amiotrófica es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por la pérdida progresiva de neuronas en diferentes áreas del sistema nervioso central. Se obtuvo los genes más relevantes agrupados por la disfunción que causan. 26 genes elite fueron seleccionados y se diseñó redes de interacción para identificar las conexiones más importantes entre las proteínas que sintetizan estos genes. Se escogió los genes que siguen la ruta metabólica del SOD1, , potencialmente estos ligando podrían transformarse en medicamentos. Se validaron los receptores utilizando la base de datos DrugBank. Se identificó los genes Valosin Containing Protein (VCP) y VAMP Associated Protein B and C (VAPB) con relación a la enfermedad, y los receptores proteicos Transitional endoplasmatic reticulum y Vesicle-associated membrane protein-associated protein B/C con sus dianas Saquinavir y Astemizole, dos fármacos comerciales de los cuales se analizó las propiedades toxicológicas para garantizar su aplicabilidad. Saquinavir presentó mejores propiedades en la evaluación de la Relación Cuantitativa Estructura-Actividad, Absorción, Distribución, Metabolismo, Excreción y Toxicidad. Asimismo, Astemizole presentó mayor estabilidad, por los puentes de hidrógeno en sus enlaces.

Palabras clave: ELA, Diana Terapéutica, Diseño de fármacos asistido por computador.

Recibido 23 de diciembre de 2022 Aceptado 12 de junio de 2023

¹Birkbeck Universidad de Londres, Departamento de Ciencias Biológicas, ilopez04@student.bbk.ac.uk;

²Universidad Técnica de Ambato, Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología, Ambato, Ecuador,

³Universidad Internacional del Ecuador, Especialidad de Medicina Interna, Quito, Ecuador, luisvarelapo@uide.edu.ec

*Autor para correspondencia: +593 984642131; email: cf.galarza@uta.edu.ec

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades neuronales han sido caracterizadas por la pérdida progresiva de neuronas en diferentes áreas del sistema nervioso central. En algunos casos ocurre de forma esporádica y en otras a través de factores hereditarios. La ELA es 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 (Ralli et al., 2019). A pesar de varios años de estudio intensivo, en la actualidad no existe un tratamiento efectivo para la ELA y el único medicamento aprobado solo retrasa la apoptosis celular.

Aproximadamente, dos de cada 100.000 personas son afectadas por la ELA en Estados Unidos y Europa cada año (Riancho et al., 2019). En América Latina se ha venido estudiando la enfermedad durante varios años, encontrándose una tasa de mortalidad importante misma que se ve agravada por las condiciones económicas que atraviesan sus países (Castro-Rodríguez et al., 2021). En este contexto, en el Ecuador la incidencia se encuentra entre el 0,2 y 0,6 por cada 100.000 personas, cuyo diagnóstico y tratamiento en sus fases tempranas se dificulta debido a la deficiente administración de su sistema de salud pública.

Los mecanismos moleculares que se identificaron en el desarrollo neurodegenerativo de la ELA permiten entender que existe una compleja interacción entre la excitotoxicidad, generación de radicales libres, agregación de proteínas citoplasmáticas, mutaciones enzimáticas del superóxido dismutasa (SOD1), disfunción mitocondrial y disrupción de procesos de transporte axonal (Kiernan et al., 2011). A través del análisis de estos mecanismos se puede entender de mejor forma la significancia biológica que tienen las dianas terapéuticas identificadas en esta enfermedad.

A través del enfoque computacional se realizan modelamientos matemáticos en secuencias biológicas, almacenamiento de datos de ADN, entre otros, con la finalidad de identificar los mecanismos moleculares detrás de enfermedades humanas. La bioinformática comprende diferentes disciplinas de la ciencia como genómica, transcriptómica, proteómica y filogenética molecular (Jain, 2017). Los métodos computacionales del diseño de fármacos se basan en el principio de que, compuestos farmacológicamente activos actúan por interacción con la diana terapéutica (Metwally & Hathout 2015). Con el uso de estas herramientas bioinformáticas se optimiza e identifica nuevos medicamentos a través del descubrimiento de información química y biológica sobre los posibles ligandos o dianas terapéuticas, así también, utilizamos procesos de simulación para eliminar compuestos que tienen propiedades indeseables y poder de esta forma seleccionar los mejores candidatos.

1.1. Mecanismos Moleculares de la ELA

1.1.1. 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) (Kiernan et al., 2011; Ralli et al., 2019). 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⁺ (Ralli et al., 2019). 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 (Castro-Rodríguez et al., 2021). Esta alteración en EAAT2 causa un incremento del glutamato y conlleva a la generación y muerte neuronal. Según Valko and Ciesla (2019) los niveles de glutamato se ven incrementados tres veces en 80% de los pacientes en comparación con los pacientes control.

1.1.2. 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. En estudios realizados en pacientes con ELA se identifica que existe deficiencia de la enzima citocromo c oxidasa.

1.1.3 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, la eliminación de estos agregados podría ser una solución terapéutica contra la ELA, algunos componentes moleculares o proteínas como OPTN, TDP43, FUS, C9ORF72 y UBQLN2 (ubiquitina 2) se encuentran relacionados con la agregación de proteínas (Blokhuis et al., 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).

1.1.4 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 and Ciesla (2019) el incremento del óxido nítrico sintasa (NOS) produce una mayor concentración de óxido nítrico (NO) y por lo tanto provocan la muerte celular, estas alteraciones no inician la muerte neuronal, sin embargo, contribuyen a la propagación del proceso neurodegenerativo.

1.1.5. Células Gliales

En la ELA la excitotoxicidad se encuentra mediada por células gliales las cuales están formadas 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 ya que son subtipos de células gliales muy abundantes dentro del sistema nervioso central, lo que también se comportan como sensores primarios (Liddelow et al., 2017). A través del daño neuronal, la microglía libera especies reactivas de oxígeno, citoquinas proinflamatorias y moléculas neurotóxicas, llevando a la muerte neuronal. Según Jo 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 para la 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 neuro inflamación y disminuir propagación de la enfermedad.

1.2. Enfoques terapéuticos.

Al no existir una terapia exitosa para pacientes que padecen ELA, se han sugerido varias hipótesis relacionadas a el mecanismo molecular causado por el estrés oxidativo. Según Franklin et al. (2012) el sistema de respuesta al estrés involucra varias rutas de señalización conservativa que han 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 se obtiene la generación de resiliencia celular.

Medicamentos como Riluzol han sido utilizados para reducir la toxicidad del glutamato en el sistema nervioso central, este es el único fármaco disponible a la fecha que puede prolongar la supervivencia de los pacientes con ELA aumentándola entre 11 hasta 14 meses (Ralli et al., 2019). El Riluzol bloquea los canales de sodio sensibles a la tetrodotoxina, reduciendo el paso de calcio y la estimulación de los receptores de glutamato. Aún existe incertidumbre relacionada con el mecanismo de acción de este fármaco lo que dificulta los intentos de diseñar un medicamento que aumente aún más la esperanza de vida del paciente (Sala et al., 2019).

Según Fujisawa and Yamamoto (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 realizados señalan que el efecto de Edaravone elimina peroxinitrito, así como radicales piróxilos de los lípidos, revelando gran efecto terapéutico en pacientes con ELA en etapa inicial (Okada et al., 2018).

1.3. Análisis de Toxicidad de las moléculas.

El análisis de toxicidad de las estructuras y ligandos permiten relacionar la actividad biológica con descriptores moleculares o su información fisicoquímica, este es un proceso importante en el diseño de un fármaco, se realizan análisis de absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad. Se efectúan pruebas de mutagenicidad, carcinogénesis y hepatotoxicidad mediante el uso de los códigos SMILES (Simplified molecular-input-line-entry system).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Selección de bibliografía

Para la búsqueda de bibliografía referente a los mecanismos moleculares y genes localizados en la ELA se utilizó bases de datos como MalaCards, KEGG, OMIM, Harmonizome, NCBI, PubMed donde se identificó varias entradas relacionadas con la enfermedad, así como otras asociadas a esta. Inicialmente se escogió las entradas que presentan mayor puntuación (score), así, la entrada seleccionada presentó un score de 229.074 y un valor para Malacards Information Score (MIFTS) de 87. El primer valor se obtuvo al sumar los algoritmos de base 10 de los recuentos de las anotaciones

pobladas y el segundo hizo referencia al nivel de información que tiene cada una de las entradas, siendo 101 el valor máximo (Rappaport et al., 2016). Se siguió el mismo procedimiento para las otras bases de datos, con el que finalmente se obtuvo un listado de genes que se relacionan con la enfermedad.

2.2. Selección de Genes

Para la selección de los genes se utilizó la función de puntuación que ofrece la base de datos MalaCards, esta puntuación se asocia a las enfermedades genéticas y se calculan como sumas ponderadas de las puntuaciones individuales derivadas de las siguientes 8 fuentes de información: OMIM, ClinVar, Orphanet, SwissProt/Humsavar, GeneTests, DISEASES, Novoseek y GeneCards. Estos valores de puntuación dependen del nivel de curación manual de la fuente de información, así como de la importancia asignada por la propia fuente a sus diferentes clases de anotación.

Se creó una hoja de cálculo en la que se muestra el nombre del gen, mecanismo molecular y el valor de puntuación, se ordenó de manera descendente agrupados por cada mecanismo molecular. En cada uno de estos se observó que existen genes poco relevantes, por lo que se procedió a filtrarlos, para finalmente seleccionar únicamente los genes que se encontraban en el tercer cuartil de la lista de cada agrupación analizada.

2.3. Integración de Datos

Para este proceso se utilizó el plugin GeneMANIA Cytoscape ya que a través de esta herramienta se puede predecir rápidamente la función de los genes (Montejo et al., 2010). Se generó la hipótesis sobre la función, análisis de listas y priorización de genes para ensayos funcionales.

Se realizó columnas con información de la red, en esta lista se encuentra el identificador, nombre de los genes, número de nodos y la puntuación. Las columnas restantes hicieron referencia al grado de centralidad que presentó cada uno. La identificación de los nodos con mejor puntuación y mayor número de interacciones se realizó mediante una representación de colores y formas, por lo que se identificó los nodos más representativos por el color verde y forma circular. Posteriormente, para generar los gráficos de agrupación de genes de forma jerárquica y de similar puntuación se aplicó el método de Hierarchical cluster y K-Means, respectivamente.

2.4. Validación de genes seleccionados

Para la validación de los genes se utilizó la base de datos DrugBank en la que se encontró información acerca de los medicamentos y las funciones que cumplen, se ingresó el nombre de los genes y se

especificó que se busca información acerca de las dianas. Se identificó varias entradas de medicamentos enlazadas a proteínas, cada entrada contiene varios campos con información importante, tales como, ensayos realizados, los targets y las fases de experimentación en la que se encuentra. De los datos obtenidos se comprobó que la mitad corresponde a información química o de medicamentos y la otra mitad, a proteínas o dianas farmacológicas

2.5. Pruebas de Viabilidad de las dianas terapéuticas

Para verificar la viabilidad de las dianas terapéuticas se estudió una característica fundamental conocida como “drugabilidad”, la que se analizó en cada uno de los dominios seleccionados. La “drugabilidad” refiere a la capacidad de una molécula o blanco terapéutico para convertirse en un fármaco efectivo y seguro. Implica la evaluación de si una molécula tiene el potencial de ser desarrollada y convertida en un medicamento, se basa en una serie de propiedades y características que se consideran deseables en una molécula o blanco terapéutico. En el descubrimiento de fármacos, la drugabilidad se define como la unión que puede ocurrir en un sitio biológico con buena potencia nanomolar y que al mismo tiempo presenta biodisponibilidad oral y progresión clínica (Finan et al., 2017).

Se utilizó el servicio web Proteins Plus del Centro para bioinformática de la Universidad de Hamburgo. En este servicio web se ingresó el nombre de las proteínas y se utilizó distintas herramientas de análisis molecular tales 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 y química textual en PDB (Goodsell et al., 2020). Se seleccionó el valor de “drugabilidad” mediante DoGSiteScorer, se escogió el sitio que presentó la mejor puntuación. Así mismo, el análisis de las rutas metabólicas de los genes seleccionados permitió que se escogieran aquellos genes que comparten una misma función y mecanismo molecular.

2.6. Búsqueda de moléculas que podrían interaccionar con las dianas

Para la búsqueda de los cristales se utilizó la base de datos Protein Data Bank (PDB), desde esta se descargó las estructuras 3D de los receptores que contienen los dominios identificados. Así también, se verificó los parámetros de calidad de los cristales mediante el análisis de métricas tales como: método de cristalización, resolución, valor RFree, clashcore, entre otros, con la finalidad de trabajar con un cristal de óptimas condiciones. Con estas moléculas y mediante el software Autodocktools, se calculó las dimensiones de la Grid y las coordenadas del centro, para posteriormente realizar el cribado virtual.

Para el cribado virtual se utilizó el receptor en formato 3D, se lo preparó eliminando previamente estructuras y disolventes presentes en la estructura. Este receptor se encontraba acompañado con un ligando específico, por lo que fue necesario eliminar esta estructura para quedarnos únicamente con el receptor. Mediante el servicio web MTIOpenScreen se efectuó un filtrado de posibles medicamentos, medicamentos en desarrollo y estructuras químicas que pueden acoplarse con el receptor (Goodsell et al., 2020). Se seleccionó la opción Custom parameters y se setearon las coordenadas del sitio de unión y las dimensiones del centro, con el fin de ejecutar los cálculos del acoplamiento sobre esta zona específica. Esta lista de los compuestos obtenidos de la base de datos de drogas y estructuras químicas, fueron ordenadas en función de la cantidad de energía de unión con el receptor.

2.7. Análisis de toxicidad de las moléculas

Una vez encontradas las posibles estructuras (dianas terapéuticas) que presentan afinidad por el sitio de unión de las proteínas, se empleó el paquete VEGA, mediante la aplicación de modelos QSAR, estos modelos permiten relacionar la actividad biológica con descriptores moleculares o información fisicoquímica de una estructura química. Se realizaron pruebas de mutagenicidad, carcinogénesis y hepatotoxicidad a través del uso de los códigos SMILES (Simplified molecular-input line-entry system) para comparar resultados de inhibidores conocidos con la diana. Finalmente, se analizaron las propiedades de las moléculas elegidas mediante el servicio web pkCSM (Pires et al., 2015) para realizar pruebas de ADMET (Absorción, Distribución, Metabolismo, Excreción, Toxicidad) a partir de los códigos SMILES anteriormente mencionados.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Selección de Genes Elite relacionados con ELA

Integramos la información mediante la identificación de elementos comunes, y se encontró 59 genes elite extraídos de las bases de datos MalaCards, Harmonizome, OMIM y KEGG. El análisis comparativo reveló información y patrones coincidentes en las bases de datos, lo que permitió identificar posibles relaciones entre estos genes. En la base de datos MalaCards, se obtuvo una lista de 33 genes elite que presentaron una puntuación que se basa en la suma del algoritmo en base 10 de los recuentos de las anotaciones pobladas, se tomó como referencia para la selección de genes elite una puntuación mayor a 100, debido a la importancia que tienen estas anotaciones en la comprensión de la función biológica de los genes estudiados. Por otro lado, en la base de datos Harmonizome se encontró una puntuación en el rango de 0-

3 que coincidía de forma equivalente con la puntuación de Malacards, aquí se identificaron 26 genes adicionales. Esta información se contrastó en las bases de datos KEGG y OMIM y se obtuvo una lista fenotípica de los genes con mayor implicación.

En la Tabla 1 se visualiza una parte del grupo de genes elite señalados anteriormente, así mismo, en la figura 1 se observa que estos genes, color rojo, representan las rutas metabólicas mutadas del gen SOD1, el cual se utilizó como gen control durante la realización del presente estudio.

Tabla 1. Genes relevantes involucrados en la ELA.

#	Genes	Mecanismo Molecular	Proteína	Base de Datos			
				MalaCar ds	OMI M	Harmonizo me	KEG G
1	SOD1	Estrés oxidativo	superóxido	1733.78	Si	2.50445	Si
2	DCTN1	Defectos en el	Subunidad de	1421.85	Si	1.67864	-
3	VCP	Estrés retículo	proteína con	894.82	Si	1.77857	Si
4	UBQLN	Estrés granular	Ubiquilina 2	889.34	Si	2.01386	Si
5	OPTN	Excitotoxicidad	Optineurina	888.98	Si	1.80066	Si
6	TARDB	Disfunción	TAR DNA-binding	802.35	Si	3.0029	-
7	SQSTM	Estrés retículo	Sequestosoma	793.57	Si	1.38123	-
8	FUS	Agregación de	Fused in sarcoma	791.11	Si	2.67794	Si
9	FIG4	Fosforilación y estrés	Polyphosphoinositi	788.57	Si	1.3241	Si
1	VAPB	Estrés oxidativo	VAMP Associated	368.12	Si	0.936629	Si

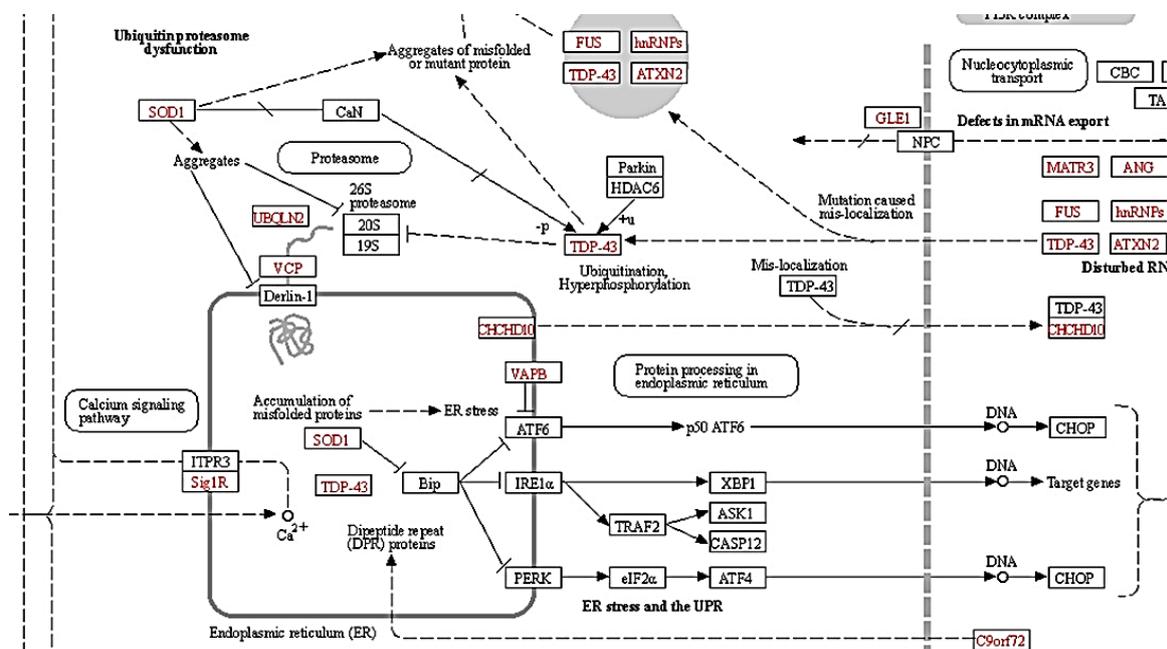


Figura 1. Rutas metabólicas mutadas de los genes elite obtenidas de KEEG, genes en tonalidad roja.

En la Tabla 2 se observa que los genes que seleccionados comparten el mismo mecanismo molecular, por lo que podemos afirmar que estos genes están asociados con la causa de las mutaciones de la enfermedad, esta afirmación se comprueba con los datos obtenidos de las redes de interacción biológica, donde observamos que existen varias conexiones (edges) y una puntuación considerablemente alta. Por otro lado, identificamos que las disfunciones causadas en los mecanismos moleculares de la ELA que tienen mayor repercusión son: estrés oxidativo, defectos de transporte axonal, agregación de proteínas y excitotoxicidad.

Tabla 2. Genes por disfunción en la ELA y atributos en la red biológica

#	Gen	Mecanismo Molecular	Número de	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	DAO	Estrés oxidativo	21	0,607
6	PON1	Estrés oxidativo	16	0,840
7	DCTN1	Disfunción de transporte axonal	13	0,475
8	PFN1	Disfunción de transporte axonal	7	0,587
9	KIF5A	Disfunción de transporte axonal	8	0,649
10	KIFAP3	Disfunción de transporte axonal	12	0,456
11	MAPT	Disfunción de transporte axonal	9	0,504
12	SPG11	Disfunción de transporte axonal	7	0,645
13	FUS	Agregación de proteínas	9	0,454
14	TARDPB	Agregación de proteínas	8	0,455
15	OPTN	Excitotoxicidad	18	0,908
16	CASP-8	Excitotoxicidad	40	0,872

De la selección de nodos en las redes biológicas se pudo identificar un grupo de genes considerados los más influyentes en la enfermedad. Para el caso del estrés oxidativo, los nodos más representativos son MRNP, SIGMAR1, VAPB, VCP, PON1, PON2, PON3, SOD1, el gen SOD1 presenta el mayor número de nodos, siendo el más relevante ya que como se explicó anteriormente, es nuestro control.

En la disfunción de transporte axonal, se identifican seis genes que están asociados con la ELA, estos son DCTN1, PFN1, KIF5A, KIFAP3, MAPT y SPG11, sin embargo, los resultados difieren con los encontrados, ya que los genes DCTN1 y KIFAP3 muestran menor expresión, sin embargo, en la base de

datos MalaCards y Harmonizome se observan como genes relevantes para la enfermedad, esto puede deberse a que seguimos la ruta metabólica del gen SOD1 que está identificado como diana terapéutica para la enfermedad.

Para la agregación de proteínas los genes que muestran asociación son FUS, DNAJC7, TARDPB, C9orf72, CCNF, ELP3 y ANXA11, de acuerdo con los datos de expresión y nodos, los genes FUS y TARDPB son los más importantes en este grupo, ya que están relacionados con varios genes, además, ambos pertenecen a la familia de las ribonucleoproteínas heterogéneas, lo cual es importante porque en este sitio se unen a los genes promotores del pre-ARNm que regulan la transcripción (Ederle et al., 2018). Los genes más representativos en la excitotoxicidad son CASP-8, OPTN, EAAT2, GLT8D1 y ALS2, y se considera que juegan un rol importante en la ELA ya que Pradhan and Bellingham (2021) afirman que la excitotoxicidad es una de las mayores causas que desencadena la mutación de genes causantes de la enfermedad.

Como se muestra en la figura 2, los genes con mayor influencia en la enfermedad para cada uno de los mecanismos moleculares se muestran en color verde y rojo con diferentes formas, lo cual indica que son genes que tienen mayor cantidad de conexiones (edges), esto también se puede evidenciar con la variación de tonalidad que adquieren los nodos a lo largo de la red biológica. Lo mismo sucede para todos los mecanismos moleculares analizados

3.2. Validación de los genes seleccionados

Desde la base de datos DrugBank se ha identificado entradas de medicamentos enlazados a proteínas, se comprueba que únicamente el gen SOD1 ha sido identificado como diana terapéutica para la ELA, lo que

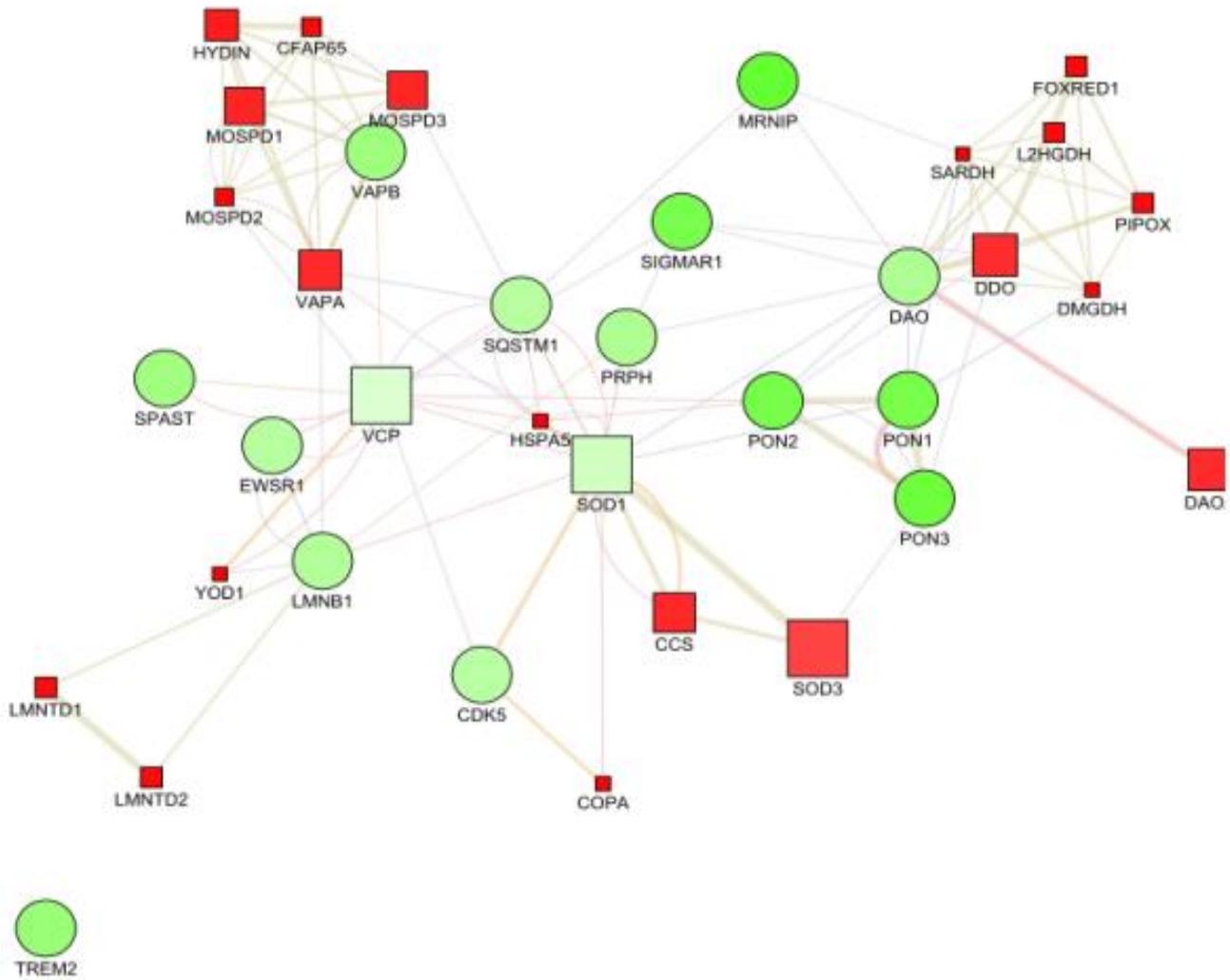


Figura 2. Red biológica de la disfunción causada por estrés oxidativo.

se confirma en este análisis. Se encuentra que el medicamento denominado Copper está asociado a esta enfermedad (Ver Tabla 3). A pesar de que no se ha identificado asociaciones de dianas y medicamentos para la ELA en los genes restantes, hemos encontrado que existen otros fármacos relacionados a los siguientes 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 3. Dianas y fármacos asociados a los genes mutados en la ELA.

#	Nombre	Gen	Diana terapéutica para ELA	Fármacos asociados al gen	Fármacos asociados ELA
1	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	SOD 1	Si	24	Copper
2	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	VCP	No	2	-
3	Sequestosome-1	SQS TM1	No	-	-
4	Vesicle-associated membrane protein-associated protein B/C	VAP B	No	1	-
5	Peripherin	PRP H	No	-	-
6	D-amino-acid oxidase	DAO	No	8	-
7	Microtubule-associated protein tau	MAP T	No	4	Flortaucipir F- 18

3.3. Pruebas de viabilidad de los genes seleccionados

Los datos obtenidos del análisis de viabilidad realizado muestran que el valor de drugabilidad de las proteínas sintetizadas en los genes DAO, PON1, TREM2, CDK5, SIGMAR1, SPAST, LMNB1, DCTN1, PFN1, KIF5A, TDP-43 y CASP-8 se encuentran entre 0,5 – 0,8 (Ver Tabla 4). En los genes VCP y VAPB que se encuentran en la ruta metabólica del gen SOD1 se observa una drugabilidad de 0.65 y 0.81, respectivamente (Finan et al., 2017).

Con los datos de la Tabla 4 se verifica que los genes seleccionados son de interés en el presente estudio ya que se encuentran relacionados por el mecanismo y la ruta molecular, las mutaciones en la ruta metabólica del gen SOD1 afectan a estos genes desencadenando alteraciones en el sistema ubiquitina-proteasoma, encargado de degradar proteínas dañadas, no necesarias o mal plegadas (Thibaudeau & Smith, 2019).

Tabla 4. Valores de drugabilidad de las posibles dianas terapéuticas

#	Proteínas	Gen	Drugabilidad	Proteins Plus	Protein Data Bank
1	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	VCP	0.65	3q7	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	DAO	0.81	3cuk	Si
6	Serum paraoxonase/arylesterase 1	PON1	0.83	1v04	Si
7	Serum paraoxonase/lactonase 3	PON3	-	-	-
8	Serum 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

En la figura 3 se observa el sitio de unión de la proteína Transitional endoplasmic reticulum ATPase, donde el volumen de la cavidad es de 471.10 Å³, profundidad de 13.29 Å y una proporción de aminoácidos apolares de 0.30, estas tres características ya mencionadas son las más utilizadas para describir las propiedades de un sitio que presenta buena disponibilidad drugable. 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.

Kakizuka et al. (2015) creó alrededor de 200 compuestos derivados del naftaleno, denominados Kyoto University Substances (KUSs), los cuales pueden contrarrestar la actividad ATPasa de la VCP sin mostrar toxicidad. Es por ello, que la proteína ha sido considerada como posible diana terapéutica ya que presenta alta afinidad en la unión de compuestos y pequeñas moléculas.

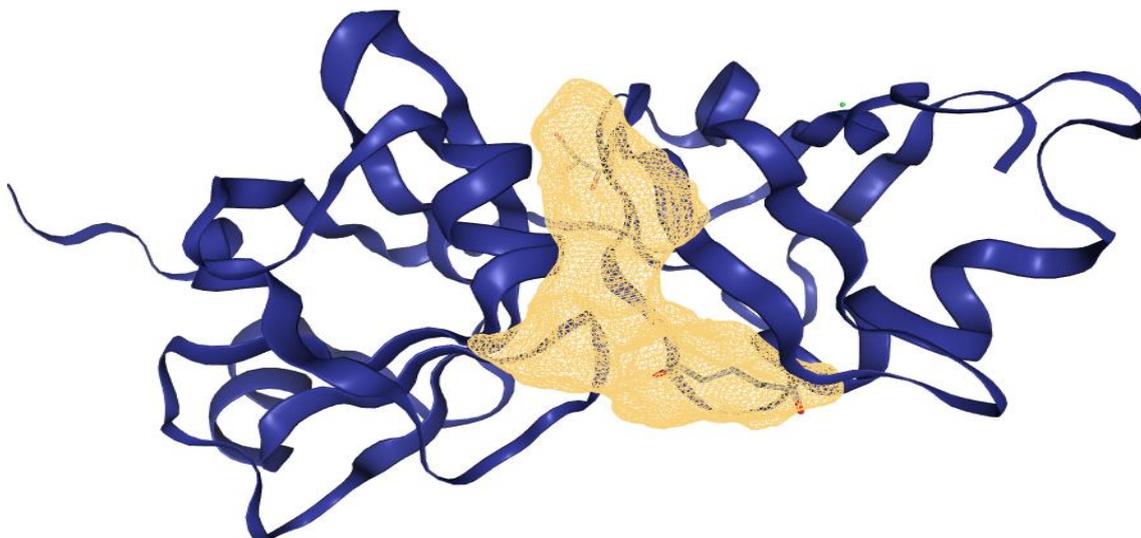


Figura 3. Estructura 3D de la proteína Transitional endoplasmic reticulum ATPase (VCP) con el mejor sitio drugable

En la Figura 4 se observa los sitios de unión de la proteína Vesicle-associated membrane protein-associated protein B/C, esta presenta cuatro sitios, en los que podemos destacar que el valor del volumen es mayor con respecto a la anterior. El volumen es de 677,49 Å³ y la profundidad de 27.54 Å, esto se debe a que la longitud de la secuencia y el volumen del sitio de unión están correlacionados, la tasa de aminoácidos apolares es cercana a la de aminoácidos polares (0.39), adicionalmente, se muestra en el sitio activo 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 produciría una acción directa.

Se encontró que la grid para la proteína Transitional endoplasmic reticulum ATPase está ubicada en las coordenadas (x=50, y=50, z=50) y las coordenadas del centro son (x=23,724; y=-1,782; z=2,657), de la misma forma para la proteína Vesicle-associated membrane protein-associated protein B/C el grid se ubica en las coordenadas (x=-40, y=40, z=-40) y el centro en (x=-2,108; y=0,153; z=-0,034)

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.

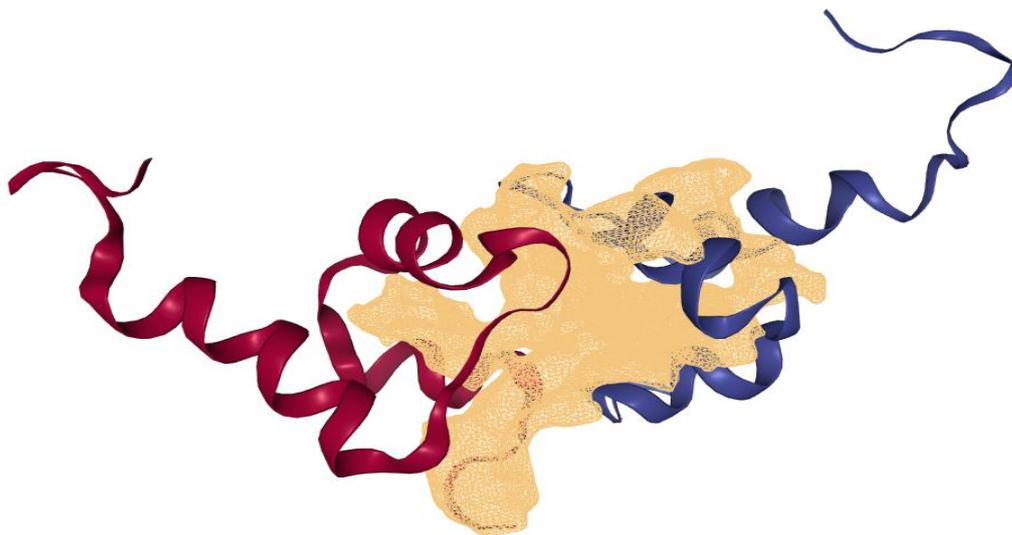


Figura 4. Estructura 3D proteína Vesicle-associated membrane protein-associated protein B/C (VAPB) con el mejor sitio drugable

3.4. Análisis de interacción molecular.

En la tabla 5 se observa que siete fármacos presentan una puntuación entre $-2,12$ *Kcal/mol* y $-6,92$ *Kcal/mol*, considerable para la interacción con la proteína, para la selección del mejor fármaco se ha considerado también el valor de correlación de Pearson, asociado al fármaco Eeyarestatina. Los resultados se validaron correlacionándolos con un estudio realizado por Huang et al. (2014), quien señala que residuos (apolares) de la proteína del gen SOD1 interaccionan con el fármaco hesperidina, el cual presenta enlaces de puentes de hidrógeno en el Glu100, así como en residuos cercanos como (Gln22, Pro28, Lys23, Glu21 y Lys30).

Tabla 5. Fármacos asociados a los dominios de las proteínas VCP y VAPB

#	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

Otro de los hallazgos del presente trabajo es el dominio de la proteína Transitional endoplasmic reticulum ATPase que de acuerdo con el análisis de afinidad es adecuado para el acoplamiento de la diana terapéutica, el fármaco que presentó la mejor energía de acoplamiento se denomina Saquinavir (-6,29 Kcal/mol), este medicamento es utilizado para el tratamiento del VIH actúa como inhibidor de la proteasa VIH en combinación con el 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, lo que confirma que el fármaco presenta flexibilidad y evidencia un incremento potencial de interacción con este. Es importante mencionar que la formación de puentes de hidrógeno está asociada a la estabilidad de la estructura receptor-ligando.

Por otra parte, en la Figura 5 se observa el sitio activo del fármaco Astemizole, mismo que interactúa con los residuos (LEU 29, ARG 32, THR 35, ASP 39, ALA42, LEU 44, ILE 47 Y TIR 49), la energía de interacción es de (-5,98 Kcal/mol). Consecuentemente, el complejo receptor-ligando se mantiene estable debido a que las interacciones presentan enlaces de puentes de hidrógeno lo que brinda esta estabilidad.

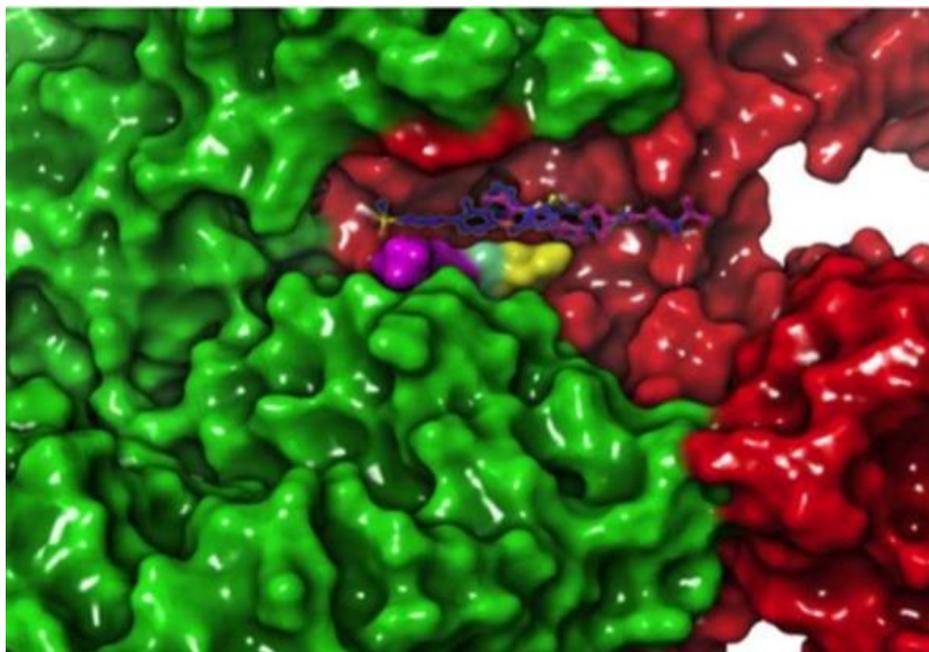


Figura 5. Interacción entre la proteína VABP y la molécula del fármaco Astemizole

Por otra parte, actualmente no existe un inhibidor de las proteínas Vesicle-associated membrane protein-associated protein B/C, sin embargo, al encontrarse en la ruta metabólica del gen SOD1, la inhibición de esta puede potenciar la supresión del gen.

3.5. Análisis de la toxicidad de las moléculas

Saquinavir y Astemizole no presentan actividad mutagénica y tampoco carcinogénica, ambos parámetros

se encuentran relacionados al evaluar la actividad biológica de fármacos, sin embargo, Saquinavir mostró hepatotoxicidad, lo que genera un daño al hígado por la exposición al medicamento Figura 6. Según Caterina et al. (2013), el suministro del medicamento en pacientes que presentan VIH en una dosis de 1000 mg/100 mg dos veces por día mostraron elevaciones de las transaminasas hepáticas.

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 completa-mente (Motataianu et al., 2022). Por otro lado, el medicamento Astemizole presenta mejor absor-ción, con un valor de 86.518 %, mostrando mejor síntesis en el intestino (Caterina et al., 2013). El valor de distribución VDss (-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 liquida del fármaco es de 0,969 mol/L lo que indica que el cuerpo libera en su totalidad este compuesto (Fedi et al., 2021). Finalmente, con estos datos se comprueba que el fármaco genera hepatotoxicidad, lo que corrobora la información obtenida a través de análisis QSAR.

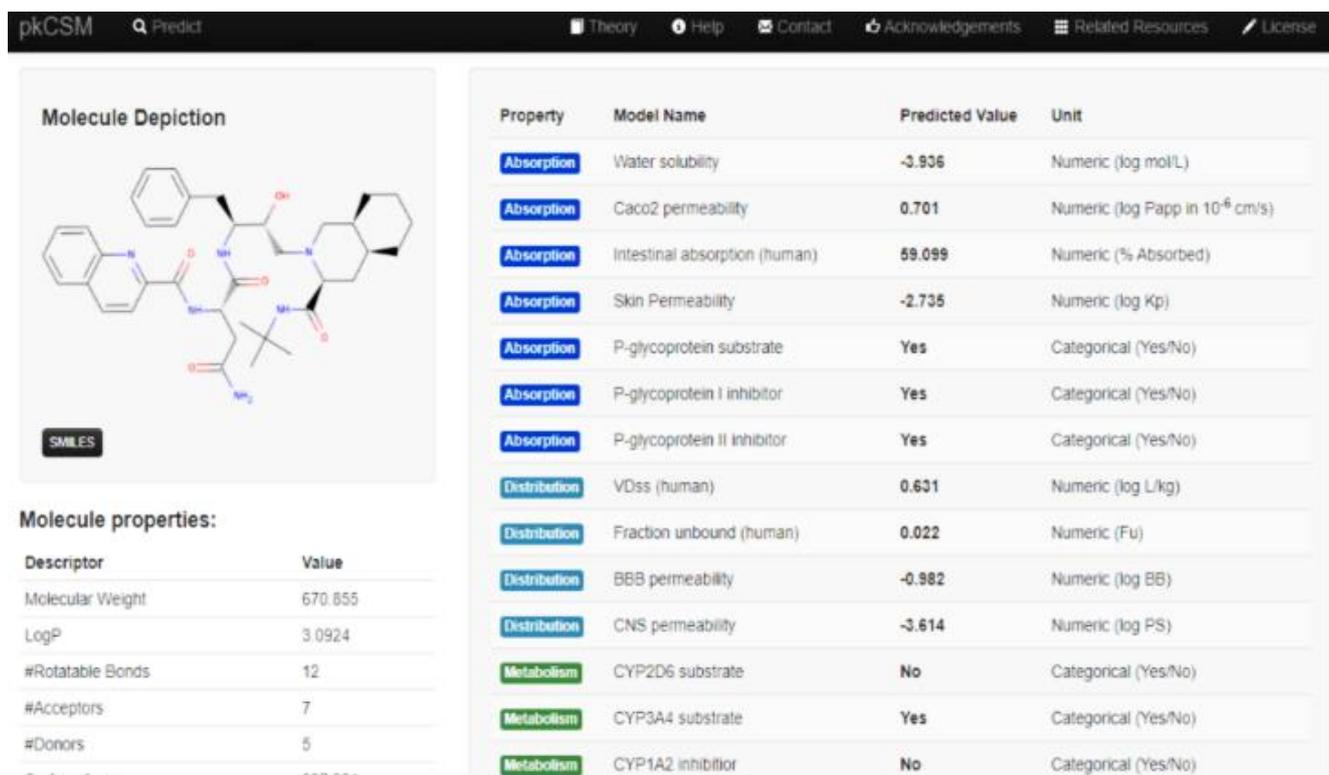


Figura 6. Análisis de ADEMÉT realizado al fármaco mediante el paquete web pkCSM.

4. DISCUSIÓN

Actualmente existen dos clases de medicamentos que han sido aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA), el primer tratamiento utiliza un fármaco denominado Riluzol y el segundo utiliza al Edavarone, estos dos medicamentos presentan efectos secundarios en el paciente y no representan una alternativa para la cura definitiva de la enfermedad. En el presente estudio se ha examinado las rutas metabólicas que presentan 59 genes élite, escogidos en función de la relevancia que presentan en cada uno de los mecanismos moleculares. Los hallazgos revelan que el estrés oxidativo juega un rol crucial en la neurodegeneración ya que los genes como SIGMAR1, VAPB, VCP, PON1, PON2, PON3, SOD1 se encuentran en la misma ruta metabólica, desencadenando una serie de disfunciones celulares. Según Fedi et al., (2021) esta mutación se debe a diferentes factores ambientales como la exposición a campos electromagnéticos, solventes, pesticidas y metales pesados.

Con toda esta información se ha identificado a los genes VCP y VAPB que se encuentran en la ruta metabólica del SOD1, el que previamente ha sido identificado como diana terapéutica para la ELA. Se ha demostrado que el sitio de unión de la proteína Transitional endoplasmic reticulum ATPase (VCP) presenta características favorables de drugabilidad en el sitio activo identificado. Así mismo, el sitio de unión de la proteína Vesicle-associated membrane protein-associated protein B/C (VAPB) que presenta cuatro sitios de unión se observa que el volumen de la cavidad es mayor con respecto al VCP, esto se debe a que la longitud de la secuencia y el volumen del sitio de unión están correlacionados. El número de regiones y cavidades se encuentran relacionadas con el tamaño de la proteína, sin embargo, no existe una correlación directa entre el tamaño de la proteína y del sitio de unión (sitio activo).

Por otro lado, la presencia de aminoácidos en el sitio activo de la proteína se debe a que la tasa de aminoácidos apolares es cercana a la de polares cuyo valor es 0.39, por tal motivo, el dominio seleccionado actuará de forma positiva sobre la proteína debido a la acción directa del medicamento y de los receptores de los aminoácidos circundantes de la cavidad proteica.

Con estos resultados se comprobó los dominios de interacción de las proteínas Transitional endoplasmic reticulum ATPase (VCP) y Vesicle-associated membrane protein-associated protein B/C (VAPB) con las estructuras químicas respectivas mediante herramientas bioinformáticas para cribado virtual, con lo que se determinó que los sitios de unión presentan una drugabilidad de 0.65 y 0.81 respectivamente, señalando que la proteína VAPB posee un mejor sitio de unión ya que existe mayor presencia de residuos polares e interacciones de puentes de hidrógeno, lo que facilita la acción del fármaco de forma directa y garantiza

la estabilidad de la unión proteína-ligando.

Este estudio ha identificado al Saquinavir y Astemizole, como fármacos comerciales para el tratamiento de la ELA. El primero presenta una mayor afinidad debido a la cantidad de energía de interacción, el segundo presenta una mayor estabilidad ya que presenta enlaces de puentes de hidrógeno, que son los que le proporcionan esta característica a la unión. Aunque la energía de unión es menor que el Saquinavir, la existencia de puentes de hidrógeno favorece la estabilidad a la unión. De la misma manera, el análisis realizado por las pruebas QSAR señalan que el fármaco Saquinavir puede causar efectos secundarios al aplicarse dosis de 1000 mg/100mg. Según, Schmitt et al., (2009) el fármaco ha sido administrado en conjunto con ritonavir en menor dosis y estos han presentado un valor de hepatotoxicidad de 1,84 %. Finalmente, Astemizole presentó las mejores condiciones para ser posible candidato contra la neurodegeneración causado por ELA al presentar niveles de absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad dentro de las normativas señaladas por la FDA.

5. CONCLUSIONES

El análisis de los nodos en redes biológicas permitió identificar genes influyentes en la ELA en diferentes mecanismos moleculares, como el estrés oxidativo, la disfunción de transporte axonal, la agregación de proteínas y la excitotoxicidad. El gen SOD1 destacó como el más relevante en el estrés oxidativo, por lo que lo hemos utilizado como marcador control, así mismo, los genes VCP y VAPB se destacan en el estrés del retículo endoplasmático, lo que nos condujo a escogerlos como dianas en el presente estudio. Por otra parte, en la disfunción de transporte axonal se identificaron los genes DCTN1, PFN1, KIF5A, KIFAP3, MAPT y SPG11.

Se encontraron asociaciones entre genes relevantes para la ELA, ya que se encuentran en la misma ruta metabólica del control, así mismo, hay medicamentos en la base de datos DrugBank que actualmente sirven para tratar la enfermedad como es el Riluzole y el Edavarone. Se ha observado que el primero presenta varias interacciones con medicamentos de uso común como el aciclovir o la benzodiazepina entre otros, por lo que no es recomendable su uso común. El segundo medicamento no ha presentado interacciones desfavorables con medicamentos de uso común.

El análisis de viabilidad de los genes seleccionados reveló que las proteínas sintetizadas por estos genes presentan una drugabilidad adecuada para la interacción con fármacos. Específicamente, los genes VCP y VAPB, ubicados en la ruta metabólica del gen SOD1, mostraron una drugabilidad significativa.

El análisis de interacción molecular reveló varios fármacos que presentan una posible interacción con las proteínas Transitional endoplasmatic reticulum y Vesicle-associated membrane protein-associated protein B/C que se sintetizan en los genes VCP y VAPB respectivamente. Adicionalmente, fármacos como el Saquinavir y Astemizole mostraron puntuaciones de acoplamiento y correlaciones con estos receptores proteicos, lo que indica que existe una potencial acción terapéutica para la ELA.

En conclusión, los genes seleccionados en este estudio, gen SOD1 y los genes relacionados con las proteínas Transitional endoplasmatic reticulum y Vesicle-associated membrane protein-associated protein B/C, representan importantes dianas terapéuticas en la ELA. La identificación de los medicamentos Astemizole y Saquinavir, asociados a estos genes junto con la evaluación de la interacción molecular con las proteínas relevantes brindan perspectivas prometedoras para el desarrollo de tratamientos y terapias más efectivas contra esta devastadora enfermedad. Sin embargo, como trabajo futuro es recomendable realizar otras pruebas in silico como el docking semiflexible para confirmar los hallazgos iniciales, posteriormente se podría efectuar ensayos clínicos para confirmar la eficacia y seguridad de estos enfoques terapéuticos.

Contribuciones de los autores: Redacción - revisión y edición, IL, AQV, LV y CG; Metodología, IL y CG; Conceptualización, LV y CG. Todos los autores han leído y aceptado la versión publicada del manuscrito.

Agradecimientos: A los investigadores del presente estudio por su aporte al desarrollo de la investigación biotecnológica, biomédica y bioinformática en Ecuador.

Conflictos de interés: “Los autores declaran no tener conflicto de interés”.

REFERENCIAS

- Amberger, J. S., Bocchini, C. A., Schiettecatte, F., Scott, A. F., & Hamosh, A. (2015). OMIM.org: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM®), an online catalog of human genes and genetic disorders. *Nucleic Acids Res*, 43(Database issue), D789-798. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1205>
- Ban, J., Sámano, C., Mladinić, M., & Munitić, I. J. C. m. j. (2019). Glia in amyotrophic lateral sclerosis and spinal cord injury: common therapeutic targets. *60(2)*, 109-120.
- Batra, G., Jain, M., Singh, R. S., Sharma, A. R., Singh, A., Prakash, A., & Medhi, B. (2019). Novel therapeutic targets for amyotrophic lateral sclerosis. *Indian J Pharmacol*, 51(6), 418-425. https://doi.org/10.4103/ijp.IJP_823_19

- Bianco, G., Forli, S., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2016). Covalent docking using autodock: Two-point attractor and flexible side chain methods. 25(1), 295-301. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/pro.2733>
- Blokhuis, A. M., Groen, E. J., Koppers, M., van den Berg, L. H., & Pasterkamp, R. J. J. A. n. (2013). Protein aggregation in amyotrophic lateral sclerosis. 125(6), 777-794.
- Cho, H., & Shukla, S. J. P. (2020). Role of edaravone as a treatment option for patients with amyotrophic lateral sclerosis. 14(1), 29.
- de Paula, C. Z., Gonçalves, B. D., & Vieira, L. B. (2015). An Overview of Potential Targets for Treating Amyotrophic Lateral Sclerosis and Huntington's Disease. *Biomed Res Int*, 2015, 198612. <https://doi.org/10.1155/2015/198612>
- Eberhardt, J., Santos-Martins, D., Tillack, A. F., Forli, S. J. J. o. C. I., & Modeling. (2021). AutoDock Vina 1.2. 0: New docking methods, expanded force field, and python bindings. 61(8), 3891-3898.
- Ederle, H., Funk, C., Abou-Ajram, C., Hutten, S., Funk, E. B., Kehlenbach, R. H., . . . Dormann, D. J. S. r. (2018). Nuclear egress of TDP-43 and FUS occurs independently of Exportin-1/CRM1. 8(1), 1-18.
- Fährrolfes, R., Bietz, S., Flachsenberg, F., Meyder, A., Nittinger, E., Otto, T., . . . Rarey, M. (2017). ProteinsPlus: a web portal for structure analysis of macromolecules. *Nucleic Acids Research*, 45(W1), W337-W343. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx333> %J Nucleic Acids Research
- 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. *Sci Transl Med*, 9(383). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aag1166>
- Franklin, T. B., Saab, B. J., & Mansuy, I. M. J. N. (2012). Neural mechanisms of stress resilience and vulnerability. 75(5), 747-761.
- Fujisawa, A., & Yamamoto, Y. J. R. R. (2016). Edaravone, a potent free radical scavenger, reacts with peroxynitrite to produce predominantly 4-NO-edaravone. 21(3), 98-103.
- Gaba, M., Shaheed, A., Ajit, B., Jujhar, S., & Memorial, S. J. J. C. (2015). An overview on molecular docking international journal of drug development and research. 4(2), 1024-1028.

- Goodsell, D. S., Sanner, M. F., Olson, A. J., & Forli, S. (2021). The AutoDock suite at 30. *30*(1), 31-43. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/pro.3934>
- Goodsell, D. S., Zardecki, C., Di Costanzo, L., Duarte, J. M., Hudson, B. P., Persikova, I., . . . Westbrook, J. D. J. P. S. (2020). RCSB Protein Data Bank: Enabling biomedical research and drug discovery. *29*(1), 52-65.
- Guissart, C., Mouzat, K., Kantar, J., Louveau, B., Vilquin, P., Polge, A., . . . Lumbroso, S. J. S. R. (2020). Premature termination codons in SOD1 causing Amyotrophic Lateral Sclerosis are predicted to escape the nonsense-mediated mRNA decay. *10*(1), 1-7.
- Hosen, S., Saha, D., Dash, R., Emran, T. B., Alam, A., Junaid, M. J. R. J. o. P. D. F., & Technology. (2012). Drug Bank: An Update-Resource for in Silico Drug Discovery. *4*(3), 166-171.
- Huang, H. J., Chang, T. T., Chen, H. Y., & Chen, C. Y. (2014). Finding inhibitors of mutant superoxide dismutase-1 for amyotrophic lateral sclerosis therapy from traditional chinese medicine. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2014, 156276. <https://doi.org/10.1155/2014/156276>
- 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. <https://doi.org/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. <https://doi.org/https://doi.org/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. In K. Nakao, N. Minato, & S. Uemoto (Eds.), *Innovative Medicine: Basic Research and Development* (pp. 61-69). Springer Copyright 2015, The Author(s). https://doi.org/10.1007/978-4-431-55651-0_5
- Kanehisa, M., & Goto, S. (2000). KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res*, *28*(1), 27-30. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.27>
- Kiernan, M. C., Vucic, S., Cheah, B. C., Turner, M. R., Eisen, A., Hardiman, O., . . . Zoing, M. C. J. T. l. (2011). Amyotrophic lateral sclerosis. *377*(9769), 942-955.

- Kohl, M., Wiese, S., & Warscheid, B. (2011). Cytoscape: Software for Visualization and Analysis of Biological Networks. In M. Hamacher, M. Eisenacher, & C. Stephan (Eds.), *Data Mining in Proteomics: From Standards to Applications* (pp. 291-303). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-987-1_18
- 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. <https://doi.org/10.1038/nature21029>
- Lotia, S., Montojo, J., Dong, Y., Bader, G. D., & Pico, A. R. (2013). Cytoscape App Store. *Bioinformatics*, 29(10), 1350-1351. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt138> %J *Bioinformatics*
- Montojo, J., Zuberi, K., Rodriguez, H., Bader, G. D., & Morris, Q. J. F. (2014). GeneMANIA: Fast gene network construction and function prediction for Cytoscape. 3.
- Montojo, J., Zuberi, K., Rodriguez, H., Kazi, F., Wright, G., Donaldson, S. L., . . . Bader, G. D. (2010). GeneMANIA Cytoscape plugin: fast gene function predictions on the desktop. *Bioinformatics*, 26(22), 2927-2928. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq562>
- O'Leary, N. A., Wright, M. W., Brister, J. R., Ciufu, S., Haddad, D., McVeigh, R., . . . Pruitt, K. D. (2016). Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation. *Nucleic Acids Res*, 44(D1), D733-745. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1189>
- 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, 11-14. <https://doi.org/10.1016/j.ensci.2018.05.001>
- Pedretti, A., Mazzolari, A., Gervasoni, S., Fumagalli, L., & Vistoli, G. (2020). The VEGA suite of programs: an versatile platform for cheminformatics and drug design projects. *Bioinformatics*, 37(8), 1174-1175. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btaa774> %J *Bioinformatics*
- Pires, D. E., Blundell, T. L., & Ascher, D. B. (2015). pkCSM: Predicting Small-Molecule Pharmacokinetic and Toxicity Properties Using Graph-Based Signatures. *J Med Chem*, 58(9), 4066-4072. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00104>

- Pradhan, J., & Bellingham, M. C. J. B. S. (2021). Neurophysiological mechanisms underlying cortical hyper-excitability in amyotrophic lateral sclerosis: A review. *11(5)*, 549.
- Ralli, M., Lambiase, A., Artico, M., de Vincentiis, M., & Greco, A. J. T. I. M. A. J. I. (2019). Amyotrophic Lateral Sclerosis: Autoimmune Pathogenic Mechanisms, Clinical Features, and Therapeutic Perspectives. *21(7)*, 438-443.
- Rappaport, N., Twik, M., Plaschkes, I., Nudel, R., Iny Stein, T., Levitt, J., . . . Lancet, D. (2016). MalaCards: an amalgamated human disease compendium with diverse clinical and genetic annotation and structured search. *Nucleic Acids Research*, *45(D1)*, D877-D887. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1012> %J Nucleic Acids Research
- Riancho, J., Gonzalo, I., Ruiz-Soto, M., & Berciano, J. (2019). Why do motor neurons degenerate? Actualization in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurologia (Engl Ed)*, *34(1)*, 27-37. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2015.12.001> (¿Por qué degeneran las motoneuronas? Actualización en la patogenia de la esclerosis lateral amiotrófica.)
- Rouillard, A. D., Gundersen, G. W., Fernandez, N. F., Wang, Z., Monteiro, C. D., McDermott, M. G., & Ma'ayan, A. J. D. (2016). The harmonizome: a collection of processed datasets gathered to serve and mine knowledge about genes and proteins. 2016.
- Sala, G., Arosio, A., Conti, E., Beretta, S., Lunetta, C., Riva, N., . . . Neuroscience. (2019). Riluzole selective antioxidant effects in cell models expressing amyotrophic lateral sclerosis endophenotypes. *17(3)*, 438.
- Schöning-Stierand, K., Diedrich, K., Fährrolfes, R., Flachsenberg, F., Meyder, A., Nittinger, E., . . . Rarey, M. (2020). ProteinsPlus: interactive analysis of protein–ligand binding interfaces. *Nucleic Acids Research*, *48(W1)*, W48-W53. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa235> %J Nucleic Acids Research
- Stank, A., Kokh, D. B., Fuller, J. C., & Wade, R. C. (2016). Protein Binding Pocket Dynamics. *Accounts of Chemical Research*, *49(5)*, 809-815. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.5b00516>
- Stefanidou, M., Herrera, C., Armanasco, N., & Shattock, R. J. (2012). Saquinavir inhibits early events associated with establishment of HIV-1 infection: potential role for protease inhibitors in prevention. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *56(8)*, 4381–4390. <https://doi.org/10.1128/AAC.00399-12>

- Thibaudeau, T. A., & Smith, D. M. (2019). A Practical Review of Proteasome Pharmacology. *Pharmacol Rev*, 71(2), 170-197. <https://doi.org/10.1124/pr.117.015370>
- Trias, E., Ibarburu, S., Barreto-Núñez, R., Babdor, J., Maciel, T. T., Guillo, M., . . . Cassina, P. J. J. o. n. (2016). Post-paralysis tyrosine kinase inhibition with masitinib abrogates neuroinflammation and slows disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. 13(1), 1-12.
- Trott, O., & Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. 31(2), 455-461. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jcc.21334>
- Valko, K., & Ciesla, L. (2019). Chapter Two - Amyotrophic lateral sclerosis. In D. R. Witty & B. Cox (Eds.), *Prog Med Chem* (Vol. 58, pp. 63-117). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/bs.pmch.2018.12.001>.
- David S Wishart and others, DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018, *Nucleic Acids Research*, Volume 46, Issue D1, 4 January 2018, Pages D1074–D1082, <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1037>.
- Yu, W., & MacKerell, A. D., Jr (2017). Computer-Aided Drug Design Methods. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1520, 85–106. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6634-9_5.