

Búsqueda de interacciones *off-target* usando el fármaco Amiodarona como caso de estudio

Marta Ballester Badenes

Máster en Bioinformática y Bioestadística

Área de Bioinformática estructural

Dra. Elisabeth Ortega Carrasco

Dr. Antoni Pérez Navarro

Curso académico Feb / Jun 2021

Marta Ballester Badenes

Marta Ballester Badenes



Esta obra está sujeta a una licencia de Reconocimiento

[3.0 España de Creative Commons](https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/es/)

FICHA DEL TRABAJO FINAL

Título del trabajo:	<i>Búsqueda de interacciones “off-target” usando el fármaco Amiodarona como caso de estudio</i>
Nombre del autor:	<i>Marta Ballester Badenes</i>
Nombre del consultor/a:	<i>Elisabeth Ortega Carrasco</i>
Nombre del PRA:	<i>Antoni Pérez Navarro</i>
Fecha de entrega (mm/aaaa):	06/2021
Titulación:	<i>Máster en Bioinformática y Bioestadística</i>
Área del Trabajo Final:	<i>Área de Bioinformática estructural</i>
Idioma del trabajo:	Castellano
Número de créditos:	15 créditos
Palabras clave	<i>“Virtual screening”, “molecular docking”, “hospital admissions ADR” y “Amiodarone side effects”.</i>
Resumen del Trabajo (máximo 250 palabras): <i>Con la finalidad, contexto de aplicación, metodología, resultados y conclusiones del trabajo.</i>	
<p>Las reacciones adversas medicamentosas (RAM) son aquellas respuestas nocivas y no intencionadas a un fármaco a dosis normales que llevan a una situación de riesgo para el paciente. Según estudios anteriores de Lazarou y Pirmohamed, se demostró que las RAM, y en concreto, de los fármacos que actúan en el sistema cardiovascular, producen un aumento del ingreso hospitalario y de la mortalidad, lo cual representa un problema clínico importante. A partir de esta problemática, surge la necesidad de investigar sobre dichos</p>	

efectos adversos para poder reducir en última instancia los ingresos hospitalarios, así como mejorar la calidad de vida del paciente. Debido al gran avance de la bioinformática en las últimas décadas y, en especial, del área del *docking* molecular, hoy en día encontramos múltiples softwares diseñados para cubrir esta necesidad. La herramienta elegida para ello fue BioGPS, una aplicación novedosa de comparación y agrupación de bolsillos proteicos. La investigación se realizó con el fármaco antiarrítmico Amiodarona, con la finalidad de encontrar y notificar bolsillos proteicos encargados de producir los efectos *off-target*. Se obtuvieron cuatro efectos adversos destacables para este fármaco: esteatosis hepática, estrés oxidativo, acidosis metabólica/diuresis y toxicidad pulmonar. Las tres primeras fueron obtenidas mediante BioGPS, la última fue notificada mediante búsqueda bibliográfica. Con los resultados obtenidos, se abre un nuevo horizonte en el área de diseño y seguridad de los fármacos, con el objetivo final de poder notificar de manera más eficiente las RAM para así, mejorar la salud y la calidad de vida de los pacientes.

Abstract (in English, 250 words or less):

Adverse drug reactions (ADRs) are those harmful and unintended responses to a drug at normal doses that lead to a risk situation for the patient (1). According to previous studies of Lazarou and Pirmohamed, it was shown that the ADRs of, specifically, drugs that act on the cardiovascular system, cause an increase in hospital admission and mortality, which represents an important clinical problem. Because of this, the need arises to investigate these adverse effects to ultimately reduce hospital admissions, as well as improve the quality of life of the patient. Due to the great advance of bioinformatics in recent decades and, especially, in the area of molecular docking, today we find multiple software designed to solve this need. The tool chosen for this was BioGPS, a novel application for the comparison and grouping of protein pockets. The research was carried out with the antiarrhythmic drug Amiodarone, to find and report protein pockets responsible for producing off-target effects. Four notable adverse effects were obtained for this drug: hepatic steatosis, oxidative stress, metabolic acidosis /

Marta Ballester Badenes

diuresis, and pulmonary toxicity. The first three were obtained by BioGPS, the last was notified by means of a bibliographic search. With the results obtained, a new horizon opens up in the area of drug design and safety, with the ultimate goal of being able to report ADRs more efficiently in order to improve the health and quality of life of patients.

Índice

Resumen	2
Introducción	3
Contexto y justificación del Trabajo	3
Objetivos del Trabajo	5
Enfoque y método seguido	6
Planificación del Trabajo	8
Breve resumen de contribuciones y productos obtenidos	10
Breve descripción de los otros capítulos de la memoria	11
Estado del arte	12
Metodología	13
Resultados	14
Discusión	29
Conclusiones	31
Conclusiones	31
Líneas de futuro	31
Seguimiento de la planificación	32
Glosario	33
Bibliografía	33

Lista de figuras

Figura 1. Imagen en 3D del acoplamiento molecular entre Desetilamiodarona (verde) y el bolsillo del receptor de la hormona tiroidea (masa amarilla) obtenida por BioGPS.	4
Figura 2. Esquema del funcionamiento de BioGPS para generar descriptores moleculares.	8
Figura 3. Planificación de tareas usando Gantt Project.	10
Figura 4. Molécula de Amiodarona en 3D obtenida mediante BioGPS.	20
Figura 5. Parámetros establecidos para la importación de bolsillos a través del código Uniprot.	23
Figura 6. Perfil del Reactoma de Desetilamiodarona obtenidos teóricamente.	25
Figura 7. Perfil del Reactoma de Desetilamiodarona y 3'-hidroxilamiodarona obtenidos experimentalmente.	27
Figura 8. <i>Screening</i> entre Desetilamiodarona y proteína D asociada a surfactante pulmonar.	28

Lista de tablas

Tabla 1. Principales dianas de acción de Amiodarona..... 21

Tabla 2. Candidatos potenciales obtenidos en BioGPS para Desetilamiodarona teórica. 24

Tabla 3. Candidatos potenciales obtenidos en BioGPS para Desetilamiodarona (DA) y 3'-hidroxilamiodarona (HA)..... 26

1 Resumen

Las reacciones adversas medicamentosas (RAM) producidas por fármacos de uso humano, también conocidas como efectos adversos, se encuentran entre las 10 primeras causas principales de defunción en el mundo según la Organización Mundial de la Salud (OMS) (1). Dichos efectos engloban cualquier respuesta nociva y no intencionada a un medicamento a dosis normales, lo cual lleva a una situación de riesgo para el paciente, además de generar un gran impacto sanitario y económico (2).

Según un estudio realizado en Inglaterra, las RAM son muy frecuentes y son las responsables del ingreso hospitalario de los pacientes, produciendo un aumento en la estancia hospitalaria y en la mortalidad (3). Además, cabe destacar el estudio de Lazarou, donde se estimó que las RAM suponían entre la cuarta y sexta causa de mortalidad en EEUU, lo cual representan un problema clínico importante (4).

A partir de la problemática presentada, surge la necesidad de investigar sobre dichos efectos adversos para poder reducir en última instancia los ingresos hospitalarios, así como mejorar la calidad de vida del paciente.

En el presente trabajo se abordará el problema desde un enfoque bioinformático ya que, debido al gran avance de esta área durante las últimas décadas, hoy en día se puede contar con numerosos softwares diseñados para cubrir esta necesidad, como son las herramientas basadas en el acoplamiento molecular (*molecular docking*) entre fármaco y diana, usando Amiodarona, un agente antiarrítmico como caso de estudio.

El acoplamiento molecular es un método bioinformático, basado en estructuras *in silico*, que predice la posición más favorable de interacción entre

un ligando de interés y una estructura macromolecular a partir de su estructura 3D. Por ello, aparte de ser una herramienta clave para un estudio inicial de las interacciones del fármaco con su diana de interés, también es considerado un enfoque valioso para la predicción de efectos off-target de los fármacos en las primeras fases de desarrollo (preclínicas y clínicas) o en medicamentos comercializados con etiquetas de medicamentos exhaustivas y registros de bioactividad aún no informadas (5).

Mediante técnicas de *molecular docking*, se han obtenido una serie de dianas moleculares que presentan cierta unión con los metabolitos del fármaco Amiodarona, con la finalidad de encontrar nuevos efectos *off-target* del fármaco para valorar su seguridad en los pacientes y así reducir en todo lo posible los ingresos hospitalarios producidos por sus RAM.

A partir de dichos resultados, se ha podido comprobar la utilidad de las herramientas bioinformáticas para contribuir en las etapas de farmacovigilancia de ensayos farmacológicos, y en última instancia, mejorar la salud de los pacientes.

2 Introducción

2.1 Contexto y justificación del Trabajo:

Según un estudio observacional y prospectivo de monitorización intensiva de RAM en pacientes hospitalizados llevado a cabo en la Comunidad de Aragón durante el año 2014 (1), se observó que los fármacos pertenecientes al grupo terapéutico C, que refiere a aquellos de acción en el aparato cardiovascular, según el código ATC (Sistema de Clasificación Anatómica, Terapéutica, Química) registraban un mayor número de notificaciones de RAM que motivaron

el ingreso hospitalario. Debido a dicha problemática, surge la necesidad de investigar el origen de dichos efectos no deseados estudiando la interacción fármaco-diana en nuestro organismo de este grupo de fármacos.

Dentro del grupo de fármacos que engloba el aparato cardiovascular, se seleccionó el fármaco Amiodarona debido a sus múltiples efectos adversos y uso acotado, además de disponer datos experimentales para llevar a cabo la investigación. Por ello, con el avance de la bioinformática estructural hoy en día y mediante las técnicas de *docking* molecular, se abordará la problemática de las RAM mediante el uso del software BioGPS (6) para investigar los posibles efectos adversos producidos por Amiodarona (*Figura 1*).

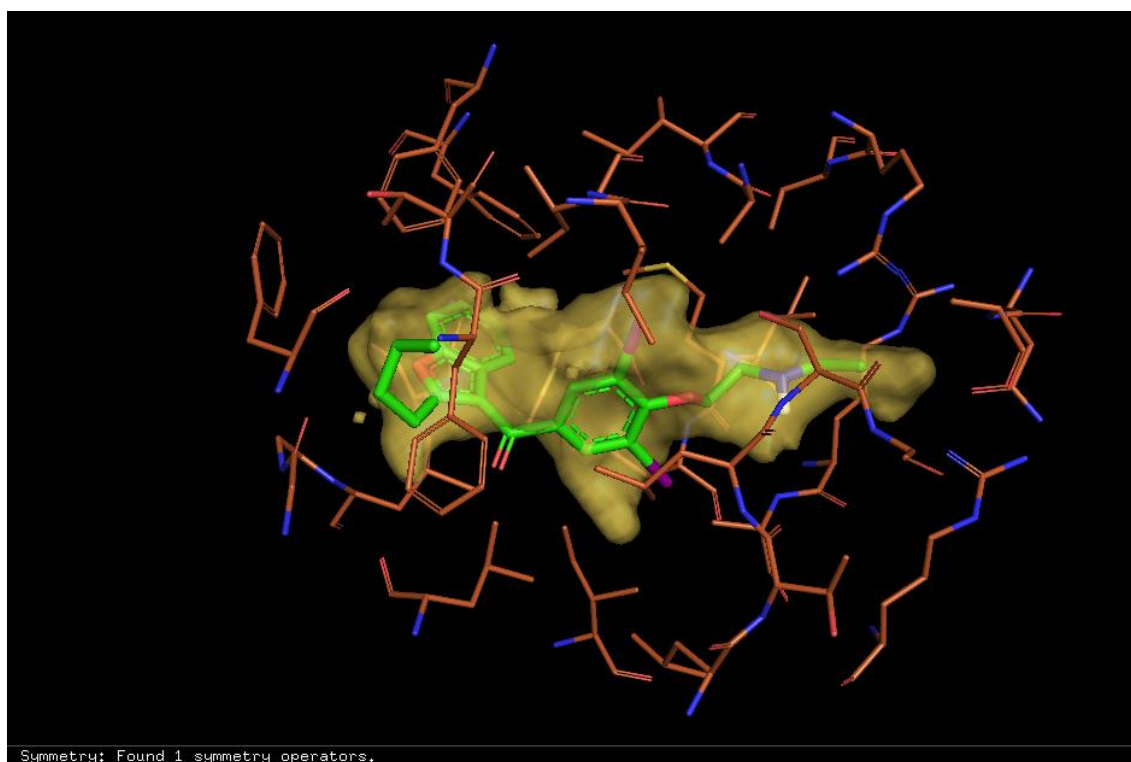


Figura 1. Imagen en 3D del acoplamiento molecular entre Desetilamiodarona (verde) y el bolsillo del receptor de la hormona tiroidea (masa amarilla) obtenida por BioGPS.

En naranja se muestran las estructuras del bolsillo que interactúan con el ligando.

Mediante este método se quieren obtener y notificar aquellas interacciones no deseadas entre fármaco y dianas *off-target* de Amiodarona, para así poder evitar

los múltiples ingresos hospitalarios que producen sus RAM. Por otro lado, se podrá aportar información para la mejora del proceso de diseño de fármacos y/o contribuir en la fase de farmacovigilancia de ensayos farmacológicos. Dichos objetivos tienen la finalidad de mejorar la salud del paciente, así como su calidad de vida.

2.2 Objetivos del Trabajo

El objetivo principal del presente trabajo ha sido la búsqueda de interacciones *off-target* producidos por Amiodarona, un fármaco causante de ingresos hospitalarios en el paciente, a través del uso de la herramienta bioinformática BioGPS, con el fin de comparar los resultados de acoplamiento entre fármaco-diana obtenidos y dar una explicación a la unión, así como de verificar y/o notificar posibles efectos adversos.

Los objetivos concretos para lograr el objetivo principal han sido los siguientes:

- Realizar una búsqueda bibliográfica sobre aquellos fármacos que produzcan un mayor porcentaje de ingresos hospitalarios, debido a sus RAM. De ellos, elegir el más relevante para realizar la investigación.
- Encontrar posibles interacciones *off-target* de los metabolitos escogidos utilizando la herramienta bioinformática seleccionada.

Para poder llevarlos a cabo, se proponen los siguientes objetivos específicos:

1. Seleccionar y obtener los metabolitos de Amiodarona causantes de las RAM para realizar la investigación.

2. Investigar interacciones *off-target* potenciales, con metabolitos obtenidos de manera experimental, usando BioGPS.
3. Investigar interacciones *off-target* potenciales con la misma herramienta con metabolitos teóricos obtenidos de bases de datos públicas.
4. Comparar los resultados experimentales y teóricos para evaluar el resultado de la unión fármaco-diana.
5. Generar una hipótesis que explique los fundamentos por los que se produce la unión no deseada.

2.3 Enfoque y método seguido

Para investigar los posibles efectos *off-target* del fármaco Amiodarona, se utilizarán diversas herramientas bioinformáticas. Primero, se deberán obtener las estructuras de sus metabolitos principales para posteriormente, realizar el acoplamiento molecular entre fármaco-diana.

Con respecto a la obtención de las moléculas de interés se han abordado varias estrategias: para los compuestos teóricos se ha optado por el uso de bases de datos públicas, como PubChem (7). En cambio, los compuestos experimentales se han obtenido manualmente a través del software WebMetabase (8), alojado en un servidor privado (datos cedidos por la empresa Lead Molecular Design).

Para llevar a cabo el *docking* molecular entre ligandos y dianas se plantearon diferentes herramientas bioinformáticas. La primera de ellas fue Autodock Vina, un software de código abierto capaz de realizar acoplamiento molecular y

screening virtual de un ligando y una diana de forma individual (9). Por otro lado, PyMOL (10), un sistema de visualización molecular de código abierto con funcionalidad similar a la anterior herramienta. Por último, se planteó el uso de BioGPS (*Global Positioning System in Biological Space*), una nueva aplicación aún no comercializada usada durante el periodo de prácticas curriculares, de comparación y agrupación de bolsillos proteicos basada en campos de interacción molecular (*Molecular Interactivo Fields*, MIF) generados a partir del cálculo de interacciones de tipo hidrofílico, hidrofóbico, de la forma que permite realizar el *screening* con múltiples ligandos y dianas al mismo tiempo (11).

Debido a la eficiencia y versatilidad que ofrece BioGPS, además de su ventaja de representar y comparar los sitios de unión a proteínas con otras por su imagen de ligando derivada de los MIF y no por las características de los residuos como otras herramientas (6), fue la herramienta bioinformática de elección para la realización del presente trabajo.

Esta aplicación se basa en el algoritmo FLAP (*Fingerprints for Ligands and Proteins*), utilizado con éxito en el campo de diseño de fármacos (12), el cual es usado para identificar los bolsillos en estructuras proteicas 3D (*Figura 1a*). Durante la identificación, la estructura proteica es incrustada en una cuadrícula 3D y el algoritmo identifica todas las posibles combinaciones de 4 de los puntos representativos con las 6 distancias para cada uno, donde cada combinación es un cuádruplete (1 bit). Para su caracterización, el bolsillo se procesa por el campo de fuerza GRID para evaluar el tipo, fuerza y dirección de las interacciones que puede realizar el bolsillo. Todos los cuádrupletes de un bolsillo, con sus 4 puntos y sus 6 distancias, se almacenan juntas con un *bitstring* que constituye el *Common Reference Framework*. Dado un dataset de bolsillos (*Figura 1b*), todos sus CRF se almacenan en una base de datos para compararlos con plantillas y así calcular su grado de similitud (6).

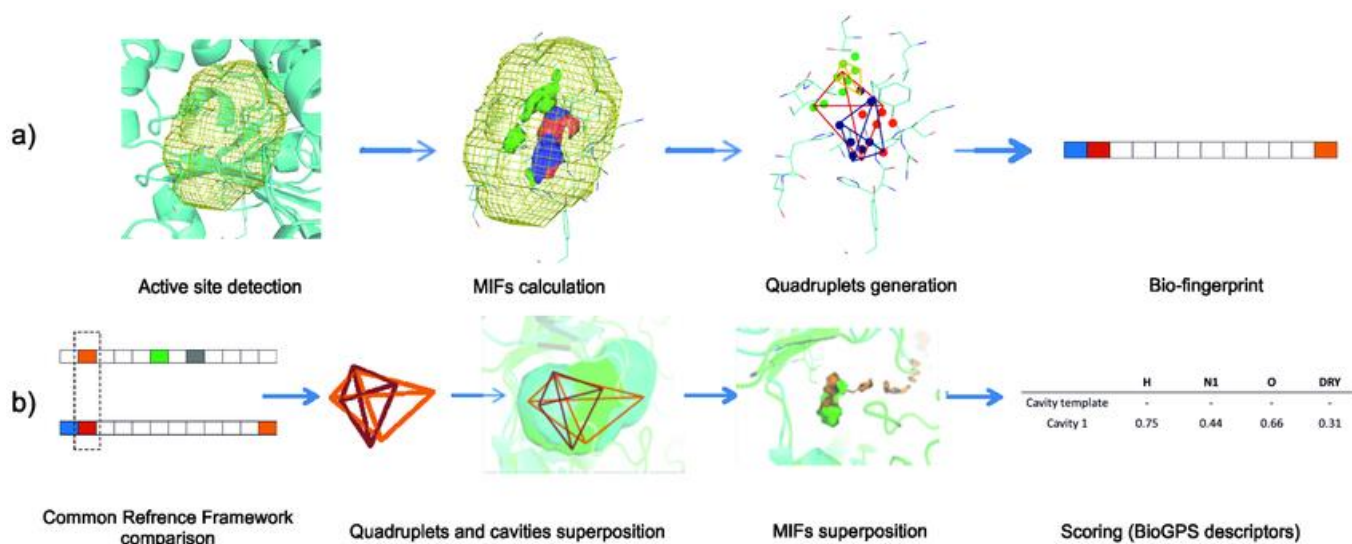


Figura 2. Esquema del funcionamiento de BioGPS para generar descriptores moleculares.
 Imagen obtenida en <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0109354>.

Se usan sondas de diferente tipo para cada bolsillo para calcular la forma (GRID H), interacciones hidrofóbicas (GRID DRY), interacciones de aceptores de puentes de hidrógeno (GRID O) y de donadores de puente de hidrógeno (GRID N). Una vez realizado el acoplamiento el algoritmo calcula para cada solución el set de puntuaciones similares de Tanimoto (16 puntuaciones de sondas y 2 puntuaciones globales), las cuales sirven para entender la similitud entre bolsillos (6). Para la investigación se ha seleccionado como referencia la puntuación nombrada por BioGPS como Glob-Sum, la cual suma 4 tipos de sonda y tiene un rango de 0 a 4.

2.4 Planificación del Trabajo

Los recursos necesarios que han sido utilizados para realizar el trabajo se detallan a continuación:

- WebMetabase y MassMetaSite, utilizados para obtener los metabolitos de Amiodarona a partir de datos experimentales.
- PubChem, utilizada para la obtención de los metabolitos teóricos de Amiodarona.
- BioGPS, usada para la realización de los acoplamientos moleculares, visualización 3D de las estructuras y obtención de los perfiles del reactoma.
- Uniprot, Protein Data Bank (PDB) y DrugBank, usadas como fuente bibliográfica de las estructuras obtenidas mediante BioGPS.
- PubMed, MedLine y Google Scholar, para la búsqueda bibliográfica acerca de Amiodarona, de RAM y de ingresos hospitalarios debidos a efectos adversos de fármacos.

En la *Figura 3* se detalla la planificación temporal seguida durante el trabajo, así como la descripción de cada una de las tareas que se han abordado para realizar la investigación. Dicha planificación ha sido creada usando la aplicación Gantt Project mediante un diagrama de Gantt. En ella también han sido contempladas las Pruebas de Evaluación Continua (PEC) presentes en el plan docente de la asignatura:



Nombre	Fecha de inicio	Fecha de fin
☐ ● Búsqueda bibliográfica	12/2/21	13/3/21
● RAM con elevado ingreso hospitalario	12/2/21	14/2/21
● Seleccionar 1 fármaco con dichas RAM frecuentes	15/2/21	18/2/21
☐ ● Bibliografía de Amiodarona	19/2/21	10/3/21
● Metabolitos	19/2/21	24/2/21
● Dianas terapéuticas	25/2/21	2/3/21
● Efectos adversos	3/3/21	10/3/21
● Archivos de BD de esos metabolitos y dianas	11/3/21	13/3/21
● PAC 0: DEFINICIÓN DE LOS CONTENIDOS DEL TRABAJO	17/2/21	1/3/21
● PAC 1: PLAN DE TRABAJO	2/3/21	16/3/21
● PAC 2: DESARROLLO DEL TRABAJO - FASE 1	17/3/21	19/4/21
● PAC 3: DESARROLLO DEL TRABAJO - FASE 2	20/4/21	17/5/21
☐ ● Investigar "off-targets" de metabolitos experimentales	21/4/21	9/5/21
☐ ● Obtener los metabolitos de Massmetasite	21/4/21	27/4/21
● Estudiar compuestos obtenidos del experimento	21/4/21	27/4/21
● Exportar en SDF	27/4/21	27/4/21
● Importar en la GUI los metabolitos + 3D	28/4/21	9/5/21
● Screening de ligando-bolsillos de BioGPS	28/4/21	9/5/21
● Reactome profile	28/4/21	9/5/21
☐ ● Investigar "off-target" de metabolitos teóricos	10/5/21	17/5/21
● Importar en la GUI ligandos teóricos y dianas + 3D	10/5/21	17/5/21
● Screening de ligandos teóricos-dianas	10/5/21	17/5/21
● Reactome profile	10/5/21	17/5/21
● PAC 4: CIERRE DE LA MEMORIA	18/5/21	8/6/21
☐ ● Comparar resultados y evaluarlos	18/5/21	25/5/21
● Comparar metabolitos teóricos y experimentales	18/5/21	20/5/21
● Comparar interacciones de los dos métodos	21/5/21	25/5/21
● Notificar posibles reacciones adversas	21/5/21	25/5/21
● PAC 5A: ELABORACIÓN DE LA PRESENTACIÓN	10/6/21	13/6/21
● PAC 5B: DEFENSA PÚBLICA	16/6/21	23/6/21

Figura 3. Planificación de tareas usando Gantt Project.

2.5 Breve resumen de contribuciones y productos obtenidos

Con la realización del presente trabajo mediante BioGPS, se han podido obtener diversas reacciones adversas producidas por el fármaco Amiodarona, las cuales han sido:

- Esteatosis hepática
- Estrés oxidativo

- Acidosis metabólica y diuresis
- Toxicidad pulmonar

2.6 Breve descripción de los otros capítulos de la memoria

La memoria del presente trabajo está compuesta por los siguientes capítulos:

- **Resumen:** se presenta la temática del trabajo y un breve resumen de la investigación realizada.
- **Introducción:** se muestra la justificación del tema elegido y su contexto en la actualidad, se detallan los objetivos principales, así como las tareas seguidas durante el proceso, se definen las herramientas computacionales elegidas para la investigación y, por último, se nombran brevemente los resultados que se han obtenido.
- **Estado del arte:** muestra la importancia de la temática del trabajo y las aportaciones al campo de estudio.
- **Metodología:** se detalla el proceso de búsqueda bibliográfico seguido para la realización del trabajo y se nombran las aplicaciones bioinformáticas con las que se ha trabajado.
- **Resultados:** Se expone de manera detallada el procedimiento seguido para la investigación, así como la exposición de los resultados obtenidos.
- **Discusión:** Se comparan los resultados obtenidos mediante los dos métodos (experimental y teórico).

- **Conclusiones:** Se recopilan las principales ideas expuestas, se muestran los resultados obtenidos y se muestra la importancia del trabajo para líneas de investigación futuras.

3 Estado del arte

Desde su primera aparición en los 70, el acoplamiento molecular ha sido una herramienta *in silico* utilizada para el diseño y el descubrimiento de nuevos fármacos. Este método fue diseñado *a priori* para ayudar a comprender mecanismos de reconocimiento molecular entre moléculas grandes y pequeñas a través de la información estructural de los *targets* para realizar las predicciones.

Hasta ahora, el *docking* molecular ha experimentado múltiples mejoras gracias a la mejora de los algoritmos de acoplamiento y al aumento de información de acceso público sobre ligandos y dianas, hasta convertirse en un método de ayuda en las tareas de los programas de descubrimiento de fármacos, identificación y optimización de aciertos, diseño de ligando multiobjetivo, reutilización de fármacos, reposicionamiento, polifarmacología y predicción de reacciones adversas.

El método resulta de gran utilidad en la predicción de efectos *off-target* de compuestos que estén en las primeras fases de desarrollo preclínico y clínico o de aquellos que no tengan un registro de bioactividad notificado. Además, recientemente se han aplicado combinaciones de acoplamiento con modelos de *machine learning* para dar con supuestas reacciones adversas y proporcionar explicaciones potenciales sobre mecanismos biológicos. Con ello se demuestra que con flujos de trabajo computacionales que integren el acoplamiento molecular es factible la predicción de estas reacciones a gran escala (5).

En el presente trabajo, se ha utilizado un software novedoso y aún no-comercializado basado en el acoplamiento molecular, BioGPS. Una de las ventajas que presenta frente a otras herramientas disponibles actualmente es que los sitios de unión a proteínas se representan y comparan con otros por su imagen de ligando derivada de los MIF y no por las características de sus residuos (6). Por lo tanto, esta nueva herramienta puede contribuir a la búsqueda y notificación de efectos *off-targets* de fármacos actuales para su mejora.

4 Metodología

Para la elaboración de este trabajo se ha realizado una búsqueda bibliográfica de artículos científicos en las bases de datos siguientes: PubMed, MedLine y Google Scholar. Para dicha búsqueda se ha acotado el campo, principalmente, con las palabras clave “*virtual screening*”, “*molecular docking*”, “*hospital admissions ADR*” y “*Amiodarone side effects*”.

Por otra parte, para la realización de la parte práctica abordada, se han escogido diferentes herramientas computacionales como BioGPS, aún no comercializada, para el estudio de las interacciones *off-target* y WebMetabase junto con MassMetaSite para obtener información sobre los metabolitos reales de la amiodarona, así como bases de datos públicas como Protein Data Bank, UniProt, PubChem y DrugBank para obtener metabolitos teóricos y realizar una posterior comparación con los metabolitos experimentales.

5 Resultados

Para obtener y notificar las dianas *off-target* que desencadenan las RAM de Amiodarona, se han seguido los siguientes pasos durante la investigación:

5.2. Procedimiento seguido:

En este capítulo se expondrán detalladamente tanto los pasos para la obtención de los metabolitos teóricos y experimentales como la realización del acoplamiento molecular mediante BioGPS:

5.2.1. Obtención de metabolitos experimentales:

La Amiodarona y sus principales metabolitos utilizados para el presente trabajo han sido obtenidos a partir de datos experimentales cedidos por la empresa Lead Molecular Design, S.L.

Para ello, se ha usado el software WebMetabase, una base de datos para almacenar datos de identificación de metabolitos y revisión de experimentos, así como el software MassMetaSite, que identifica de manera automática metabolitos de moléculas pequeñas y péptidos mediante cromatografía líquida y espectrometría de masas de alta resolución en un tiempo muy reducido, ambos pertenecientes a la empresa Molecular Discovery, Ltd (8),(13). En combinación, ambos programas aceleran la traducción de la información espectral en estructuras químicas al transformar los datos del instrumento en información.

Se disponían datos de dos experimentos, uno realizado en microsomas de hígado humano (*Human liver microsomes*, HLM) y otro realizado en hepatocitos humanos (*Human hepatocytes*, HHEP).

En el caso de Amiodarona, su metabolito principal Desetilamiodarona (DEA) se obtiene a partir de una reacción de N-desetilación, reacción de biotransformación de fase II o conjugación, llevada a cabo por las enzimas CYP3A4 (Citocromo P450, subfamilia 3A4) y CYP2C8 (Citocromo P450, subfamilia 2C8) en el hígado (14). Este fármaco se caracteriza por tener poca biodisponibilidad (entre un 20 y 80%) además de experimentar una amplia circulación enterohepática antes de entrar en un compartimento central (15).

Por ello, debido a que los metabolitos principales de la Amiodarona surgen a partir de reacciones de biotransformación de fase II o conjugación, se eligieron solo aquellos resultados pertenecientes al experimento en HHEP, ya que dichas reacciones tienen lugar en los hepatocitos y no en los microsomas.

A partir de los archivos de HHEP, se creó un protocolo para la obtención de sus metabolitos. En él se indicaron y se seleccionaron los archivos que contenían la información de cada muestra para los tiempos experimentales de 5, 15, 40, 80 y 140 minutos, además de indicar y seleccionar el archivo correspondiente al blanco para minimizar el efecto de la matriz durante el experimento. Seguidamente, se obtuvieron los resultados de los metabolitos para Amiodarona, descartando aquellos que poseían una diferencia de masa menor a 10 ppm, ya que esta desviación en el valor del ratio masa/carga (m/z) respecto el valor teórico podría indicar que el metabolito elucidado no es correcto.

Como resultado, se obtuvieron 2 metabolitos para Amiodarona, los cuales se exportaron en formato SDF para su posterior uso en la siguiente etapa de búsqueda de interacciones *off-target*.

5.2.2. Obtención de metabolitos teóricos:

La obtención de los metabolitos se basó en la búsqueda bibliográfica de las moléculas de interés en la web PubChem a partir del nombre del fármaco elegido (*Amiodarone*) (7), así como sus metabolitos principales obtenidos de la bibliografía. Para el caso teórico, se obtuvo solo la estructura del metabolito Desetilamiodarona, ya que no se encontró estructura para su segundo metabolito 3'-hidroxilamiodarona. Dichos archivos se exportaron posteriormente en formato SDF para su uso en BioGPS.

5.2.3. Investigación de efectos adversos con BioGPS:

La búsqueda de interacciones *off-target* se enfocó de dos maneras: la primera, usando metabolitos experimentales reales detectados en las muestras cedidas por Lead Molecular Design, y una segunda, usando los metabolitos teóricos a través de PubChem.

Seguidamente con BioGPS, se estudiaron las posibles diferencias moleculares entre las estructuras experimentales y teóricas del fármaco, las cuales se detallarán más adelante.

Para la realización del acoplamiento molecular se utilizó la herramienta de *screening* virtual que contiene BioGPS. En total se realizaron 4 comparaciones, explicadas a continuación:

- Principio activo + Metabolitos vs. *BioGPS* pockets: El primer paso fue la realización de un *screening* entre el principio activo y sus principales metabolitos frente a la base de datos de dianas proteicas que contiene BioGPS (especie humana), con la finalidad de obtener un listado de las principales estructuras a las que se une cada fármaco y, de esta forma, poder identificar en las primeras posiciones las dianas principales terapéuticas de cada fármaco. La unión fármaco-diana de aquellas que obtienen una puntuación mayor indican una afinidad mayor por ese ligando. Además, con estos resultados se pudieron describir otras dianas en las que se producía una unión destacable del fármaco, pudiendo estudiar si eran las causantes de las RAM.
- Principio activo y Metabolitos vs. dianas terapéuticas: Se procedió a buscar cuáles eran los targets principales para cada fármaco, a través de DrugBank (16) y, a partir de los códigos Uniprot de cada estructura, se procedió a obtener los archivos en formato PDB de aquellas estructuras que cumplieran las dos características siguientes:
 - Estructura obtenida mediante el método de difracción de Rayos X. En caso de haber varias estructuras, se seleccionaron un máximo de 3 moléculas por cada estructura proteica, aquellas con el valor de resolución más bajo (expresado en Armstrong, Å).

- Estructuras pertenecientes a la especie humana. Tal y como se explicó en el apartado 2.3., la base de datos de BioGPS solo contiene bolsillos proteicos humanos. Por esta razón, se ha decidido acotar la búsqueda y trabajar exclusivamente con estructuras obtenidas de la especie humana.
- Metabolitos vs. dianas sospechosas de producir RAM: Se realizó además un último *screening* entre los metabolitos principales de cada fármaco y aquellos bolsillos de los que se sospecha una RAM al producirse la unión fármaco-diana. Se descartó realizar el acoplamiento de los principios activos debido a la fase de metabolismo que sufren los fármacos una vez distribuidos por el organismo.

Para el *screening* virtual se utilizaron los mismos parámetros, los cuales se detallan a continuación:

- *Maximum X-Ray resolution* = 1.5 Å. La resolución en cristalografía de rayos X corresponde a la mínima distancia entre los planos de la red cristalina que se obtiene del patrón de difracción. Por lo tanto, a menor valor de rango especificado, mejor será la resolución (6).
- *Low speed (high accuracy)*. La precisión hace referencia al número de cuadrupletes seleccionados. A mayor número de cuadrupletes, mayor precisión, pero menor velocidad de cálculo (6). Para la investigación se ha seleccionado la velocidad más baja para obtener una precisión mayor.
- *BioGPS pockets list (non-redundant pocketome)*. Con este parámetro se seleccionan todos los bolsillos proteicos que contiene la base de

datos de BioGPS (solo para especie humana), que se utilizarán como candidatos para la posible unión con el fármaco de interés (6).

- *Keep best 1% of Glob-Sum.* Seleccionando esta opción, se obtendrá el 1% de aquellos candidatos con mejor puntuación Glob-Sum de la clasificación, dejando fuera del análisis aquellos bolsillos cuya unión sea muy débil.

Finalmente, se procedió a la realización de un perfil del reactoma para cada *screening* utilizando BioGPS, ya que el software permite mapear los bolsillos de BioGPS en las rutas de *Reactome database* (17), para averiguar en qué rutas biológicas podría estar implicado cada fármaco para cada proteína indicada.

5.3. Resultados obtenidos:

La Amiodarona es un derivado benzofurano yodado altamente lipofílico con una farmacocinética impredecible (Figura 1) (18). Destaca por ser un potente vasodilatador coronario y periférico indicado únicamente para el tratamiento de arritmias graves cuando no respondan a otros tratamientos y para tratamiento de última instancia en pacientes con taquiarritmias asociadas con el síndrome de Wolff-Parkinson-White, flutter, fibrilación auricular y todos los tipos de taquiarritmias de naturaleza paroxística (19).

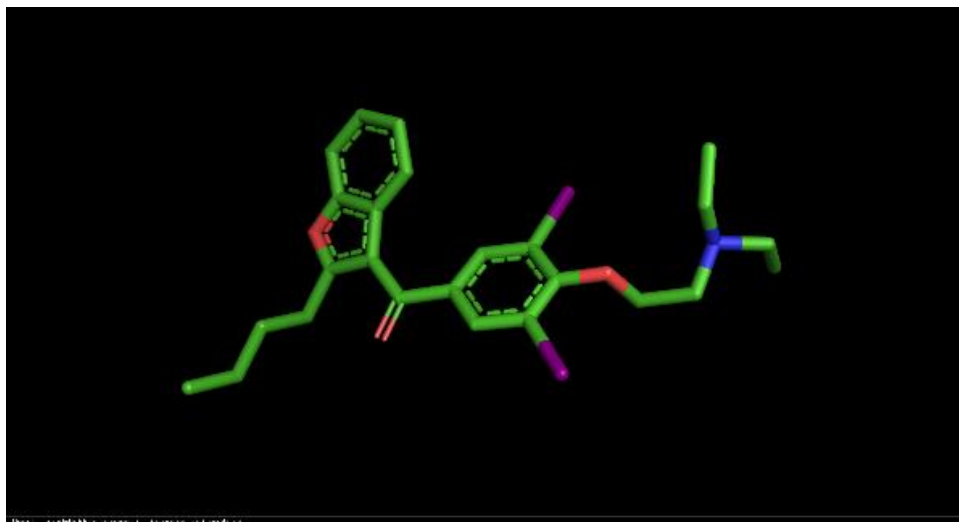


Figura 4. Molécula de Amiodarona en 3D obtenida mediante BioGPS.

Debido a los numerosos efectos adversos notificados por el uso de este fármaco, se usó BioGPS para poder buscar e identificar posibles mecanismos de acción causantes de los efectos *off-target*.

La Amiodarona presenta 8 dianas principales a las que se une para realizar su acción principal, las cuales se muestran a continuación en la *Tabla 1*, con sus respectivos códigos de identificación así como su mecanismo de acción (16):

Tabla 1. Principales dianas de acción de Amiodarona.

CÓDIGO UNIPROT	GRUPO PROTEICO	DIANA FARMACOLÓGICA	MECANISMO DE ACCIÓN
Q12809	Canal de K+ cardíaco humano HERG	Subfamilia H del canal dependiente de voltaje de potasio, miembro 2.	Involucradas en la repolarización del potencial de acción de las células del músculo cardíaco ventricular (20).
Q9H252		Subfamilia H del canal dependiente de voltaje de potasio, miembro 6.	
Q9NS40		Subfamilia H del canal dependiente de voltaje de potasio, miembro 7.	
P08588	Receptor beta adrenérgico	Receptor adrenérgico beta 1.	Tiene función de señalización del receptor (21).
P07550		Receptor adrenérgico beta 2.	
P13945		Receptor adrenérgico beta 3.	
Q9P0X4	-	Subunidad alfa-1I del canal de calcio tipo T dependiente de voltaje.	Media la entrada de iones calcio en las células excitables y también están involucrados en procesos dependientes de calcio, como la contracción muscular (22).
Q13936 / Q01668 / O60840 / Q13698 / Q02641 / Q08289 / P54284 / O00305	Canal de Ca ²⁺ tipo L controlado por voltaje	Subunidades alfa (1C, 1D, 1F, 1S) y beta (1, 2, 3 y 4).	Media la entrada de iones calcio en las células excitables y también están involucrados en procesos dependientes de calcio, como la contracción muscular (22).
P10827	Receptor de la hormona tiroidea	Receptor alfa de la hormona tiroidea.	Se encarga de la unión de iones de zinc (23).
P10828		Receptor beta de la hormona tiroidea.	
P37231	-	Receptor gamma activado por proliferador de peroxisomas.	Se encarga de la unión de iones de zinc (24).
Q07869	-	Receptor alfa activado por proliferador de peroxisomas.	Se encarga de la unión de iones de zinc (24).
Q86YN6	-	Coactivador 1-beta del receptor gamma activado por proliferador de peroxisomas.	Desempeña un papel de estimulador de factores de transcripción y actividades de receptores nucleares (24).

Para la investigación, se realizó un primer *screening* virtual a modo de comprobación de la unión entre Amiodarona y Desetilamiodarona con sus dianas farmacológicas principales (descritas en la *Tabla 1*), estableciendo los mismos parámetros descritos anteriormente. Como resultado solo se pudo verificar la presencia de la estructura del receptor alfa de la hormona tiroidea (P10827) entre los bolsillos seleccionados, con una puntuación Glob-Sum de 0.945 para el metabolito teórico y 0.925 para los experimentales. Esto se explicaría a través de la elección del parámetro establecido *Keep 1% of Glob-Sum* para la realización del *screening*, ya que de todas las uniones posibles solo se seleccionaron el 1% (entre ellas se notificaron diversas enzimas esenciales para la biotransformación del fármaco en su metabolito).

Debido a ello, se realizó un segundo *screening*, donde se procedió a importar en BioGPS las estructuras moleculares de cada diana a partir del código Uniprot, estableciendo como parámetros *Maximum X-ray resolution* de 2.0 Å, estructuras pertenecientes a la especie humana y aquellas obtenidas mediante el método de difracción de rayos X (*Figura 2*), con la finalidad de verificar la unión fármaco-diana farmacológica.

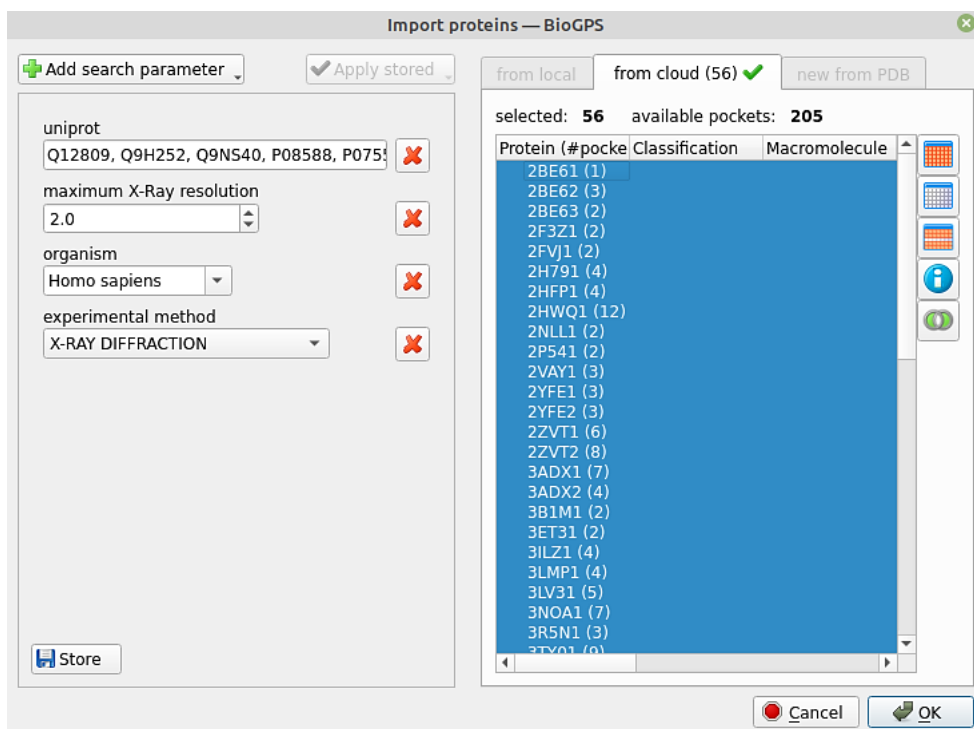


Figura 5. Parámetros establecidos para la importación de bolsillos a través del código Uniprot.

Tal y como se observa en la imagen, a partir de los códigos de Uniprot pertenecientes a cada diana farmacológica de Amiodarona, se obtuvieron 56 estructuras, las cuales contenían 205 bolsillos proteicos posibles para la interacción con el fármaco.

Una vez realizado el *screening*, todas ellas obtuvieron una puntuación basada en Glob-Sum entre 0.825 y 0.680, por lo que se verifica la relación estrecha entre fármaco y dianas terapéuticas. Además, debido al rango de puntuaciones obtenido se puede explicar la ausencia de dichos targets en el primer *screening* realizado, el cual comprendía puntuaciones entre 1.0 y 0.8.

Este proceso se realizó tanto con metabolitos teóricos como experimentales y se obtuvieron resultados muy similares en relación con los bolsillos a los cuales se une Amiodarona. El acoplamiento fármaco-diana se realizó con 54041 candidatos de la base de datos de BioGPS. Los resultados fueron los siguientes:

- **Investigación teórica:**

Una vez realizado el primer screening, detallado en el punto anterior, al realizar el acoplamiento, los candidatos idóneos para la unión fármaco-diana se redujeron a 541. Se ordenó la clasificación de bolsillos según Glob-Sum y se seleccionaron los primeros 50 candidatos por su código Uniprot para contrastar mediante búsqueda bibliográfica dicha unión y poder dar con un efecto adverso. El rango de puntuación obtenido se estableció entre 1.018 y 0.931. Los resultados más relevantes fueron los siguientes 4 bolsillos, 2 de los cuales (pertenecientes a alteraciones hepáticas) fueron hallados en el apartado de reacciones adversas de la ficha técnica de Amiodarona (19):

Tabla 2. Candidatos potenciales obtenidos en BioGPS para Desetilamiodarona teórica.

Código Uniprot	Nombre del candidato	Posible efecto adverso	Puntuación teórica
P15121 / P42330	Aldo-keto reductasa familia 1 miembro B1 y C3	Esteatosis hepática	0.965
P07900	Proteína de choque térmico 90	Estrés oxidativo	0.962
P00918	Anhidrasa carbónica 2	Acidosis metabólica / Efectos diuréticos	0.941

La función de los bolsillos obtenidos como sospechosos de producir RAM es la siguiente:

- Aldo-keto reductasa: son una familia de enzimas de fase 1 que metabolizan fármacos que contienen el grupo carbonilo. Se ha visto también que desintoxican los aldehídos reactivos que se forman por

tóxicos endógenos, exógenos y los formados por descomposición de peróxidos lipídicos (25).

- Proteína de choque térmico HSP90: es una chaperona molecular que promueve la maduración, mantenimiento estructural y regulación adecuada de proteínas dianas específicas. Además, también es conocida por ser un marcador temprano de daño oxidativo (26).
- Anhidrasa carbónica 2: es un tipo de enzima citosólica que contribuye a la regulación del pH intracelular en el epitelio vellosos superior del duodeno (27).

Su perfil del Reactoma fue el siguiente (*Figura 6*):

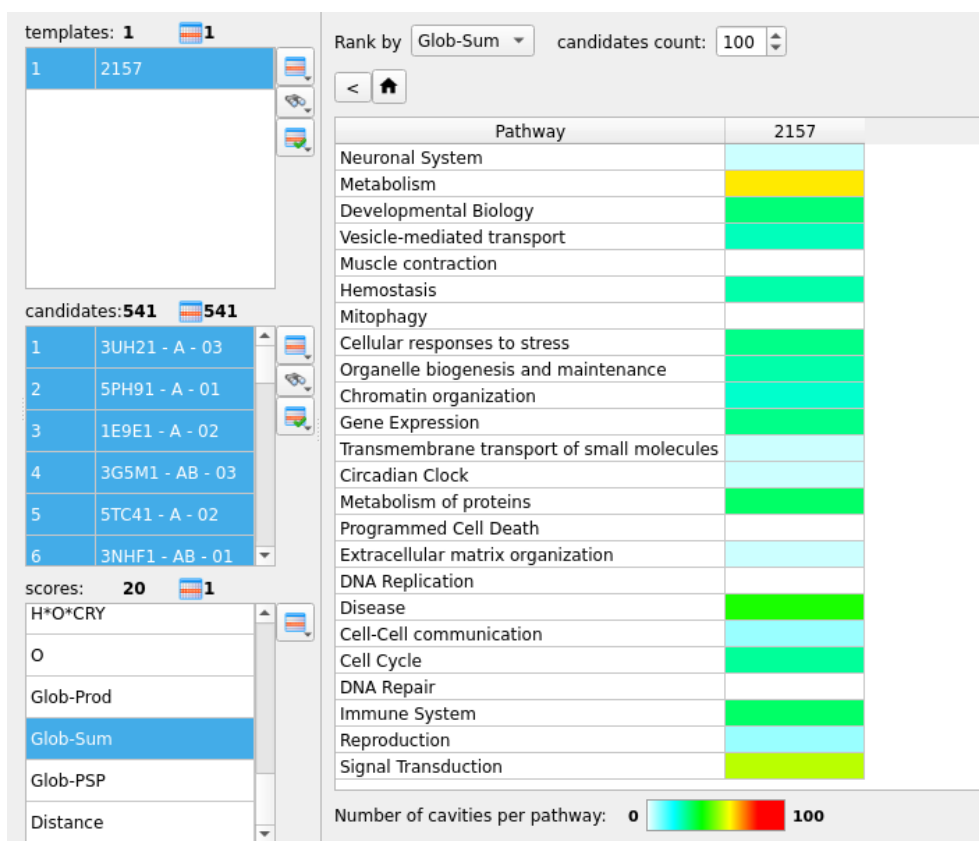


Figura 6. Perfil del Reactoma de Desetilamiodarona obtenidos teóricamente.

En la imagen se muestran las 100 primeras cavidades del ranking Glob-Sum para DA (indicada como “2147”). Se observa cómo la mayoría de las cavidades se concentran en rutas relacionadas con el metabolismo (color naranja claro).

- **Investigación experimental:**

El siguiente *screening* se realizó entre Desetilamiodarona y 3'-hidroxilamiodarona, obtenidos a partir de WebMetabase, siguiendo los parámetros que en el caso teórico.

Al realizar el acoplamiento, se obtuvieron 293 candidatos de los 54041 iniciales. Se ordenó la clasificación de bolsillos según Glob-Sum y se seleccionaron los primeros 50 candidatos por su código. El rango de puntuación Glob-Sum para estos candidatos se situó entre 1.019 y 0.845. Los resultados, muy similares al caso teórico, se recogen en la Tabla 3:

Tabla 3. Candidatos potenciales obtenidos en BioGPS para Desetilamiodarona (DA) y 3'-hidroxilamiodarona (HA).

Código Uniprot	Nombre del candidato	Posible efecto adverso	Puntuación Teórica (DA)	Puntuación Experimental (HA / DA)
P15121 / P42330	Aldo-keto reductasa familia 1 miembro B1 y C3	Esteatosis hepática	0.965	0.971 / 0.970
P07900	Proteína de choque térmico 90	Estrés oxidativo	0.962	0.979 / 0.916
P00918	Anhidrasa carbónica 2	Acidosis metabólica / Efectos diuréticos	0.941	0.940 / 0.935

Su perfil del Reactoma fue el siguiente (Figura 7):

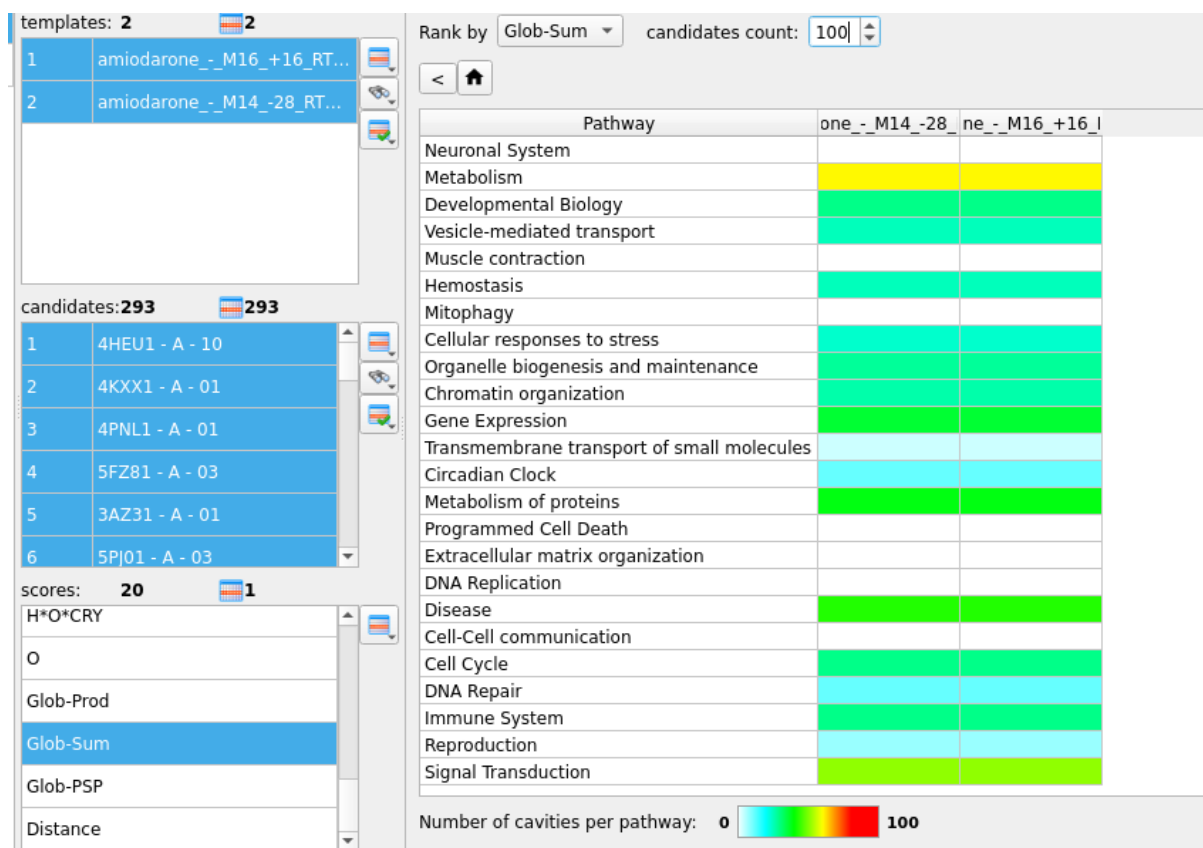


Figura 7. Perfil del Reactoma de Desetilamiodarona y 3'-hidroxilamiodarona obtenidos experimentalmente.

En la imagen se muestran las 100 primeras cavidades del ranking Glob-Sum para DA y HA (indicadas como “amiodarone_-_M14” y “amiodarone_-_M16”, respectivamente). Se observa cómo la mayoría de las cavidades se concentran en rutas relacionadas con el metabolismo (color amarillo para ambos casos).

Debido a que el efecto adverso más grave notificado en Amiodarona es la toxicidad pulmonar (28), se ha realizado además una búsqueda de estructuras proteicas para posteriormente importarlas a BioGPS y realizar un tercer *screening* con el metabolito principal, con la finalidad de dar con el bolsillo proteico que desencadene dicho efecto.

La búsqueda se ha realizado en la web de Uniprot, donde se han seleccionado las siguientes estructuras, con sus respectivos códigos identificativos, acotando la búsqueda por “*lung cells*”:

- Q9NP55: Proteína clónica del paladar, pulmón y epitelio nasal PLUNC, que interviene en la respuesta inmunitaria innata de las vías respiratorias superiores y reduce la tensión superficial en las secreciones de los epitelios. Está codificada por el gen BPIFA1, anteriormente llamado PLUNC (29).

- P35247: Proteína D asociada al surfactante pulmonar. Realiza función de defensa del pulmón contra agentes externos y modula la acción de los leucocitos en la respuesta inmune, además de participar en la reorganización/renovación extracelular del surfactante pulmonar. Está codificada por el gen SFTPD (30).

Para realizar el *screening*, se han indicado estos dos códigos como parámetros para realizar la investigación, además de los establecidos en el apartado anterior (*Maximum X-ray resolution = 2.0 Å y higher accuracy*). Como resultado se han obtenido dos candidatos, 2ORK1 y 3G831 pertenecientes a la proteína D asociada al surfactante pulmonar, que presentan una puntuación Glob-Sum de 0.879 y 0.869, respectivamente (ver Figura 6).

Candidate	Protein name	Uniprot	Ligands	Active	Glob-Sum (1)
2ORK1 - BCA...	Pulmonary s...	P35247			0.879
3G831 - BCA ...	Pulmonary s...	P35247			0.869

Figura 8. *Screening* entre Desetilamiodarona y proteína D asociada a surfactante pulmonar.

6 Discusión

Según la búsqueda bibliográfica llevada a cabo durante el trabajo (16), Amiodarona presenta dos metabolitos: el primero, Desetilamiodarona, es su metabolito principal y el que realiza la función farmacológica y el segundo, 3'-hidroxilamiodarona, ha sido identificado en mamíferos pero se desconoce su importancia clínica (31).

Mediante los dos procesos seguidos, detallados durante el trabajo, se pudo obtener solo la estructura de Desetilamiodarona de manera teórica mediante la web de PubChem, ya que no se dispone de estructura para 3'-hiroxilamiodarona en la base de datos. En cambio, mediante WebMetabase, se pudieron obtener los dos metabolitos de Amiodarona de manera experimental.

En cuanto a las puntuaciones obtenidas mediante *screening*, destacan las siguientes dianas a continuación. Además, mediante búsqueda bibliográfica de las mismas, se propone un mecanismo de acción:

- **Aldo-keto reductasa familia 1 miembro B1 y C3:** se encontró un estudio *in vitro* realizado con tecnología proteómica (25) donde se afirmó que la expresión diferencial de aldo-keto reductasa de la familia 1 y miembro C1 puede desempeñar un papel en el desarrollo de esteatosis hepática (acumulación de grasa en el hígado) inducida por Amiodarona. Los bolsillos encontrados en BioGPS fueron de la misma familia 1 de aldo-keto reductasas, aunque difieren en el miembro (B1 y C3), no siendo idénticas a las encontradas en la bibliografía.
- **Proteína de choque térmico HSP90:** Otro estudio realizado en 2012 (32) investigó los efectos citotóxicos de Amiodarona en tres líneas celulares diferentes mediante la monitorización de la inducción de proteínas de choque

térmico (HSP o chaperonas), debido a su característica de ser un marcador temprano de daño oxidativo. Los resultados obtenidos en el estudio mostraron que el fármaco podía inducir el aumento de la expresión de HSP 70 en las líneas celulares cultivadas. Por tanto, debido al complejo multichaperona formado por HSP70 y HSP90 mediante la proteína HOP (33), habría cierta relación entre la unión de Amiodarona y HSP90 encontrada mediante BioGPS.

- **Anhidrasa carbónica 2:** se encontró una investigación (26) donde se examinaron los efectos inhibidores in vitro de Amiodarona sobre las actividades de la anhidrasa carbónica en eritrocitos humanos. Los resultados mostraron que Amiodarona producía un fuerte efecto inhibitorio sobre la actividad enzimática de la anhidrasa carbónica 2. Esta enzima cataliza la conversión de CO₂ en ácido carbónico, papel clave en el equilibrio ácido-base en sangre, además de facilitar el intercambio de CO₂ a nivel alveolopulmonar (dicha actividad se debe en un 70-90% a la anhidrasa carbónica 2) (27). Por ello, su inhibición produce multitud de efectos adversos, entre ellos acidosis metabólica y efectos diuréticos.
- **Proteína D asociada a surfactante pulmonar:** Debido a la puntuación obtenida en el *screening*, se concluye que hay una unión importante entre el ligando Desetilamiodarona y las cavidades pertenecientes a la proteína D asociada a surfactante pulmonar, la cual podría ser la causante de la toxicidad pulmonar que produce Amiodarona. Se requiere de más investigación para afirmar esta suposición.

En resumen, durante la investigación, ha sido posible notificar 4 efectos *off-target* relacionados con el uso de Amiodarona. 3 de ellas fueron encontradas mediante BioGPS y el método de acoplamiento molecular, a partir de su base de datos, y 1 fue notificada mediante búsqueda bibliográfica.

7 Conclusiones

7.1 Conclusiones

Mediante la investigación realizada del fármaco Amiodarona y mediante el uso de la herramienta bioinformática BioGPS, se han podido notificar efectos *off-target* producidos por Amiodarona mediante métodos de acoplamiento molecular entre fármaco y diana. Dichas reacciones adversas son: esteatosis hepática, estrés oxidativo, acidosis metabólica / diuresis y toxicidad pulmonar. Las tres primeras fueron encontradas mediante los resultados calculados por BioGPS, en cambio, la última de ellas fue primero descrita a través de la bibliografía y posteriormente estudiada en BioGPS.

7.2 Líneas de futuro

Debido a la controversia actual entorno al uso de Amiodarona, sus múltiples RAM causantes de hospitalizaciones frecuentes y los resultados obtenidos de interacciones *off-target* mediante acoplamiento molecular, se abre una nueva línea de investigación con la necesidad de profundizar en el tema para lograr que en un futuro sea un fármaco seguro.

Este mismo caso puede extrapolarse en una gran variedad de medicamentos, tanto comercializados como en fase de estudio, de los cuales su seguridad y toxicidad sean dudosas, para así mejorar el proceso de diseño y producción de fármaco, además de mejorar en salud y calidad de vida de los pacientes.

7.3 Seguimiento de la planificación

Durante el presente trabajo, se modificaron varias veces los objetivos principales, secundarios y las tareas debido a complicaciones durante la fase de testeo del software BioGPS.

En un primer momento, se eligió BioGPS como la principal y única herramienta bioinformática para la realización del acoplamiento molecular. Durante la fase de investigación, fueron detectados algunos errores relacionados con la calidad de los resultados durante su proceso de *testing*, motivo por el cual se decidió cambiar de herramienta el 12/04/2021, además del factor tiempo que se disponía para la realización del TFM.

La segunda herramienta de elección fue Autodock Vina, de código abierto y capaz de realizar el acoplamiento molecular entre bolsillos conocidos. Debido a su funcionamiento distinto, se reestructuraron los objetivos y tareas del trabajo acorde con esta herramienta.

A fecha de 24/05/2021, fue notificada la finalización de la etapa de *testing* de BioGPS, por lo que, debido a su eficacia para la comparación de ligandos y dianas proteicas y su versatilidad para realizar múltiples comparaciones de forma simultánea, se volvió a elegir como principal herramienta para la investigación. Para ello, se retomaron los objetivos principales, objetivos secundarios y tareas iniciales, además de añadir otras nuevas a la investigación.

Por último, cabe destacar la elección del número de fármacos utilizados en el trabajo. Inicialmente se contemplaron 3: Losartán, Amiodarona y Tramadol. Debido a los problemas con el uso de BioGPS y el tiempo acotado para la realización del trabajo, se decidió realizar la investigación únicamente de un solo fármaco, la Amiodarona.

8 Glosario

ADR: *Advers Drug Reaction*, reacción adversa medicamentosa.

BD: Base de datos.

DEA: Desetilamiodarona. Es el metabolito principal que se forma a partir del fármaco Amiodarona.

Flutter: sinónimo de aleteo auricular producido por un ritmo cardíaco anormal, rápido e irregular.

HHEP: *Human hepatocytes* o hepatocitos humanos, son células que forman parte del parénquima hepático.

HLM: *Human liver microsomes* o microsomas hepáticos humanos, son orgánulos presentes en el hígado que catalizan transformaciones metabólicas mayoritariamente.

HPS: *Heat Shock Protein*. Es la proteína de choque térmico.

MIF: *Molecular Interaction Fields*.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PEC: Prueba de Evaluación Continua.

PDB: *Protein Data Bank*. Es una base de datos de estructuras 3D de proteínas y ácidos nucleicos.

RAM: Reacción Adversa Medicamentosa.

UV: Radiación Ultravioleta.

9 Bibliografía

1. Jiménez ÓE, Pemán CN, Rubio FG, Lanuza J, Montesa C, Salud C De, et al. Análisis de la incidencia y de las características clínicas de las RAMs en el medio hospitalario. 2017;1–17.
2. MINISTERIO DE SANIDAD SSEIAE de M y PS. Información Para Las

- Notificaciones De Sospechas De Reacciones Adversas a Medicamentos Por Parte De Profesionales Sanitarios [Internet]. 2013. p. 1–14. Available from:
<https://www.aemps.gob.es/vigilancia/medicamentosUsoHumano/SEFV-H/NRA-SEFV-H/docs/notificaSospechas-RAM-profSanitarios.pdf>
3. Pirmohamed M, James S, Meakin S, Green C, Scott AK, Walley TJ, et al. Adverse drug reactions as cause of admission to hospital: Prospective analysis of 18 820 patients. *Br Med J* [Internet]. 2004 Jul 3 [cited 2021 May 25];329(7456):15–9. Available from: [/pmc/articles/PMC443443/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16320621/)
 4. Lazarou J, Pomeranz BH CP. Adverse drug reactions in hospitalized patients. *JAMA*. 1998;280(20).
 5. Pinzi L, Rastelli G. Molecular docking: Shifting paradigms in drug discovery. *Int J Mol Sci*. 2019;20(18).
 6. Molecular Discovery Ltd. Reference manual for BioGPS. 2021. p. 1–76.
 7. PubChem [Internet]. [cited 2021 May 26]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
 8. WebMetabase [Internet]. [cited 2021 May 26]. Available from: <https://www.moldiscovery.com/software/webmetabase/>
 9. AutoDock Vina - molecular docking and virtual screening program [Internet]. [cited 2021 May 17]. Available from: <http://vina.scripps.edu/tutorial.html>
 10. PyMOL | pymol.org [Internet]. [cited 2021 Jun 6]. Available from: <https://pymol.org/2/>
 11. Siragusa L, Cross S, Baroni M, Goracci L, Cruciani G. BioGPS: Navigating biological space to predict polypharmacology, off-targeting, and selectivity. *Proteins Struct Funct Bioinforma*. 2015;83(3):517–32.
 12. Ferrario V, Siragusa L, Ebert C, Baroni M, Foscatto M, Cruciani G, et al. BioGPS descriptors for rational engineering of enzyme promiscuity and structure based bioinformatic analysis. *PLoS One*. 2014;9(10).
 13. Mass-MetaSite: High-Throughput MetID [Internet]. [cited 2021 May 26]. Available from: <https://www.moldiscovery.com/software/massmetasite/>

14. FDA, CDER. Cordarone (amiodarone hydrochloride) tablets label.
15. Freedman MD, Somberg JC. Pharmacology and Pharmacokinetics of Amiodarone. *J Clin Pharmacol*. 1991;31(11):1061–9.
16. DrugBank Online | Database for Drug and Drug Target Info [Internet]. [cited 2021 May 26]. Available from: <https://go.drugbank.com/>
17. Home - Reactome Pathway Database [Internet]. [cited 2021 May 26]. Available from: <https://reactome.org/>
18. Mujović N, Dobrev D, Marinković M, Russo V, Potpara TS. The role of amiodarone in contemporary management of complex cardiac arrhythmias. *Pharmacol Res*. 2020;151.
19. FICHA TECNICA AMIODARONA AUROVITAS 200 MG COMPRIMIDOS EFG [Internet]. [cited 2021 May 17]. Available from: https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/81291/FT_81291.html
20. Waldhauser KM, Brecht K, Hebeisen S, Ha HR, Konrad D, Bur D, et al. Interaction with the hERG channel and cytotoxicity of amiodarone and amiodarone analogues. *Br J Pharmacol* [Internet]. 2008 Oct [cited 2021 May 26];155(4):585–95. Available from: </pmc/articles/PMC2579668/>
21. Drvota V, Häggblad J, Blange I, Magnusson Y, Sylvén S. The effect of amiodarone on the β -adrenergic receptor is due to a downregulation of receptor protein and not to a receptor-ligand interaction. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;255(2):515–20.
22. Cohen CJ, Spires S, Van Skiver D. Block of T-type Ca channels in guinea pig atrial cells by antiarrhythmic agents and Ca channel antagonists. *J Gen Physiol* [Internet]. 1992 Oct 1 [cited 2021 May 26];100(4):703–28. Available from: </pmc/articles/PMC2229105/?report=abstract>
23. Narayana SK, Woods DR, Boos CJ. Management of amiodarone-related thyroid problems. *Ther Adv Endocrinol Metab*. 2011;2(3):115–26.
24. Szalowska E, Van Der Burg B, Man HY, Hendriksen PJM, Peijnenburg AACM. Model steatogenic compounds (amiodarone, valproic acid, and tetracycline) alter lipid metabolism by different mechanisms in mouse liver slices. *PLoS One*. 2014;9(1).

25. Van Summeren A, Renes J, Bouwman FG, Noben J-P, Van Delft JHM, Kleinjans JCS, et al. Proteomics Investigations of Drug-Induced Hepatotoxicity in HepG2 Cells. *Toxicol Sci* [Internet]. 2011 [cited 2021 Jun 1];120(1):109–22. Available from: <https://academic.oup.com/toxsci/article/120/1/109/1666216>
26. Kiliñç N, Alim Z, Şengül B, İşgör MM. Araştırma Makalesi / Research Article Evaluation of Inhibition Effects of Some Cardiovascular Therapeutics on Human Erythrocyte Carbonic Anhydrase Isoenzymes İnsan Eritrosit Karbonik Anhidraz İzoenzimleri Üzerine Bazı Kardiyovasküler Terapötiklerin İnhibi. 2018;7(1):90–7.
27. Monroy LE, Vargas MPS. Anhidrasa carbónica, nuevas perspectivas. *Rev del Inst Nac Enfermedades Respir*. 2010;69(4):200–9.
28. Colby R, Geyer H. Amiodarone-induced pulmonary toxicity. *J Am Acad Physician Assist*. 2017;30(11):23–6.
29. BPIFA1 - BPI fold-containing family A member 1 precursor - Homo sapiens (Human) - BPIFA1 gene & protein [Internet]. [cited 2021 May 17]. Available from: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q9NP55>
30. SFTPD - Pulmonary surfactant-associated protein D precursor - Homo sapiens (Human) - SFTPD gene & protein [Internet]. [cited 2021 May 17]. Available from: <https://www.uniprot.org/uniprot/P35247>
31. Ha HR, Bigler L, Binder M, Kozlik P, Stieger B, Hesse M, et al. Metabolism of amiodarone (part I): identification of a new hydroxylated metabolite of amiodarone. *Drug Metab Dispos* [Internet]. 2001 Feb;29(2):152–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11159805>
32. Golli-Bennour E El, Bouslimi A, Zouaoui O, Nouria S, Achour A, Bacha H. Cytotoxicity effects of amiodarone on cultured cells. *Exp Toxicol Pathol* [Internet]. 2012;64(5):425–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.etp.2010.10.008>
33. Wegele H, Müller L, Buchner J. Hsp70 and Hsp90--a relay team for protein folding. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 2004;151(January):1–44.