



Búsqueda de Nutraceuticos Para el Tratamiento de la Esclerosis Múltiple

María Pilar Lafuente Hernández

Master universitario en Bioinformática y Bioestadística

Bioinformática farmacéutica

Nombre Consultor/a

Melchor Sánchez Martínez

Nombre Profesor/a responsable de la asignatura

María Jesús Marco Galindo

01 Enero 2018



Esta obra está sujeta a una
licencia de Reconocimiento-
NoComercial-SinObraDerivada
[3.0 España de Creative Commons](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es/)

FICHA DEL TRABAJO FINAL

Título del trabajo:	<i>Búsqueda de nutraceuticos para el tratamiento de la esclerosis múltiple</i>
Nombre del autor:	<i>María Pilar Lafuente Hernández</i>
Nombre del consultor/a:	<i>Melchor Sánchez Martínez</i>
Nombre del PRA:	<i>María Jesús Marco Galindo</i>
Fecha de entrega (mm/aaaa):	<i>01/2018</i>
Titulación:	<i>Máster universitario en Bioinformática y Bioestadística</i>
Área del Trabajo Final:	<i>Bioinformática farmacéutica</i>
Idioma del trabajo:	<i>Español</i>
Palabras clave	<i>Multiple sclerosis, nutraceuticals, chemoinformatics</i>
Resumen del Trabajo (máximo 250 palabras):	
<p>La esclerosis múltiple EM (o mielopatía desmielinizante), es una enfermedad autoinmune en la que el propio sistema inmune ataca la vaina de mielina que recubre los axones de las neuronas. Como consecuencia, los pacientes de EM tienen dificultades psicomotrices y, en algunos casos, disminución de las capacidades cognitivas. Los tratamientos actuales no ofrecen una cura real y pueden conllevar importantes efectos secundarios. En varios estudios, se han propuesto nutraceuticos que podrían asistir en el tratamiento de la enfermedad sin comportar efectos secundarios graves. El objetivo de este trabajo consiste en encontrar moléculas y/o nutraceuticos para al tratamiento de la EM con mínimos efectos secundarios.</p> <p>Se han estudiado los procesos implicados en la EM y se han identificado dianas terapéuticas para nutraceuticos y medicamentos que se usan en el tratamiento de la EM. Un análisis de semejanza ha permitido encontrar moléculas similares a los nutraceuticos de interés. Tras evaluar sus propiedades ADMET, se han escogido aquellas con ciertas características como capacidad terapéutica, biodisponibilidad y accesibilidad sintética. Después de un análisis de agrupamiento (o <i>clustering</i>) por <i>k-medoides</i>, se han seleccionado diez moléculas representativas de cada grupo, con las que se ha efectuado un análisis de acoplamiento con los receptores de lo nutraceuticos de referencia. Adicionalmente, se han identificado todos los nutraceuticos registrados en la base de datos <i>DrugBank</i> y con ellos se ha realizado un análisis de acoplamiento tanto con las dianas terapéuticas de los nutraceuticos originales como de los medicamentos usados en el tratamiento de la EM. Finalmente, se han comparado las energías de acoplamiento obtenidas con las de los nutraceuticos y medicamentos de referencia.</p> <p>Como resultado, se han encontrado moléculas y nutraceuticos con posible actividad terapéutica en la esclerosis múltiple.</p>	

Abstract (in English, 250 words or less):

Multiple sclerosis MS (or demyelinating myelopathy) is an autoimmune disease in which the immune system attacks the myelin sheath that insulates the axons of neurons. As a consequence, MS patients have psychomotor difficulties and, in some cases, diminished cognitive abilities. Current treatments do not offer a real cure and can have important side effects. Several studies have suggested that some nutraceuticals could assist in the treatment of the disease with minor side effects. The objective of this study is to find molecules and/or nutraceuticals for the treatment of MS that have minimal side effects.

In this research, we have analyzed the processes involved in MS and several therapeutic targets have been identified for both nutraceuticals and small molecule drugs that are used in the MS treatment. A similarity analysis performed on the nutraceuticals related to MS has resulted in a list of molecules alike to these nutraceuticals of interest. After calculating their ADMET properties, several molecules with the adequate characteristics of druggability, bioavailability and synthetic accessibility have been selected. A cluster analysis of k-medoids has generated ten groups per nutraceutical of reference. A representative molecule of each group has been selected to execute a docking study with the targets identified for the original nutraceuticals. Additionally, all the nutraceuticals registered in the *DrugBank* database have been identified and a docking analysis has been performed between all these nutraceuticals and the therapeutic targets of both nutraceuticals of reference and drugs used in the treatment of MS. The coupling energies calculated have been compared with those of the original nutraceuticals or drugs.

As a result, several molecules and nutraceuticals have been found with a possible therapeutics activity on multiple sclerosis.

Índice

1	Introducción	1
1.1.	Contexto y justificación del Trabajo	1
1.2.	Objetivos del Trabajo	2
1.3.	Enfoque y método seguido	3
1.4.	Planificación del Trabajo	3
1.5.	Breve resumen de productos obtenidos	7
1.6.	Breve descripción de los otros capítulos de la memoria	7
2	Enfermedades autoinmunes y esclerosis múltiple	8
2.1.	Enfermedades autoinmunes	8
2.2.	Esclerosis Múltiple	10
2.2.1	Causas	12
2.2.2	Lesiones	12
2.2.3	Mecanismos	13
2.2.4	Tratamiento	18
3	Dianas terapéuticas y tratamientos existentes en la esclerosis múltiple	21
3.1.	Nutracéuticos	21
3.2.	Tratamientos y dianas terapéuticas	23
4	Identificación y análisis de moléculas similares a los nutraceuticos en el tratamiento de la esclerosis múltiple	26
4.1.	Actividades realizadas	26
4.2.	Cribado basado en el ligando (<i>ligand-based screening</i>)	28
4.2.1	Análisis de semejanza	28
4.2.2	Análisis propiedades ADMET	28
4.2.3	Selección	29
4.3.	Análisis interacción ligando-proteína	29
5	Cribado basado en el ligando (<i>ligand-based screening</i>)	31
5.1.	Receptor Vitamina D (VDR)	31
5.1.1	Evaluación del acoplamiento con el ligando cristalográfico	31
5.1.2	Acoplamiento ligando - diana terapéutica	32
5.1.3	Acoplamiento nutraceutico – diana terapéutica	33
5.2.	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma (PPARG)	34
5.2.1	Evaluación del acoplamiento con el ligando cristalográfico	34
5.2.2	Acoplamiento ligando - diana terapéutica	35
5.2.3	Acoplamiento nutraceutico – diana terapéutica	36
5.3.	Carbonyl reductase [NADPH] 1 (CBR1)	37
5.3.1	Evaluación del acoplamiento (<i>docking</i>) con el ligando cristalográfico	37
5.3.2	Acoplamiento ligando - diana terapéutica	39
5.3.3	Acoplamiento nutraceutico – diana terapéutica	40
5.4.	Glutathione S-transferase P (GSTP1) - Glutati6n	40
5.4.1	Evaluación del acoplamiento (<i>docking</i>) con el ligando cristalográfico	40
5.4.2	Acoplamiento ligando - diana terapéutica	42
5.4.3	Acoplamiento nutraceutico – diana terapéutica	43
5.5.	Pyruvate carboxylase (PC)	43
5.5.1	Evaluación del acoplamiento (<i>docking</i>) con el ligando cristalográfico	44
5.5.2	Acoplamiento ligando - diana terapéutica	45

5.5.3	Acoplamiento nutracéutico – diana terapéutica	45
6	Evaluación basada en el receptor (<i>receptor-based screening</i>)	47
6.1.	Apoptosis regulator Bcl-2 (BCL2)	47
6.2.	Sphingosine 1-phosphate receptor 1 (S1PR1)	48
6.3.	Tumor necrosis factor (TNF)	50
6.4.	Interferon gamma (IFNG)	51
7	Conclusiones.....	52
8	Glosario	54
9	Bibliografía	55
10	Anexos.....	59

Lista de figuras

Figura 1 Diagrama de Gantt de las tareas desarrolladas durante el trabajo de investigación.....	6
Figura 2 Órganos y tejidos afectados por enfermedades autoinmunes ²⁸	8
Figura 3 Mecanismos de tolerancia central y periférica ²⁸	9
Figura 4 Manifestaciones de la esclerosis múltiple.....	11
Figura 5 Mecanismo implicados en la esclerosis múltiple y estrategias terapéuticas asociadas ³⁷	19
Figura 6 Protocolo que se ha seguido para la búsqueda de nutraceuticos con posible efecto terapéutico en esclerosis múltiple.	27
Figura 7 Flujo de trabajo en <i>KNIME</i> utilizado para el filtrado, agrupación y obtención de ficheros de los ligandos a estudiar.	29
Figura 8 Interacciones proteína (1DB1) – ligando (calcitriol) identificadas con PLIP.....	31
Figura 9 Interacciones proteína (PPAR) – ligando (DHA) identificadas con PLIP.....	34
Figura 10 Interacciones proteína (CBR1; 3BH1) – ligando (NADP) identificadas con PLIP.....	38
Figura 11 Interacciones (a) proteína (GSTP1) – ligando (glutati3n) (b) prote3na (GSTP1) – ligando (MES) identificadas con PLIP.....	40
Figura 12 Interacciones (a) prote3na (PC) – ligando (biotina) y (b) prote3na (PC) – ligando (3cido pir3vico) identificadas con PLIP.....	44
Figura 13 Acoplamiento BLC2 – MCI-186.....	47
Figura 14 Acoplamiento S1PR1 – Fingolimod.	49
Figura 15 Acoplamiento TNF – Celastrol.	50
Figura 16 Acoplamiento IFNG – 3cido fum3rico.....	51

Lista de tablas

Tabla 1 Tareas y recursos planificados para llevar a cabo la investigación.....	4
Tabla 2 Tabla de medicamentos asociados a los mecanismos implicados en la esclerosis múltiple de los tratamientos que existen ³⁸⁻⁴²	19
Tabla 3 Nutracéuticos encontrados en <i>DrugBank</i> que se asocian al tratamiento de esclerosis múltiple y el número de publicaciones existentes en <i>PubMed</i> que relacionan cada nutracéutico con la enfermedad.	21
Tabla 4 Receptores de nutracéuticos asociados a la esclerosis múltiple. Se indica el nombre del receptor, la entrada correspondiente en <i>UniProt</i> y en <i>PDB</i> , el gen asociado, el nutracéutico que interacciona y si ha sido seleccionado para un análisis de acoplamiento y el motivo.	22
Tabla 5 Dianas terapéuticas de algunos de los nutracéuticos que tienen algún tipo de efecto en el tratamiento de la esclerosis múltiple (<i>SwissTargetPrediction</i> ²¹ , <i>DrugBank</i> ^{14,44-46}).	23
Tabla 6 Información sobre medicamento y las dianas terapéuticas sobre las que actúan encontradas en <i>Therapeutic Target Database</i>	23
Tabla 7 Receptores de medicamentos aprobados para el tratamiento de la esclerosis múltiple. Se indica el nombre del receptor, los códigos en <i>UniProt</i> y en <i>PDB</i> , el gen y el medicamento asociados y si ha sido seleccionado para un análisis de acoplamiento y el motivo.	24
Tabla 8 Receptores asociados a medicamentos aprobados o en vías de investigación para el tratamiento de la esclerosis múltiple (<i>Therapeutic Target Database</i>).	25
Tabla 9 Resultados análisis de semejanza realizados con <i>SwissSimilarity</i> en las librerías “ <i>Approved</i> ”, “ <i>Experimental</i> ”, “ <i>Investigational</i> ”, “ <i>Nutraceuticals</i> ” y “ <i>ZINC-DrugLike</i> ” con valor de semejanza (<i>similarity score</i>) $\geq 0,1$	28
Tabla 10 Receptores asociados a nutracéuticos con efecto en el tratamiento de la esclerosis múltiple. Los nutracéuticos asociados a cada receptor son aquellos cuyas celdas no están sombreadas. ...	31
Tabla 11 Interacciones hidrofóbicas entre 1DB1 y calcitriol.	32
Tabla 12 Puentes de hidrógeno entre 1DB1 y calcitriol.	32
Tabla 13 Energía de acoplamiento ligando-proteína para el receptor VDR con moléculas similares a la cúrcuma.	33
Tabla 14 Energía de acoplamiento ligando-proteína para el receptor VDR con moléculas similares a la vitamina D3.	33
Tabla 15 Nutracéuticos con menor energía de acoplamiento ligando-proteína para el receptor VDR.	34
Tabla 16 Interacciones hidrofóbicas entre PPARG y DHA.	35
Tabla 17 Puentes de hidrógeno entre PPARG y DHA.	35
Tabla 18 Puentes salinos entre PPARG y DHA.	35
Tabla 19 Energía de acoplamiento ligando-proteína para el receptor PPARG con moléculas similares a la cúrcuma.	36
Tabla 20 Energía de acoplamiento ligando-proteína para el receptor PPARG con moléculas similares a DHA.	36
Tabla 21 Nutracéuticos con menor energía de acoplamiento ligando-proteína para el receptor PPARG.	36
Tabla 22 Interacciones hidrofóbicas entre CBR1 y NADP.	38
Tabla 23 Puentes de hidrogeno entre CBR1 y NADP.	38
Tabla 24 Puentes de agua entre CBR1 y NADP.	39
Tabla 25 Puentes salinos entre CBR1 y NADP.	39
Tabla 26 Ligandos con menor energía de acoplamiento ligando-proteína para el receptor CBR1.	39
Tabla 27 Nutracéuticos con menor energía de acoplamiento ligando-proteína para el receptor CBR1.	40
Tabla 28 Interacciones hidrofóbicas entre GSTP y glutatión.	41
Tabla 29 Puentes de hidrogeno entre GSTP y glutatión.	41
Tabla 30 Puentes de agua entre GSTP y glutatión.	41
Tabla 31 Interacción $\pi - \pi$ entre GSTP y glutatión.	41
Tabla 32 Puentes salino entre GSTP y glutatión.	42
Tabla 33 Puente de agua entre GSTP y MES.	42
Tabla 34 Puentes salino entre GSTP y MES.	42

Tabla 35 Ligandos con menor energía de acoplamiento ligando-proteína para el receptor GSTP1 con moléculas similares a la cúrcuma.....	42
Tabla 36 Nutracéuticos con menor energía de acoplamiento ligando-proteína para el receptor GSTP1.	43
Tabla 37 Interacciones hidrofóbicas entre PC y biotina.	44
Tabla 38 Puentes de hidrógeno entre PC y biotina.	44
Tabla 39 Interacciones hidrofóbicas entre PC y ácido pirúvico.	44
Tabla 40 Puentes de hidrógeno entre PC y ácido pirúvico.	45
Tabla 41 Puentes salinos entre PC y ácido pirúvico.	45
Tabla 42 Ligandos con menor energía de acoplamiento ligando-proteína para el receptor PC con moléculas similares a la biotina.	45
Tabla 43 Nutracéuticos con menor energía de acoplamiento ligando-proteína para el receptor PC. ...	46
Tabla 44 Nutracéuticos con menor energía de acoplamiento ligando-proteína para el receptor BCL2. 48	
Tabla 45 Nutracéuticos con menor energía de acoplamiento ligando-proteína para el receptor S1PR1.	49
Tabla 46 Nutracéuticos con menor energía de acoplamiento ligando-proteína para el receptor TNF. .50	
Tabla 47 Nutracéuticos con menor energía de acoplamiento ligando-proteína para el receptor IFNG. 51	

1 Introducción

1.1. Contexto y justificación del Trabajo

El sistema inmunitario es un conjunto de estructuras biológicas y procesos que defienden el cuerpo de posibles daños externos (virus, bacterias, etc.) o internos (cáncer). Este sistema se encuentra en un constante equilibrio entre los procesos que originan los ataques a las estructuras consideradas dañinas y los procesos de control que establecen que estructuras son perjudiciales y cuáles no. Cuando este equilibrio se rompe, el sistema inmunitario puede llegar a atacar las propias células o tejidos, dando lugar a las enfermedades autoinmunes. En la actualidad se han identificado entre 80-100 enfermedades autoinmunes [entre ellas, la enfermedad celíaca, la diabetes tipo 1, la sarcoidosis, el lupus eritematoso sistémico (LES), el síndrome de Sjögren, la tiroiditis de Hashimoto, la enfermedad de Graves, la púrpura trombocitopénica inmune o idiopática (PTI), la enfermedad de Addison, la artritis reumatoide, la espondilitis anquilosante, la psoriasis y la esclerosis múltiple] y se estima que entre el 8%-16% de la población sufre algún tipo de condición autoinmune, la mayoría mujeres, las cuales se considera que constituyen un 75% de los afectados^{1,2,3}.

Las enfermedades autoinmunes conllevan la degeneración o destrucción de las células que está siendo atacado por el sistema inmune y un estado de inflamación crónica en los pacientes.

En el caso de la esclerosis múltiple EM (o mielopatía desmielinizante), se cree que el sistema inmune ataca la vaina de mielina que recubre los axones de las neuronas. La mielina permite la transmisión de los impulsos nerviosos, por lo que la desmielinización conlleva la disminución de la transmisión neuronal. Como consecuencia, los pacientes de EM tienen dificultades para coordinar el movimiento muscular y mantener el equilibrio, pueden perder la capacidad de andar y/o de permanecer en pie y en los peores casos, la EM puede producir parálisis parcial o total. Otros problemas asociados a la EM son la pérdida de audición, pérdida de visión, mareos y temblores. La mitad de los pacientes pueden sufrir disminución de las capacidades cognitivas como la dificultad de concentración y la pérdida de memoria⁴.

La mayoría de medicamentos que existen actualmente para el tratamiento de la esclerosis múltiple son interferones- β , inmunosupresores y anticuerpos monoclonales³. Estos medicamentos no ofrecen una cura y pueden conllevar importantes contraindicaciones que a la larga pueden tener efectos secundarios devastadores. Actualmente existen más de 400 estudios clínicos activos para el estudio y tratamiento de la esclerosis múltiple⁵.

En varios estudios, se ha postulado que en el origen y/o posible tratamiento de las enfermedades autoinmunes puede existir una relación entre la microbiota, ciertos nutrientes, el metabolismo y el sistema inmune^{6,7,8}. En el caso de la esclerosis múltiple, diversos nutraceuticos se han propuesto como posibles tratamientos de la enfermedad^{9,10}, como la Vitamina D¹¹ o la cúrcuma¹². Por ello, los nutraceuticos, o moléculas similares a los nutraceuticos, podrían representar

una terapia adicional o alternativa para el tratamiento de la enfermedad, con efectos secundarios asociados más leves.

1.2. Objetivos del Trabajo

El objetivo de este trabajo es encontrar moléculas y/o nutraceuticos para el tratamiento de la esclerosis múltiple con efectos secundarios menos graves que los tratamientos actuales. Para ello, el trabajo se ha enfocado desde dos puntos de vista:

1. Por un lado, nos propusimos buscar moléculas con ciertas propiedades de absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad (ADMET) que fueran similares a los nutraceuticos que se utilizan en el tratamiento de enfermedades autoinmunes y estudiar sus acoplamientos con los receptores de los nutraceuticos originales.
2. Por otro lado, decidimos analizar los acoplamientos de todos los nutraceuticos encontrados en la base de datos *DrugBank* con las dianas terapéuticas tanto de nutraceuticos como de medicamentos utilizados en el tratamiento de la esclerosis múltiple.

Los objetivos detallados del estudio son:

1. Estudiar y entender por qué el sistema inmunitario deja de autorregularse y ataca tejidos propios. En concreto estudiar los **mecanismos** y las **dianas terapéuticas** implicados en la esclerosis múltiple buscando artículos relacionados en *PubMed*.
2. **Identificar nutraceuticos** que se conoce modulan el sistema inmune realizando una búsqueda bibliográfica en *PubMed* y en bases de datos como *DrugBank*.
3. Analizar si el/los nutraceutico(s) identificados actúan contra una **diana terapéutica** concreta de alguno de los mecanismos relacionados con la esclerosis múltiple.
4. Mediante un **análisis de semejanza** encontrar otras moléculas similares que podrían actuar contra la(s) diana(s) terapéutica(s) identificadas y examinar sus propiedades de absorción, distribución, metabolismo y excreción (**ADMET**).
5. Realizar una búsqueda en *DrugBank* de todos los nutraceuticos registrados.
6. **Analizar el acoplamiento** (*docking*) de las moléculas y nutraceuticos encontrados con las dianas terapéuticas identificadas.
7. Analizar las **energías de acoplamiento** de las nuevas moléculas y nutraceuticos encontrados y compararlas con las de los nutraceuticos y medicamentos originales.

1.3. Enfoque y método seguido

Existen diferentes estrategias para llevar a cabo estos objetivos. Se podrían analizar únicamente moléculas similares a los medicamentos utilizados actualmente en el tratamiento de la EM, escogiendo exclusivamente aquellas con toxicidad muy baja. Pero al ser moléculas similares a medicamentos actuales, se podría esperar que toxicológicamente fueran similares a las de las moléculas origen.

Por otro lado, podríamos limitarnos al estudio de nutraceuticos similares a los que existen actualmente para el tratamiento de enfermedades autoinmunes y/o esclerosis múltiple. Pero estos nutraceuticos no siempre son efectivos y en muchos casos únicamente se utilizan como terapia de soporte de otros tratamientos.

Por lo tanto, la metodología escogida para realizar la investigación ha consistido en enfocar el estudio desde dos puntos de vista:

1. Por un lado, buscar moléculas similares a nutraceuticos con efecto conocido en enfermedades autoinmunes y/o esclerosis múltiple, con propiedades ADME determinadas (biodisponibilidad, síntesis y viabilidad terapéutica).
2. Por otro lado, encontrar nutraceuticos que actúen contra receptores identificados en tratamientos convencionales (medicamentos basados en moléculas pequeñas) de la EM.

Se pretende de esta manera identificar moléculas efectivas en el tratamiento de la enfermedad con bajo nivel de toxicidad y efectos secundarios leves.

En concreto el método seguido ha sido:

- a) Estudiar los procesos en los que estas moléculas intervienen y analizar cómo modulan el sistema inmunitario.
- b) Identificar dianas terapéuticas (receptores) tanto de nutraceuticos como de medicamentos que se usan en el tratamiento de la esclerosis múltiple.
- c) Realizar un análisis de semejanza de los nutraceuticos usados en el tratamiento de enfermedades autoinmunes y/o esclerosis múltiple para encontrar moléculas similares que podrían actuar en los mismos receptores. Analizar las propiedades de absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADMET) de estas moléculas.
- d) Identificar todos los nutraceuticos registrados en la base de datos *DrugBank*.
- e) Realizar un análisis de acoplamiento (*docking*) de las moléculas y nutraceuticos identificados en los análisis previos con las dianas terapéuticas establecidas inicialmente.

1.4. Planificación del Trabajo

En la Tabla 1 se detallan las tareas que se habían planificado realizar para llevar a cabo esta investigación y los recursos utilizados en cada una de ellas. No se

ha incurrido en ningún gasto económico asociado a la ejecución de estas tareas ya que los recursos seleccionados son de libre acceso o ya se disponía de los programas para la redacción de la memoria (MS Word) y preparar la presentación (MS Powerpoint).

Tabla 1 Tareas y recursos planificados para llevar a cabo la investigación.

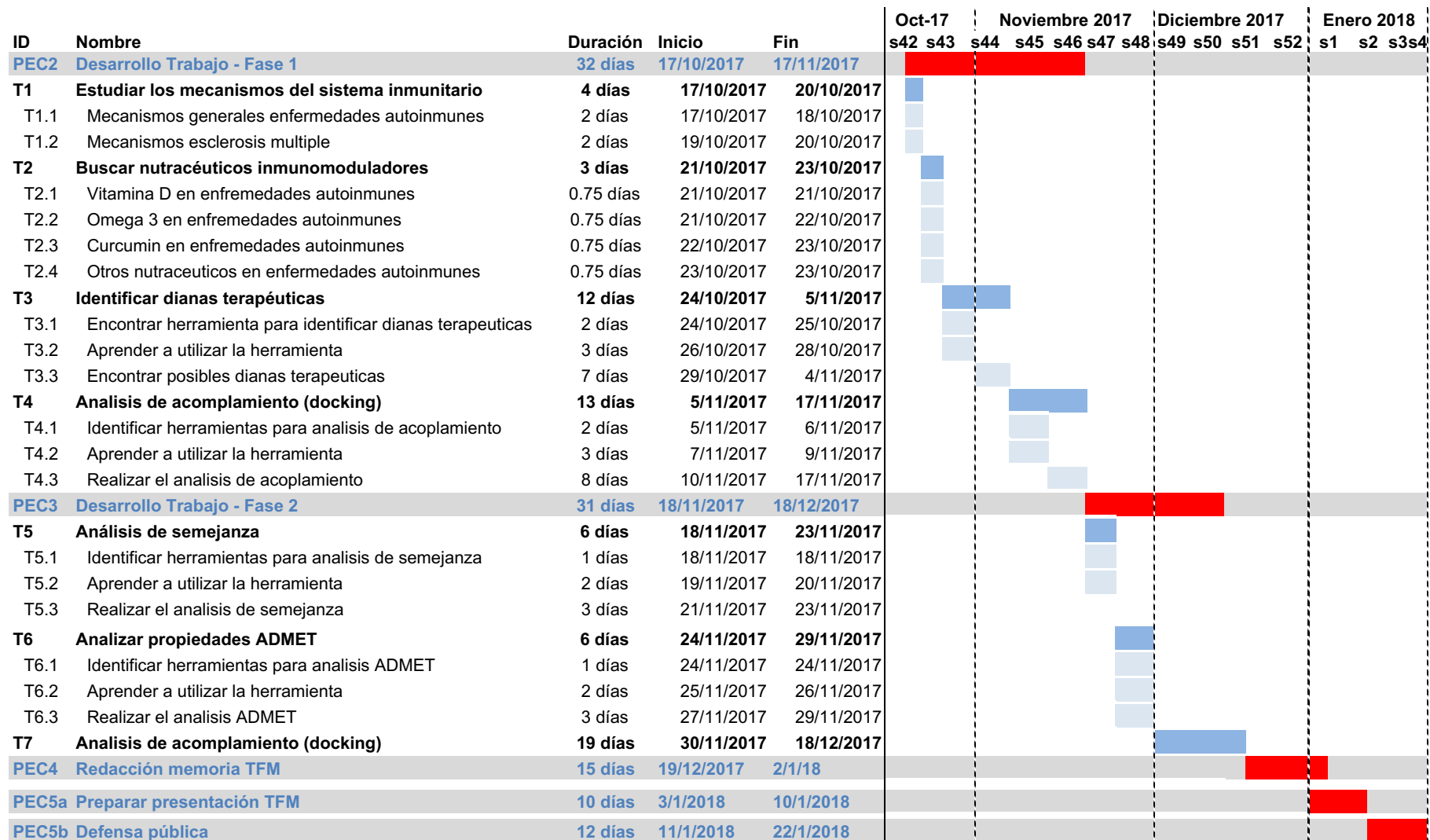
ID	Nombre	Recurso
T1	Estudiar los mecanismos del sistema inmunitario	
T1.1	Mecanismos generales enfermedades autoinmunes	<i>PubMed</i> ¹³
T1.2	Mecanismos esclerosis múltiple	
T2	Buscar nutraceuticos inmunomoduladores	
T2.1	Vitamina D en enfermedades autoinmunes	<i>PubMed</i> ¹³
T2.2	Omega 3 en enfermedades autoinmunes	<i>DrugBank</i> ¹⁴
T2.3	Cúrcuma en enfermedades autoinmunes	
T2.4	Otros nutraceuticos en enfermedades autoinmunes	
T3	Identificar dianas terapéuticas	
T3.1	Encontrar herramienta para identificar dianas terapéuticas	<i>TTD</i> ^{15,16}
T3.2	Aprender a utilizar la herramienta	<i>KEGG</i> ¹⁷⁻²⁰
T3.3	Encontrar posibles dianas terapéuticas	<i>SwissTarget</i> ²¹
T4	Análisis de acoplamiento (<i>docking</i>)	
T4.1	Identificar herramientas para análisis de acoplamiento	<i>Chimera</i> ²²
T4.2	Aprender a utilizar la herramienta	<i>AutoDock Vina</i> ²³
T4.3	Realizar el análisis de acoplamiento	
T5	Análisis de semejanza y acoplamiento	
T5.1	Identificar herramientas para análisis de semejanza	<i>SwissSimilarity</i> ²⁴
T5.2	Aprender a utilizar la herramienta	
T5.3	Realizar el análisis de semejanza	
T5.4	Realizar el análisis de acoplamiento nuevas moléculas	<i>AutoDock Vina</i> ²³
T6	Analizar propiedades ADMET	
T6.1	Identificar herramientas para análisis ADMET	<i>SwissADME</i> ²⁵
T6.2	Aprender a utilizar la herramienta	
T6.3	Realizar el análisis ADMET	
T7	Redacción memoria TFM	<i>MS Word</i>
T8	Preparar presentación TFM	<i>MS Powerpoint</i>
T9	Defensa pública TMF	-

No ha habido mayores desviaciones en la ejecución de las de las acciones realizadas. Han existido algunos desvíos respecto las acciones inicialmente planificadas (Tabla 1), que se indican a continuación juntamente con las acciones correctoras implementadas. En la Figura 1 se detalla el Diagrama de Gantt que se ha seguido finalmente, mostrando las tareas realizadas y los tiempos empleados.

- Los mecanismos involucrados en el sistema inmunitario son diversos y complejos (tarea T1), lo que complicó el objetivo de identificación de las dianas terapéuticas (tarea T3). Las búsquedas en *Therapeutic Target Database*^{15,16} (TTP) y en *KEGG*¹⁷⁻²⁰ dieron como resultado múltiples posibles dianas terapéuticas. Esto enlenteció ligeramente el desarrollo del proyecto, por lo que decidimos trabajar en paralelo y analizar el acoplamiento de las moléculas con las proteínas de interés a la vez que íbamos identificando las posibles dianas.

- El tiempo de cálculo empleado por *AutoDock Vina* para el cribado (*screening*) de los nutraceuticos a los receptores ha sido más largo de lo esperado. Pero a su vez, el análisis de semejanza y de las propiedades ADMET fueron más rápidos que los planificados inicialmente, por lo que se compensaron tiempos.
- Inicialmente se había planteado realizar el análisis de las propiedades ADMET (T6) tras el análisis de acoplamiento de las moléculas con los receptores (T5.4 en la Tabla 1). Finalmente se ha realizado el análisis ADMET previo al análisis de acoplamiento y se ha utilizado como criterio para escoger las moléculas de interés. Tras seleccionar los ligandos a estudiar, se ha realizado el análisis de acoplamiento.
- En un principio, se había propuesto analizar también el tipo de enlace (*binding mode*) de los receptores con las moléculas y nutraceuticos obtenidos como resultado del estudio y compararlo con el de las moléculas y nutraceuticos de referencia, para ver que el tipo de enlace se mantiene. Este último análisis no se pudo realizar por falta de tiempo y se propone como una posible continuación de este trabajo de investigación.

Figura 1 Diagrama de Gantt de las tareas desarrolladas durante el trabajo de investigación.



1.5. Breve resumen de productos obtenidos

Como resultado de la investigación, se han identificado nutraceuticos (vitamina D3, cúrcuma, biotina y omega 3) y medicamentos basados en moléculas sencillas (MCI-186, fingolimod, celastrol, ácido fumárico) que son utilizados en el tratamiento de la EM. Adicionalmente, se ha establecido las dianas terapéuticas contra las que actúan.

Tras un análisis de semejanza, se han encontrado moléculas similares a los nutraceuticos de referencia y se han seleccionado aquellas que tienen las propiedades ADMET deseadas. Paralelamente, se han identificado todos los nutraceuticos recogidos en la base de datos *DrugBank*.

El análisis de acoplamiento ha permitido descubrir diversas moléculas y nutraceuticos con energías de acoplamiento menores (valor absoluto mayor) o similares a los de los nutraceuticos y medicamentos de referencia.

1.6. Breve descripción de los otros capítulos de la memoria

La estructura de la memoria sigue el de los pasos realizados para llevar a cabo la investigación. En el **capítulo 2** se resume la información encontrada en *PubMed*¹³ sobre las enfermedades autoinmunes, en concreto la esclerosis múltiple, y los mecanismos implicados. En el **capítulo 3** se detallan los nutraceuticos asociados al tratamiento de esclerosis múltiple hallados en *DrugBank*¹⁴ y los receptores contra los que actúan descritos en *KEGG*¹⁷⁻²⁰. Asimismo, se identifican los medicamentos basados en moléculas sencillas que actúan contra las dianas terapéuticas relacionadas con la esclerosis múltiple, encontrados en *Therapeutic Target Database*^{15,16}. Ello nos permite identificar ligandos (moléculas) y receptores (dianas terapéuticas) para realizar el análisis de semejanza y de acoplamiento. En el **capítulo 4** se describe en análisis de semejanza realizado con *SwissSimilarity*²⁴ que permitió encontrar moléculas similares a los nutraceuticos identificados en el capítulo anterior. Asimismo, se detalla el análisis de las propiedades de absorción, distribución, metabolismo excreción y toxicidad (ADMET) llevado a cabo con *SwissADME*²⁵. Estas propiedades se han utilizado para seleccionar las moléculas que estudiaremos como posibles candidatas. Una vez identificadas las moléculas, se ha realizado el análisis de acoplamiento de las mismas con los receptores identificados en el capítulo 3. En el **capítulo 5** se detallan los resultados de dicho análisis realizado con *AutoDock Vina*²³ para el acoplamiento entre las moléculas candidatas y los receptores de los nutraceuticos. Asimismo, se ha estudiado el acoplamiento de los nutraceuticos registrados en la base de datos *DrugBank*¹⁴ y los mismos receptores. En el **capítulo 6** se analiza la interacción entre nutraceuticos registrados en la base de datos *DrugBank*¹⁴ y los receptores de medicamentos identificados con *TTP*. Las conclusiones de esta investigación se detallan en el **capítulo 7**.

Tal y como se ha mencionado previamente, no se incluye valoración económica en la descripción de las tareas realizadas porque no se ha incurrido en ningún gasto económico.

2 Enfermedades autoinmunes y esclerosis múltiple

2.1. Enfermedades autoinmunes

Las enfermedades autoinmunes se caracterizan por que el sistema inmune (anticuerpos o células T) ataca tejidos y órganos del propio cuerpo humano y se clasifican como^{26,27}: **específicas de un órgano** (cuando el antígeno y el tejido afectado están localizados en un órgano y el sistema inmunitario ataca un órgano en concreto) o **sistémicas** (cuando el antígeno está expresado ampliamente por todo el cuerpo y el sistema inmunitario ataca varios órganos).

Existen enfermedades o condiciones autoinmunes para casi todo los órganos y tejidos del cuerpo humano, tal y como se puede observar en la **Figura 2**.

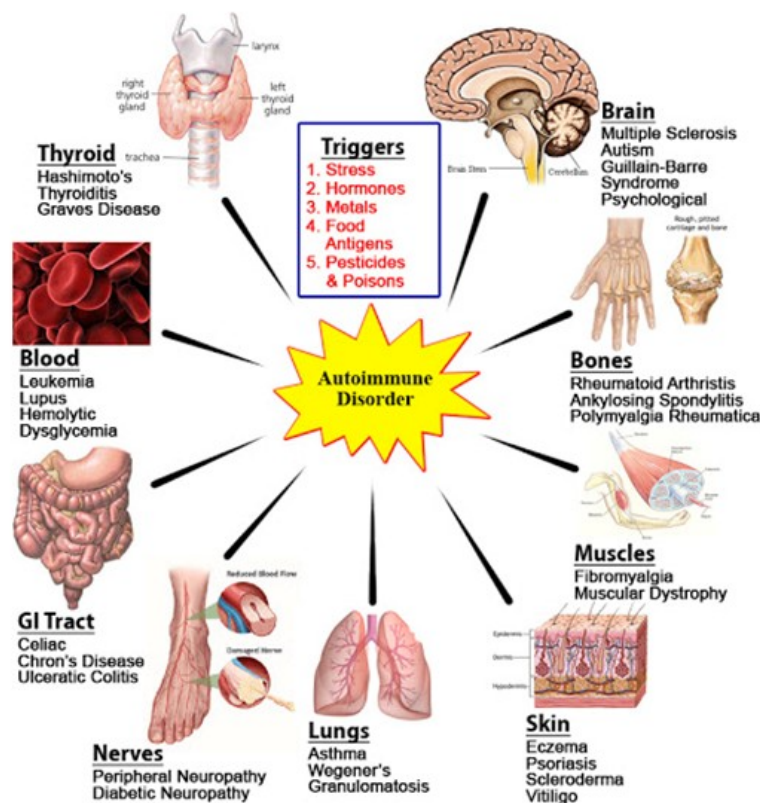


Figura 2 Órganos y tejidos afectados por enfermedades autoinmunes²⁸.

Las enfermedades autoinmunes aparecen cuando los mecanismos de regulación del sistema inmune dejan de funcionar correctamente. La existencia de autoreactividad hacia autoantígenos a un nivel bajo es necesaria para una respuesta inmune normal²⁶, para que esta sea patológica y origine una enfermedad autoinmune, es necesario que la respuesta autoinmune sea fuerte.

Existen principalmente dos mecanismos de control del sistema inmunitario para limitar el ataque a autoantígenos^{26,29,30} (Figura 3²⁸):

1. **Tolerancia central:** Los autoantígenos son reconocidos a nivel de timo. En el timo se expresan el máximo de autoantígenos del cuerpo humano para inducir la tolerancia. Aquellas células T que reconocen autoantígenos mueren por apoptosis y se denomina deleción clonal. Aun así, existen células T que interaccionan débilmente con los autoantígenos y no son destruidas. También, existen epítomos que no se presentan como antígenos en el timo (llamados epítomos crípticos) ante los cuales no se crea tolerancia central y las células T que los reconocen migran hacia los órganos periféricos.
2. **Tolerancia periférica:** Se da en tejidos linfáticos periféricos. Existen varios mecanismos. Cuando la interacción entre el estímulo del autoantígeno es muy fuerte la muerte celular se induce por apoptosis (deleción clonal). Cuando el estímulo el reconocimiento del antígeno peptídico asociado al complejo mayor de histocompatibilidad (CMH, en ingles MHC) presentadas por las células presentadoras de antígeno (CPA) no está acompañado por el reconocimiento de moléculas coestimuladoras como B7 (también presentadas por las CPA) mediante el receptor CD28 de las células T se produce la inactivación funcional prolongada o irreversible de los linfocitos (anergia clonal). El tercer mecanismo sería por el efecto de las células T supresoras o reguladoras (Treg) que tienen la capacidad de regular negativamente las respuestas inmunitarias por procesos moleculares poco caracterizados mediante IL-10 y TGF- β .

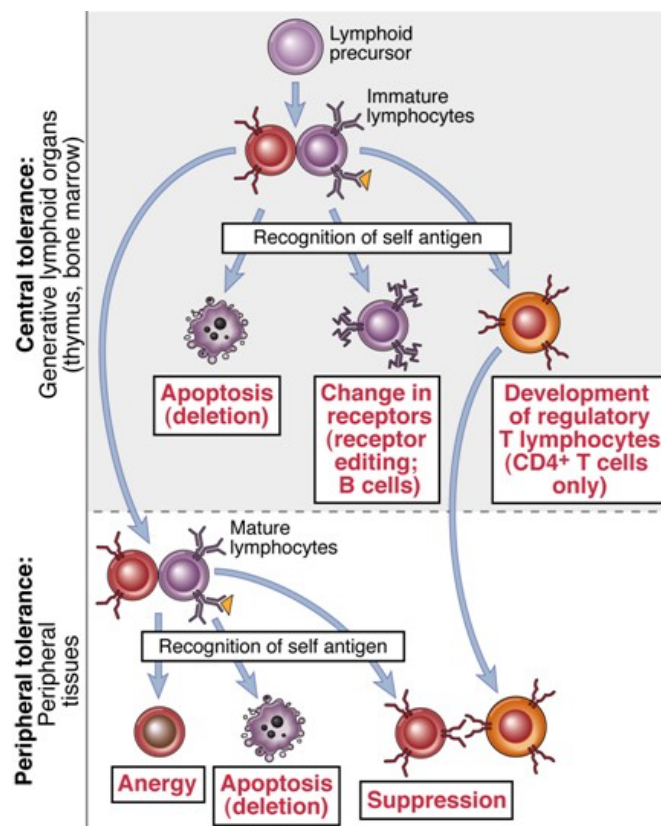


Figura 3 Mecanismos de tolerancia central y periférica²⁸.

En general, se cree la autoinmunidad se origina por el desarrollo o activación de linfocitos T colaboradores CD4+ (T_h)^{26,27,29,30}. Las posibles causas que originan dicho desarrollo o activación se desconocen en gran medida y pueden ser una o varias que se den al mismo tiempo. Entre las que se han descrito están la existencia de moléculas víricas o bacteriológicas que sean similares a moléculas propias del organismo (*molecular mimicry*), el estrés, desequilibrio hormonal, presencia de metales o sustancias tóxicas, deficiencia de alguna sustancia que ayude a mantener el sistema inmune y predisposición genética, o la combinación de varios de estos factores.

El inicio de un reconocimiento autoinmune puede ser un evento aislado que no desemboque en enfermedad. Para que la enfermedad sea patológica debe todos los mecanismos de control existentes. La presencia de células T CD4+ parece ser un requerimiento necesario para que se desarrolle la enfermedad autoinmune.

2.2. Esclerosis Múltiple

La esclerosis múltiple EM (o mielopatía desmielinizante) se define como una enfermedad desmielinizante inflamatoria del sistema central nervioso (SCN) que afecta al cerebro y la médula espinal. Se caracteriza por la presencia de lesiones desmielinizantes, neurodegenerativas y crónicas del sistema nervioso central. Se cree que el sistema inmune ataca la vaina de mielina que recubre los axones de las neuronas. La mielina permite la transmisión de los impulsos nerviosos, por lo que la desmielinización conlleva la disminución de la transmisión neuronal. Como consecuencia, los pacientes de EM tienen dificultades para coordinar el movimiento muscular y mantener el equilibrio, pueden perder la capacidad de andar y/o de permanecer en pie y en los peores casos, la EM puede producir parálisis parcial o total. Otros problemas asociados a la EM son la pérdida de audición, pérdida de visión, mareos y temblores. La mitad de los pacientes pueden sufrir disminución de las capacidades cognitivas como la dificultad de concentración y la pérdida de memoria⁴.

Se describen cuatro tipos de esclerosis múltiple según el curso clínico^{29,31} (Tabla 4):

- **RRMS** (*Relapsing Remitent Multiple Sclerosis*): Brotes episódicos que ocurren esporádicamente con recuperación parcial o total.
- **SPMS** (*Secondary Progressive Multiple Sclerosis*): Acumulación de lesiones neurodegenerativas sin recuperación.
- **PPMS** (*Primary Progressive Multiple Sclerosis*): Curso progresivo de la enfermedad desde el inicio de la misma.
- **PRMS** (*Progressive Relapse Multiple Sclerosis*): Curso progresivo de la enfermedad con recaídas ocasionales.

También existe una manifestación considerada benigna, en la que los pacientes sufren ataques con recuperación completa (síndrome clínico aislado, SCA).

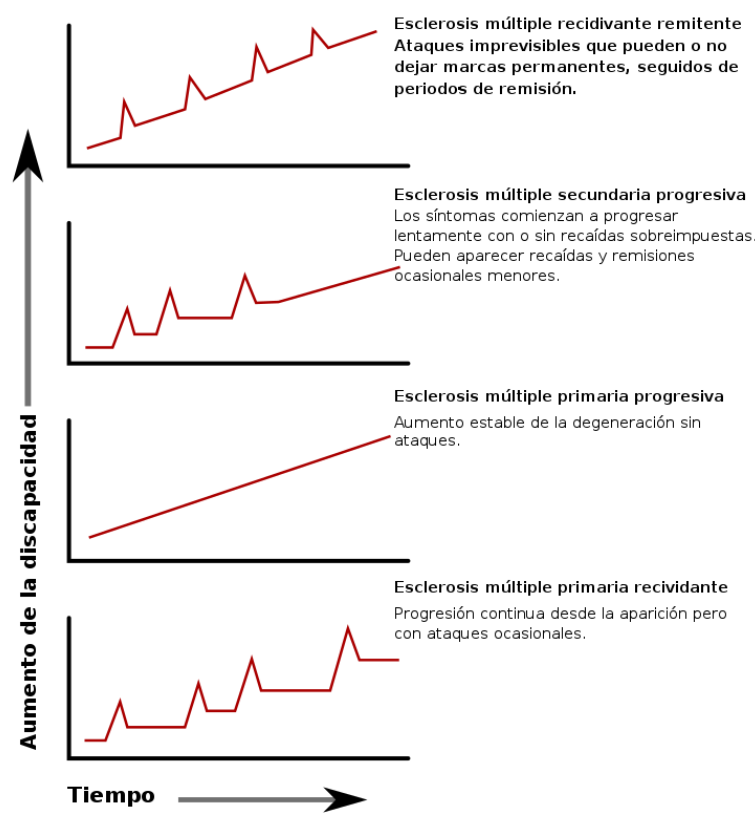


Figura 4 Manifestaciones de la esclerosis múltiple.

Tipo de células que intervienen en la EM²⁹:

- **Células T colaboradoras, Th:** Traspasa la barrera hematoencefálica y entran en el SCN. Esenciales para el inicio, propagación y regulación de la inmunidad en el SCN.
- **Linfocitos citotóxicos T (CTL, cytotoxic T lymphocyte):** Entran en el SNC y tienen un papel destructivo y regulador.
- **Células B/células plasmáticas:** Generan anticuerpos contra los oligodendrocitos. Pueden ser patogénicos y reguladores en la autoinmunidad del SNC.
- **Células NK/NKT:** tienen un papel regulador.
- **Neutrófilos:** Células efectoras de la destrucción tejido.
- **Células presentadoras de antígeno (CPA, o Antigen Presenting Cell APC).**
- **Macrófagos/monocitos:** Candidatos de células presentadoras de antígeno (CPA) en el SCN. Implicados en el daño tisular y reparación.
- **Microglía:** Macrófagos del SNC que son CPA semi-profesionales. Liberan osteopontín, IL-23 y IFN γ y regulan la inflamación. Activadas pueden convertirse en macrófagos o en células dendríticas.
- **Astrocito:** Función inmunoreguladora.
- **Células endoteliales y pericitos:** Constituyentes de la barrera hematoencefálica.
- **Oligodendrocitos (ODC):** Se encuentran en la pared de la BBB y son blanco del ataque autoinmune.

- **Neuronas:** Son el blanco del ataque autoinmune y tienen un posible papel inmunoregulador.

Moléculas implicadas en la EM:

- Citocinas (o citoquinas).
- Osteopontín.
- Interleucinas: IL-17, IL-23.
- IFN γ .
- TNF.

2.2.1 Causas

Las causas que provocan la aparición de la EM son desconocidas. Existen diferentes desencadenantes que se postulan como posibles originadores de la enfermedad en persona genéticamente predispuestas (no es una enfermedad hereditaria, pero existe una predisposición genética a que la enfermedad se manifieste). Entre dichas causas se encuentran: enfermedades infecciosas (por ejemplo, el virus Epstein-Barr, EBV, por mimetismo molecular), vacunas (por virus atenuados o adyuvantes), componentes dietéticos (como la carencia de vitamina D, la presencia de gluten, proteínas de la leche, entre otros^{9,32}), toxinas, baja exposición a la luz solar y fumar.

La EM presenta rasgos de autoinmunidad y los procesos redox están altamente implicados en la enfermedad²⁹.

2.2.2 Lesiones.

Se identifican cuatro tipos de lesiones³³:

- **Patrón I:** Presenta células T y macrófagos alrededor de los vasos capilares. Los oligodendrocitos (ODC) están intactos y no hay signos de activación del sistema inmune complementario (anticuerpos).
- **Patrón II:** Presenta células T y macrófagos alrededor de los vasos capilares. Los oligodendrocitos (ODC) se preservan, pero hay signos de activación del sistema inmune complementario.
- **Patrón III:** Las lesiones son difusas y con signos de inflamación. Los ODC están dañados (oligodendroglíopatía distal). Existe activación de la microglía y pérdida de la proteína MAG (*myelin associated glycoprotein*). Las lesiones no rodean los vasos capilares y hay un anillo de mielina intacta alrededor de ellos. También aparece una remielinización parcial y apoptosis de oligodendrocitos.
- **Patrón IV:** La lesión presenta bordes abruptos y oligodendrocitos degenerados, con un anillo de mielina. Ausencia de oligodendrocitos en el centro de la lesión. No está activado el sistema inmune complementario ni hay pérdida de MAG.

Se considera que las lesiones de patrones I y II están relacionados con el ataque inmune a la mielina y las lesiones de patrones III y IV están relacionadas con el ataque a los oligodendrocitos (ODC).

Parece ser que las lesiones Patrón III son las primeras en desarrollarse y se localizan cerca de las venas o vénulas, se caracterizan por la muerte de ODC que precede a la demielinización y muestran una elevada expresión de enzimas redox. Las lesiones Patrón IV están relacionadas con el proceso degenerativo y menos con la inflamación, se encuentran en la materia blanca de pacientes con PPMS. Las lesiones Patrón II están asociadas completamente a la desmielinización. Parece ser que las lesiones tipo III y IV son las que aparecen en estado inicial de lesión, mientras que las lesiones tipo I y II aparecen en los estados progresivos y finales de la lesión.

2.2.3 Mecanismos.

El sistema nervioso central (SNC) es uno de los sistemas del organismo que presenta privilegio inmune debido a la presencia de la barrera hematoencefálica (*blood-brain barrier*, BBB). Esto implica que el efecto del sistema inmune es limitado. A pesar de dichas restricciones, existen células del sistema inmune dentro del SNC como macrófagos, llamados microglía, y existe interacción del SNC con células periféricas inmunes³⁴. La capacidad del SNC de presentar antígenos a los nodos linfáticos locales y provocar la activación de las células T es limitada. Por lo tanto, en caso de que así sea, se cree que es por drenaje de antígenos del SNC a los nodos linfáticos o por ruptura o desintegración de la barrera hematoencefálica²⁹.

2.2.3.1 Inicio.

La enfermedad tiene diferentes fases^{29,32}. Se cree que, al inicio de la enfermedad, antes de la desmielinización, se produce la muerte de ODC. Posteriormente, se produce degradación de mielina mediante macrófagos, la ruptura de la barrera hematoencefálica y la inflamación³⁵. Es, por tanto, posible que el inicio de las lesiones sea independiente de las células inmunes³⁶.

Un evento o combinación de varios provoca el inicio de la enfermedad. Las lesiones iniciales se observan alrededor de las venas y se cree que anomalías del flujo cerebral en el tejido del SNC originan cambios vascular y obstrucción de la circulación al inicio de EM. La tensión en la circulación produce un incremento en agentes oxidantes como óxido nítrico (NO) y peróxido de hidrogeno (H₂O₂), que son capaces de cruzar la barrera hematoencefálica. Estas dos moléculas afectan los astrocitos dispuestos alrededor de las venas mediante procesos de estrés nitrosativos y oxidativos (la producción de ROS y RNS se observan en lesiones de EM, en astrocitos, macrófagos y células endoteliales).

NO provoca la inhibición de la cadena de transporte de electrones en mitocondrias, incrementando la producción de $\cdot\text{O}_2^-$ en astrocitos. $\cdot\text{O}_2^-$ es precursor de H₂O₂ que puede entrar en el citosol atravesando la pared mitocondrial y activar el factor nuclear kappa B (NF- κ B) en astrocitos.

NO reacciona con $\cdot\text{O}_2^-$ produciendo ONOO^- , que puede descomponerse en los radicales libres $\cdot\text{OH}$ y $\cdot\text{NO}_2$, muy peligrosos.

ONOO^- produce la activación de poli (ADN-ribosa) polimerasa (PARP). PARP cataliza la ruptura NAD^+ , lo que provoca el incremento de la ratio NADH/NAD^+ , que actúa como estímulo para la producción de $\cdot\text{O}_2^-$ en mitocondrias. La inhibición de PARP (con, por ejemplo, PJ-34) previene la muerte de ODC.

Los astrocitos y macrófagos son el centro de estrés oxidativo/nitrosativo en las lesiones tempranas y son los responsables del daño oxidativo/nitrosativo en ODC y neuronas.

Cambios oxidativos en lípidos en el desarrollo temprano de EM que puede ayudar a diseminar el daño oxidativo. Las lipoproteínas del SNC son partículas tipo lipoproteínas de alta densidad (HDL) que son secretadas por astrocitos y macrófagos/microglía.

Macrófagos/microglía están implicados en el desarrollo de lesiones iniciales. NO liberado por células endoteliales parecen activar macrófagos/microglía que liberan NO, H_2O_2 y $\cdot\text{O}_2^-$.

2.2.3.2 Muerte de los ODCs.

La disfunción de los astrocitos precede a la degeneración de ODC. Las sustancias NO, H_2O_2 y HNE liberadas de los astrocitos pueden activar macrófagos que afectan otras células del SCN, empezando por los ODC. Dada la disrupción en las mitocondrias, los ODC requieren de un alto nivel metabólico para generar grandes cantidades de ATP. ODCs maduros y con mielina pueden pasar a glicolisis para poder producir más ATPs. Pero la presencia de ONOO^- iniciada por NO, provoca daños en el ADN. La muerte de los ODC no es a través de apoptosis, ya que NO inhibe caspasa-3, el mayor efector en apoptosis. ODC experimentan necrosis y fragmentación del ADN.

2.2.3.3 Desmielinización.

La muerte de los ODC provoca que la membrana de mielina de las neuronas no se soporte metabólicamente. S-nitrosilación de proteínas de mielina (PLP) puede provocar la descompactación de mielina.

La externalización de fosfatidilserina es un signo para los receptores de los macrófagos originados en el espacio perivascular o microglía. La presencia de oxidación produce una actividad proinflamatoria y limita la eliminación de restos de mielina, lo que puede provocar el desarrollo de la autoinmunidad.

2.2.3.4 Ruptura de la barrera hematoencefálica.

Todo lo expuesto conlleva un tremendo impacto en la barrera hematoencefálica (BBB), lo que provoca su disfunción y ruptura.

El pie de los astrocitos se dispone alrededor de las venas induciendo y regulando las propiedades intrínsecas de la mismo. Los procesos redox conllevan la disfunción de los astrocitos que ya no soportan la integridad de la BBB en la zona de las lesiones. El entorno redox, con presencia de partículas HNE, H₂O₂, NO y [•]O₂⁻ provocan la expresión de MMP-2 y MMP-9 que altera la adhesión de la matriz desestabilizando TJ y el anclaje de los pies de los astrocitos.

Las MMP también participan en la degradación del colágeno y la elastina generando fragmentos de proteínas que pueden actuar como quemoattractores o inmunomoduladores.

La presencia de sustancias redox incrementan la permeabilidad de la BBB.

La iniciación de la EM puede detenerse aquí, sin involucrar al sistema inmune. La desmielinización puede ser reversible, por lo que es una forma benigna de EM.

2.2.3.5 Autoinmunidad.

La combinación de la muerte no apoptótica de los ODC y la disfunción de los macrófagos puede inducir autoinmunidad.

La presencia de fragmentos de mielina no eliminados por macrófagos o microglía se acumulan y pueden llegar a constituir antígenos en EM (“multiple-epitope-targeting”). Diversos antígenos han sido descritos en la autoinmunidad de EM:

- MDA aduce MOG. El aducto MDA-MOG puede incrementar la expresión de IL-23, IL-12 e IL-12R en las APC, diferenciando las células T en T_h17 y T_h1
- MDA aduce residuos de lisina e incrementa los anticuerpos contra las MDA-LDL (*low-density lipoproteins*).
- HNE forma aductos estables con lisina, histidina y cisteína que pueden provocar una fuerte respuesta inmune
- Otros epítomos provienen de la peroxidación de lípidos.
- Proteínas carboximetiladas y neuroquetal modificadas.
- Anticuerpos que tienen como objetivo proteínas S-nitrosiladas
- Anticuerpos contra autoantígenos modificados por NO y ONOO⁻.

La muerte de ODCs y la presencia únicamente de fragmentos de mielina no son suficientes para provocar una respuesta autoinmune. Moléculas específicas basadas en mielina que son altamente antigénicas, como MDA-MOG, HNE y aductos neuroquetales, péptidos nitrosilados o MBP-citrulinado son necesarios para iniciar la autoinmunidad.

La autoinmunidad se origina al presentarlas DC antígenos del SNC a las células T en los órganos linfáticos. Las DC pueden recoger los antígenos en el SNC y viajar hasta los órganos linfáticos o recoger los antígenos solubles que han drenado del SNC (facilitado por la ruptura de la BBB y BCSFB).

Las DC presentan los antígenos en MHC-II a células T CD4+ vírgenes o naif. La presentación de antígenos a células T CD8+ autoreactivas y su reactivación en el SNC por la microglía depende del proceso de presentación de antígeno cruzado. Normalmente, MHC-I presentan antígenos intracelulares proteínas ingeridas que atraen células T asesinas (CD8+ o células T citotóxicas CTL). Por otro lado, MHC-II presentan antígenos extracelulares que inducen la multiplicación de las células T_h que a su vez estimulan la producción de anticuerpos por parte de las células B. Para que las APC presenten un antígeno ingerido a las células T CD8+, tienen que hacerlo a través de MHC-I. La filtración de antígenos procesados por MHC-II en el mecanismo de MHC-I ocurre por un proceso de presentación cruzada. Las células T activadas pueden diferenciarse en células T efectoras y células T de memoria.

Dado el daño redox del tejido nervioso, fagocitos de SNC presentan antígenos en moléculas MHC-II. Células T CD4+ autoreactivas se reactivan, tras lo cual se diferencian en células T_h1 (que producen **IFN-gamma**) y/o T_h17 (que producen **IL-17**). Las células T_h efectoras liberan citocinas proinflamatorias, iniciando una reacción inflamatoria que puede resultar en la desmielinización.

La microglía activada por los daños iniciales expresa MHC-I que pueden reactivar célula T CD8+ y liberar mediadores proinflamatorios. Las CTL (linfocitos citotóxicos) tiene como objetivo la mielina, ODC y las neuronas mediante mecanismo líticos. Las células T CD8+ activadas producen citocinas que mantienen la neuroinflamación.

Otra posible vía de autoinmunidad es por infiltración en la dañada BBB de células T reactivas al SNC por mimetismo molecular (*molecular mimicry*) o activación llamada *bystander* en respuesta a un microorganismo.

2.2.3.6 Migración y filtración de las células T

Las células T deben migrar, reconocer los sitios de entrada e infiltrarse a través de la BBB. Las células T se capturan en las venas y se mueven hasta el endotelio vascular. Las interacciones de las células T y el endotelio esta mediado por moléculas de adhesión, quimiocinas y sus receptores, principalmente por la interacción receptor de integrina-integrina entre **VCAM-1/VLA-4** (inhibido por el anticuerpo monoclonal *natalizumab*).

Las quimiocinas implicadas son CCL2 (su receptor CCR2), CCL3, CCL4 y CCL5 (su receptor común CCR5), CCL20 (su receptor CCR6), CXCL10 (su receptor CXCR3), CXCL12 (sus receptores CXCR4 y CXCR7). Las quimiocinas son liberadas por los astrocitos activados y la regulación de su expresión es a través de **NF-kB** (las lesiones iniciales y los procesos oxidativos lo sobreexpresan). Células T responden a estas quimiocinas y las mismas pueden ser cruciales para la inflamación y el desarrollo del sistema autoinmune activo.

2.2.3.7 Neurodegeneración en la esclerosis múltiple.

La neurodegeneración de axones desmielinizados es la causa principal de la discapacidad neurológica en EM. Las neuronas desmielinizadas están desprotegidas ante los elevados niveles de ROS, RNS y hierro. Con los AOS debilitados y sin el soporte antioxidativo y metabólico que dan las capas de mielina y las células gliales, las neuronas son muy susceptibles al entrono altamente oxidativo y nitrosativo y el estrés metabólico general. La remielinización por parte de ODC maduros está limitada en lesiones crónicas. Para poder mantener la función, las neuronas desmielinizadas incrementan la expresión y redistribuyen canales de Na^+ por todo el axón, lo que incrementa la actividad de las ATPasas y el consumo de ATP. El incremento de producción de ATPs se obtiene por el incremento de mitocondrias, pero más mitocondrias implican más H_2O_2 y las neuronas presentan un mayor número de complejos I y IV. El complejo I, que produce $^{\bullet}\text{O}_2^-$ está dañado, lo que implica un estrés oxidativo de la mitocondria, la sobreexpresión de la chaperona MtHsp70 y el daño en el ADN. Dada la disfunción de mitocondrias y la menor disponibilidad de O_2 , las neuronas desmielinizadas incrementan el volumen de glicólisis para obtener la cantidad de ATP requerida, lo que implica el desequilibrio de la ratio **NADH/NAD⁺**. Para compensar este desequilibrio se aumenta la síntesis de NAD⁺, disminuyéndose los niveles de **triptófano** (existen posibles tratamientos con triptófano).

Al final, el incremento de mitocondrias y el aumento de glicólisis no son suficientes para el nivel de energía requerido. Sin ATP suficiente para la Na^+/K^+ ATPasa las neuronas sufren de acumulación de Na^+ que revierte la acción del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, se importa Ca^{2+} y se produce la muerte celular inducida por Ca^{2+} . Los **bloqueadores del canal de Na^+** y los inhibidores del **intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$** ofrecen protección frente a la degeneración.

Finalmente, los axones desmielinizados en lesiones crónicas disminuyen la presencia de Na^+/K^+ ATPasa, pero el elevado número de canales de Na^+ resulta en un persistente desequilibrio de iones, afluencia de agua, inflamación de los axones y degeneración.

Sustancia blanca cerebral: El daño se produce lentamente en lesiones inactivas crónicas con capacidad remielinizante reducida. La inflamación puede propagarse en neurodegeneración al no sobrevivir los axones desmielinizados al ataque inflamatorio, por el impacto de ROS, RNS, citocinas y glutamato liberados por células T, microglía activada y macrófagos. La disfunción intra-axonal de las mitocondrias provocada por las especies NO y H_2O_2 derivadas de los macrófagos provoca la hinchazón y fragmentación de los axones.

Córtex: La desmielinización de las lesiones corticales correlaciona con la progresión de la EM y las discapacidades cognitivas. El córtex está compuesto por axones mielinizados y somas y dendritas neuronales desprotegidas. La parte desprotegidas de las neuronas son muy sensibles a los RNS y ROS y están expuestas directamente a citocinas y glutamato. Las lesiones corticales incluyen lesiones neuronales, cambios morfológicos, *pyknosis* y apoptosis, ruptura

dendrítica, pérdida de arborización dendrítica y disminución de la densidad de somas neuronales y sinapsis. La presencia de lesiones corticales y la pérdida de espesor cortical no está relacionado con la desmielinización, lo que implica que el ataque inflamatorio de los cuerpos neuronales tiene lugar en lesiones corticales activas. Las células T atacan la mielina cortical en relación a la inflamación y desmielinización del córtex. Mientras, mediadores solubles de la inflamación afectan somas y dendritas que son más susceptible al daño. Dendritas pueden ser fragmentadas por CTL que se unen a MHC-I en la membrana neuronal, en una interacción célula-célula directa o por especies de vida corta como ROS/RNS, pero no mediada por citocinas.

La unión de las células T se produce a través de la interacción **LFA-1/ICAM-1** y/o por la expresión de proteínas de mielina en las neuronas. Las células reactivas T_H17 contra mielina provocan la degeneración del soma y del axón por interacción directa con neuronas e induciendo excitotoxicidad mediante glutamato. La interacción de células T con soma y dendritas, independientemente de MHC, provoca oscilaciones de Ca^{2+} , lo que conlleva el incremento letal de Ca^{2+} neuronal que puede ser prevenido por **bloqueando receptores de glutamato**.

La muerte del soma resulta directamente en la disfunción axonal y la lenta desintegración (“*head-to-tail*”). Que es el proceso viceversa al de la degeneración de axones que resulta en la muerte de la célula en la sustancia blanca (degeneración “*tail-to-head*”).

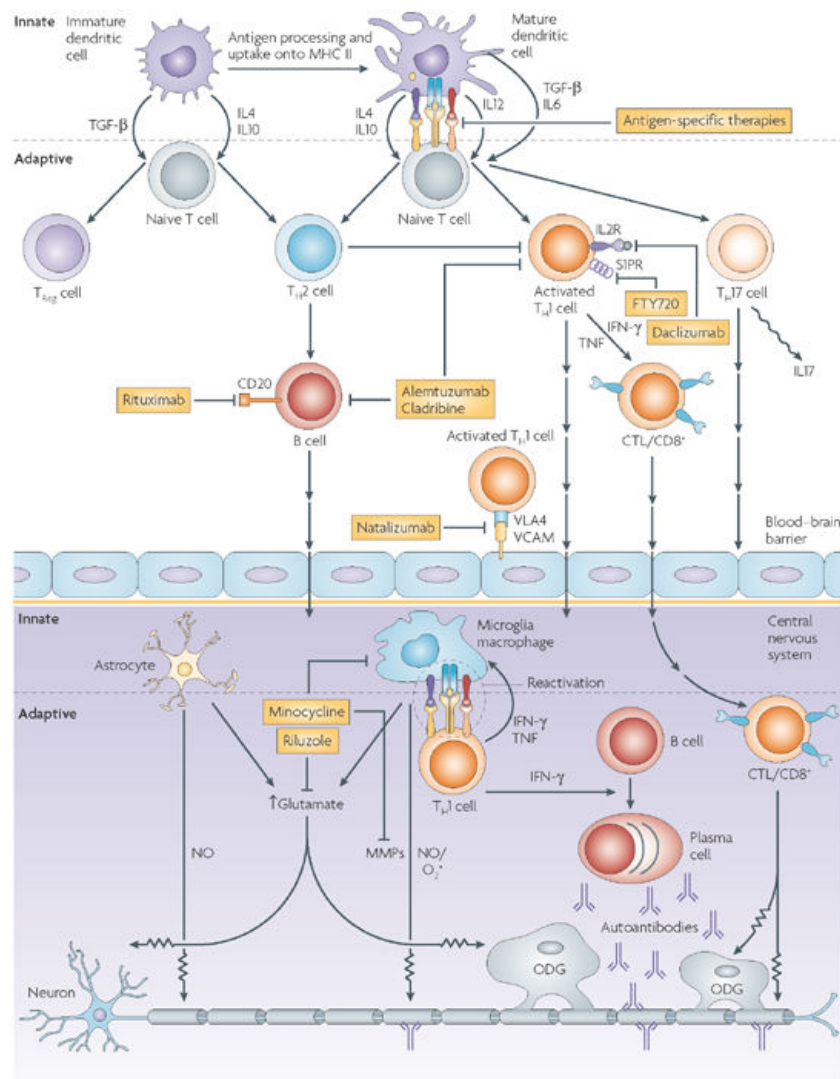
Las lesiones corticales tienen un impacto mayor y más directo en la condición del paciente ya que no existe ningún mecanismo reparador similar a la remielinización.

2.2.4 Tratamiento

En EM existen múltiples mecanismos asociados y, en consecuencia, y por lo tanto existen múltiples tratamientos enfocados a disminuir los efectos de la enfermedad, detenerla y curarla. Es posible que el enfoque del tratamiento de la EM pase por intervenciones en varios mecanismos para detener procesos de oxidación, la inflamación y la neurodegeneración, además de promover la regeneración del SCN dañado (remielinización):

- Reducir la inflamación
- Limitar el estrés oxidativo
- Disminuir el ataque inmunológico
- Inducir la remielinización de las neuronas: células madres reclutadas por el cerebro para recrear la cubierta de mielina.

En *DrugBank* existen 357 entradas para el tratamiento de la esclerosis múltiple en sus diferentes formas o para aliviar alguno de sus síntomas. En la Figura 5³⁷. y la Tabla 2³⁸⁻⁴² se muestran y describen algunos de los mecanismos implicados en la esclerosis múltiple y los medicamentos que existen para tratarla.



Nature Reviews | Drug Discovery

Figura 5 Mecanismo implicados en la esclerosis múltiple y estrategias terapéuticas asociadas³⁷.

Tabla 2 Tabla de medicamentos asociados a los mecanismos implicados en la esclerosis múltiple de los tratamientos que existen³⁸⁻⁴².

Medicamento	Mecanismo	Efecto
IFN-β (Avonex, Rebif, Betaseron)	Anti-inflamatorio (disminuye IL-17; IL-23) NK, expansión de células Treg	Reduce las recaídas, pero su efecto no está claro en la progresión de la enfermedad
Glatiramer acetate (Glatiramer, Copaxone)	Modulación de las APCs Reduce TNF; IL-2	Reduce la frecuencia de recaídas, pero no la actividad de la enfermedad
Natalizumab (Tysabri)	Anticuerpo que bloquea VLA-4 limitando la entrada de células T	Reduce las recaídas, ligero efecto en la reducción de la enfermedad
Fingolimod (Gilenya)	Bloqueo de los receptores S-1-P1. Atrapa los linfocitos en el nodo linfocítico (neuroprotección)	Reduce las recaídas, ligero efecto en la reducción de la enfermedad
Dimetil fumarato (Tecfidera)	Reduce estrés oxidativo. Incremento Nrf2	Reduce las recaídas, ligero efecto en la reducción de la enfermedad

Medicamento	Mecanismo	Efecto
Teriflunomide (Aubagio)	Inhibidor de dihidroorotato deshidrogenasa. Previene la síntesis de pirimidina. Limita la proliferación de linfocitos Sangre y periferia	Limitado efecto reduciendo recaídas y el progreso de la enfermedad
Laquinimod	Quinolone-3-carboxamida. Neuroprotección	Limitado efecto reduciendo recaídas y el efecto relativo en el progreso de la enfermedad
Anticuerpos anti-CD52 (Alemtuzumab)	Lisis de linfocitos	Efectivo reduciendo recaídas y efecto limitado en el progreso de la enfermedad
Anticuerpos anti-CD25 (Daclizumab)	Integrin $\alpha 4\beta 1$ (<i>Very Late Antigen-4</i> , VLA-4, en células T)	
Anticuerpos anti-CD20 (Rituximab, ocrelizumab, ofatumumab)	Células mononucleares de sangre periférica (<i>peripheral blood mononuclear cell</i> , PBMC)	

Las condiciones autoinmunes no se detectan hasta que son patológicas. Es por ello que nos vamos a centrar en los posibles tratamientos enfocados a minimizar o reestablecer el equilibrio inmunológico una vez la enfermedad ya se ha manifestado y está en progresión.

3 Dianas terapéuticas y tratamientos existentes en la esclerosis múltiple

3.1. Nutraceuticos

Existen diversas publicaciones que analizan los beneficios que los nutraceuticos pueden tener en el tratamiento de la esclerosis múltiple, ya sea para aliviar los síntomas como para tratar la enfermedad. Entre los nutraceuticos más estudiados están la vitamina D^{10,11}, la biotina³², los ácidos grasos omega 3 y 6⁴³ y la cúrcuma¹².

De la búsqueda en *DrugBank*¹⁴ de nutraceuticos asociados al tratamiento de esclerosis múltiple, se obtuvieron 14 compuestos detallados en la **Tabla 3** más capsaicina y cúrcuma (se han omitido elementos químicos como calcio, magnesio y manganeso). A continuación, se realizaron búsquedas en *PubMed*¹³ del número de publicaciones existentes que asociaran cada uno de los nutraceuticos con la esclerosis múltiple.

Tabla 3 Nutraceuticos encontrados en *DrugBank* que se asocian al tratamiento de esclerosis múltiple y el número de publicaciones existentes en *PubMed* que relacionan cada nutraceutico con la enfermedad.

Descripción	Referencias en PubMed
Vitamina D	1055
Colina (Lecitina)	231
Riboflavina (Vitamina B2)	147
Omega-3 y omega-6	104
Cianocobalamina (Vitamina B12)	84
Biotina	67
Vitamina C	42
Ácido Fólico (Familia Vitamina B)	41
Vitamina E	40
Tiamina (Vitamina B1)	29
Capsaicina	23
Cúrcuma	19
Ginsenósido Rb1	4
Ácido Pantoténico	3
L-Glutamina	1
Ácido Glutámico	0

Para cada uno de los nutraceuticos con más de 10 publicaciones, se ha analizado sus receptores asociados en *DrugBank*^{14,44-46} y *KEGG*¹⁷⁻²⁰. Se han revisado (Apéndice 1) los mecanismos en los que intervienen en el organismo (*KEGG Pathways*) y a que enfermedades está asociado (*KEGG Disease*).

En la Tabla 4 se describen los principales receptores identificados, la entrada correspondiente en *UniProt* y en *PDB*, el gen asociado, los nutraceuticos que

interacciona con cada receptor y si ha sido seleccionado para un análisis de acoplamiento y el motivo.

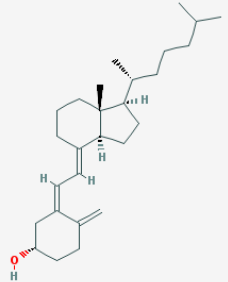
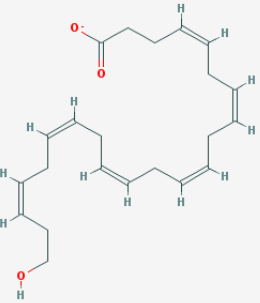
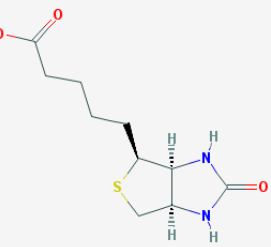
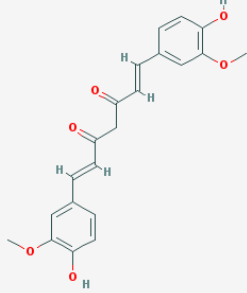
Tabla 4 Receptores de nutraceuticos asociados a la esclerosis múltiple. Se indica el nombre del receptor, la entrada correspondiente en *UniProt* y en *PDB*, el gen asociado, el nutraceutico que interacciona y si ha sido seleccionado para un análisis de acoplamiento y el motivo.

Nombre	UniProt	PDB	Gen	Nutraceutico	Seleccionado
<i>Vitamin D receptor</i>	P11473	1DB1	VDR	Vitamina D, Cúrcuma	Sí
<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>	P37231	2VV0	PPARG	Cúrcuma, Omega-3	Sí
<i>Multidrug resistance-associated protein 5</i>	O15440	2CBZ	ABCC5	Cúrcuma	No, proteína de membrana de transporte
<i>Carbonyl reductase [NADPH] 1</i>	P16152	3BHI	CBR1	Cúrcuma	Sí
<i>Glutathione S-transferase P</i>	P09211	18GS	GSTP1	Cúrcuma	Sí
<i>Toll-Like Receptor</i>	Q9NR96	-	TLR9	Omega-3	No, no existe entrada en PDB
<i>Pyruvate carboxylase</i>	P11498	3BG3	PC	Biotina	Sí
<i>Propionyl CoA carboxylase</i>	P05165	2JKU	PCC	Biotina	No, similar a PC
<i>Methylcrotonyl CoA carboxylase</i>	Q96RQ3/	No humana	MCC	Biotina	No, similar a PC
<i>AcetylCoA carboxylases</i>	Q13085	3GLK, 2YL2	ACC	Biotina	No, similar a PC

De los nutraceuticos obtenidos, se han escogido los que tienen un mayor número de publicaciones en relación a la EM, no sean todos vitaminas (para que exista cierta variedad en el tipo de nutraceutico analizado) o aquellos que comparten receptores. En la Tabla 5 se detallan los escogidos para hacer un análisis de semejanza (vitamina D, omega-3, biotina y cúrcuma) y las correspondientes dianas terapéuticas asociadas a la esclerosis múltiple, identificadas en *Swiss Target Prediction*²¹ y *DrugBank*^{14,44-46}.

De los diversos receptores involucrados se han escogido cinco (VDR, PPARG, CBR1, GSTP1, PC) para analizar el acoplamiento (*docking*) con las moléculas a estudiar.

Tabla 5 Dianas terapéuticas de algunos de los nutraceuticos que tienen algún tipo de efecto en el tratamiento de la esclerosis múltiple (*SwissTargetPrediction*²¹, *DrugBank*^{14,44-46}).

Nutracéutico		Diana terapéutica (<i>SwissTP</i> , <i>DrugBank</i>)
Vitamina D		<ul style="list-style-type: none"> - Vitamin D Receptor (VDR)
Omega-3 (DHA)		<ul style="list-style-type: none"> - Toll-Like Receptor (TLR9) - Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARG)
Biotina (Vitamina B7)		<ul style="list-style-type: none"> - Pyruvate carboxylase (PC) - Propionyl CoA carboxylase (PCC) - Methylcrotonyl CoA carboxylase (MCC) - AcetylCoA carboxylases (ACC)
Cúrcuma		<ul style="list-style-type: none"> - Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARG) - Vitamin D receptor (VDR) - Inhibitor Multidrug resistance-associated protein 5 (ABCC5) - Carbonyl reductase [NADPH] 1 (CBR1) - Glutathione S-transferase P (GSTP1)

3.2. Tratamientos y dianas terapéuticas

La búsqueda en *Therapeutic Target Database*^{15,16} ha dado como resultado nueve dianas terapéuticas asociadas al tratamiento de la esclerosis múltiples con diversos medicamentos relacionados con cada una de ellas, tal y como se detalla en la Tabla 6.

Tabla 6 Información sobre medicamento y las dianas terapéuticas sobre las que actúan encontradas en *Therapeutic Target Database*.

Diana terapéutica	UniProt	Medicamento
<i>Apoptosis regulator Bcl-2</i>	P10415	MCI-186 (ALS) Pc4 (Psoriasis)
<i>B-lymphocyte antigen CD20</i>	P11836	Rituximab Ofatumumab
<i>Sphingosine 1-phosphate receptor 1</i>	P21453	Fingolimod
<i>Tumor necrosis factor</i>	P01375	D019XH (ALS) AN0128 (Psoriasis)
<i>Voltage-gated sodium channel</i>	Q8NDX3	Lamotrigine
<i>APRIL</i>	O75888	Atacicept
<i>Integrin alpha-2/beta-1</i>	P05556	Valetizumab
<i>Integrin alpha-4/beta-1 (VLA-4)</i>	P13612/ Q8WUM6	CDP323 Finategrast
<i>Interferon gamma</i>	P01579	Ácido fumárico

ALS: Amyotrophic Lateral Sclerosis

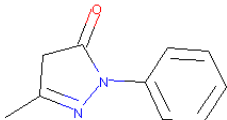
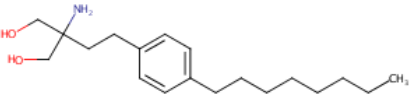
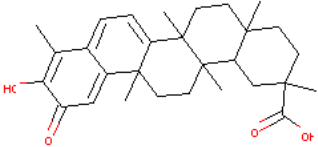
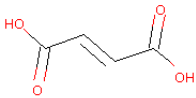
De los medicamentos aprobados o en fase clínica para el tratamiento de la esclerosis múltiple, se han escogido aquellos que tienen medicamentos asociados que son moléculas pequeñas (no anticuerpos) y los que tienen una entrada en PDB, para poder descargar la estructura cristalina (Tabla 7).

Tabla 7 Receptores de medicamentos aprobados para el tratamiento de la esclerosis múltiple. Se indica el nombre del receptor, los códigos en *UniProt* y en *PDB*, el gen y el medicamento asociados y si ha sido seleccionado para un análisis de acoplamiento y el motivo.

Nombre	PDB	Gen	Medicamento	Seleccionado
<i>Apoptosis regulator Bcl-2</i>	5JSN	BCL2	MCI-186	Sí
<i>B-lymphocyte antigen CD20</i>	3PP4	MS4A1	Rituximab Ofatumumab	Anticuerpos
<i>Sphingosine 1-phosphate receptor 1</i>	3V2Y	S1PR1	Fingolimod	Sí
<i>Tumor necrosis factor</i>	1TNF	TNF	Celastrol	Sí
<i>Voltage-gated sodium channel</i>	-	SCN11A	Lamotrigine	No entrada en PDB
<i>APRIL</i>	4ZCH	TNFSF13	Atacicept	Anticuerpos
<i>Integrin alpha-2/beta-1</i>	1K11	ITGB1	Valetizumab	Anticuerpos
<i>Integrin alpha-4/beta-1 (VLA-4)</i>	-		CDP323, Finategrast	No entrada en PDB
<i>Interferon gamma</i>	1EKU	IFNG	Ácido Fumárico	Sí

En la Tabla 8 se detallan los receptores escogidos y el medicamento asociado, que han servido como referencia en el análisis de acoplamiento con los nutracéuticos a estudiar.

Tabla 8 Receptores asociados a medicamentos aprobados o en vías de investigación para el tratamiento de la esclerosis múltiple (*Therapeutic Target Database*).

Receptor	PDB	Medicamento	
BCL2	5JSN	MCI-186 (ALS)	
S1PR1	3V2Y	Fingolimod	
TNF	1TNF	Celastrol (ALS)	
IFNG	1EKU	Ácido Fumárico	

4 Identificación y análisis de moléculas similares a los nutraceuticos en el tratamiento de la esclerosis múltiple.

Se ha realizado un análisis de semejanza sobre los nutraceuticos vitamina D, ácido docosaheptaenoico (DHA, Omega 3), biotina y cúrcuma, identificados en la etapa anterior como nutraceuticos con un posible efecto terapéutico sobre la esclerosis múltiple. Para ello se ha realizado una búsqueda con *SwissSimilarity*²⁴ en varias librerías: *Approved*, *Experimental*, *Investigational*, *Nutraceuticals* y *ZINC-DrugLike*.

Posteriormente, se ha utilizado *SwissADME*²⁵ para analizar las propiedades de Absorción, Distribución, Metabolismo, Excreción y Toxicidad (ADMET) de todos los compuestos identificados. Se han utilizado estas propiedades para filtrar el número de compuestos a analizar y se han escogido únicamente los compuestos con determinadas características:

- Que no exista ninguna violación de las reglas de Lipinski⁴⁷, Ghose⁴⁸, Veber⁴⁹, Egan⁵⁰, Muegge⁵¹
- Con nivel de biodisponibilidad⁵² $\geq 56\%$
- Accesibilidad sintética $\leq 3,5$ (desde muy fácil 1 a muy difícil 10).

Los compuestos finalmente seleccionados se han agrupado en diez grupos de moléculas similares mediante un análisis de agrupaciones *k-medoides* (*k-medoids clustering*) y se ha escogido un compuesto representativo de cada grupo.

Adicionalmente, se han identificado todos los nutraceuticos existentes en la base de datos *DrugBank*⁴⁴⁻⁴⁶. De los 105 compuestos iniciales, se eliminaron aquellos que no tenían entrada en la base de datos *PubChem Compound*⁵³, eran elementos químicos o ligandos de alta complejidad asociados a metales, quedando 83 moléculas en la base de datos de nutraceuticos.

4.1. Actividades realizadas

El proyecto se ha enfocado desde dos puntos de vista diferentes:

1. Por un lado, se ha focalizado en las dianas terapéuticas (VDR, PPAR γ , CBR1, GSTP1, PC) asociadas a los nutraceuticos que se ha descrito que actúan contra la esclerosis múltiple (vitamina D, omega-3, biotina y cúrcuma).
 - 1.1. Se ha realizado un cribado de moléculas similares a los nutraceuticos de interés con *SwissSimilarity*²⁴.
 - 1.2. Se calcularon las propiedades ADMET con *SwissADME*²⁵.
 - 1.3. Se filtraron las moléculas que cumplieran con ciertas propiedades de capacidad terapéutica (no exista ninguna violación de las reglas de Lipinski⁴⁷, Ghose⁴⁸, Veber⁴⁹, Egan⁵⁰, Muegge⁵¹), con cierto nivel de biodisponibilidad⁵² ($\geq 0,5$) y accesibilidad sintética ($\leq 3,5$). Para llevar a

cabo este filtrado y obtener los ficheros de los ligandos de interés, se utilizó la herramienta de minería de datos *KNIME*⁵⁴.

1.4. Se obtuvo la estructura de las proteínas de interés en *Protein Data Bank*⁵⁵.

1.5. Se prepararon las proteínas y los ligandos con *Chimera*²².

1.6. Se realizó el estudio de acoplamiento receptor-ligando con *AutoDock Vina*²³.

En la Figura 6 se esquematiza el protocolo seguido.

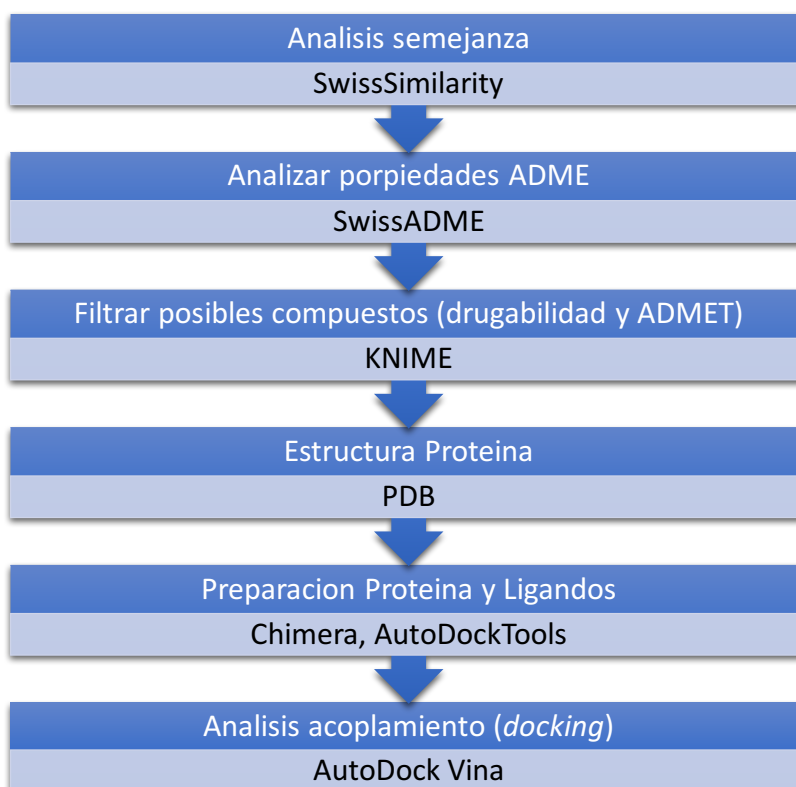


Figura 6 Protocolo que se ha seguido para la búsqueda de nutraceuticos con posible efecto terapeutico en esclerosis múltiple.

2. Por otro lado, se buscaron todos los nutraceuticos registrados en *DrugBank* y se realizaron análisis de acoplamiento con:
 - 2.1. Las dianas terapéuticas (VDR, PPARG, CBR1, GSTP1, PC) asociadas a los nutraceuticos de referencia (Tabla 5).
 - 2.2. Las dianas terapéuticas identificadas en TTP como receptores de medicamentos (moléculas sencillas) aprobados o en vías de investigación para la esclerosis múltiple (Tabla 8).

En este caso, se llevaron a cabo los tres últimos pasos del protocolo de la Figura 6.

Destacar que, aunque no se había previsto inicialmente, se ha trabajado con el software *KNIME*⁵⁴ para realizar el filtrado de datos según propiedades ADME, agrupar los compuestos según *k-medoides* y transformar y extraer la estructura de los ligandos a ficheros que se pudieran leer en *Chimera*²².

4.2. Cribado basado en el ligando (*ligand-based screening*).

4.2.1 Análisis de semejanza

A partir de los nutraceuticos considerados de interés (Tabla 10), se ha realizado un análisis de semejanza con *SwissSimilarity*²⁴ en las librerías “*Approved*”, “*Experimental*”, “*Investigational*”, “*Nutraceuticals*” y “*ZINC-DrugLike*” con valor de semejanza (*similarity score*) $\geq 0,1$. El número de moléculas obtenidas en cada librería para cada nutraceutico se encuentran resumidos en la Tabla 9.

Tabla 9 Resultados análisis de semejanza realizados con *SwissSimilarity* en las librerías “*Approved*”, “*Experimental*”, “*Investigational*”, “*Nutraceuticals*” y “*ZINC-DrugLike*” con valor de semejanza (*similarity score*) $\geq 0,1$.

Nutraceutico	A	E	I	N	Z-DL
Colecalciferol (Vitamina D3)	28	40	4	0	400
Cúrcuma	0	6	0	0	400
Omega-3 (DHA)	3	3	35	0	251
Biotina (Vitamina B7)	19	57	0	0	400

A: *Approved*

E: *Experimental*

I: *Investigational*

N: *Nutraceuticals*

Z-DL: *ZINC-DrugLike*

4.2.2 Análisis propiedades ADMET

Se realizó una búsqueda de las propiedades ADMET con *SwissADME*²⁵ de las moléculas consideradas de interés tras el análisis de semejanza. De las diferentes propiedades extraídas, se han seleccionado las cinco reglas de moléculas que podrían ser medicamentos (“drugabilidad”) basados en los filtros originados en cinco grandes compañías farmacéuticas: Lipinski⁴⁷ (Pfizer), Ghose⁴⁸ (Amgen), Veber⁴⁹ (GSK), Egan⁵⁰ (Pharmacia) y Muegge⁵¹ (Bayer). Se han escogido las moléculas que no incumplieran ninguna de estas reglas.

Adicionalmente se ha evaluado el factor de biodisponibilidad de Abbot⁵² (*Bioavailability Score*). Este factor busca predecir la probabilidad de que un compuesto tenga al mínimo un 10% de biodisponibilidad oral en ratas o una permeabilidad Caco-2 medible. Es un factor semi-cuantitativo basado en la carga total, TPSA, y la violación o no del filtro de Lipinski. Se definen cuatro tipos de probabilidades: 11%, 17%, 56% o 85%. Se han seleccionado las moléculas con un nivel de biodisponibilidad $\geq 56\%$.

Finalmente, se han escogido aquellas moléculas con una accesibilidad sintética (SA) Después de la normalización el valor de SA va desde 1 (muy fácil) a 10

(muy difícil). Se han escogido aquellas moléculas que tengan una accesibilidad sintética $\leq 3,5$.

4.2.3 Selección

Para realizar el filtrado de las moléculas según sus propiedades ADMET, agruparlas (diez agrupaciones por *k-medoids*) y obtener los ficheros de los ligandos a analizar (las moléculas representativas de las diez agrupaciones realizadas) se ha construido un flujo de trabajo en *KNIME*⁵⁴ (Figura 7). *KNIME* es una herramienta de minería de datos que facilita el tratamiento masivo de datos.

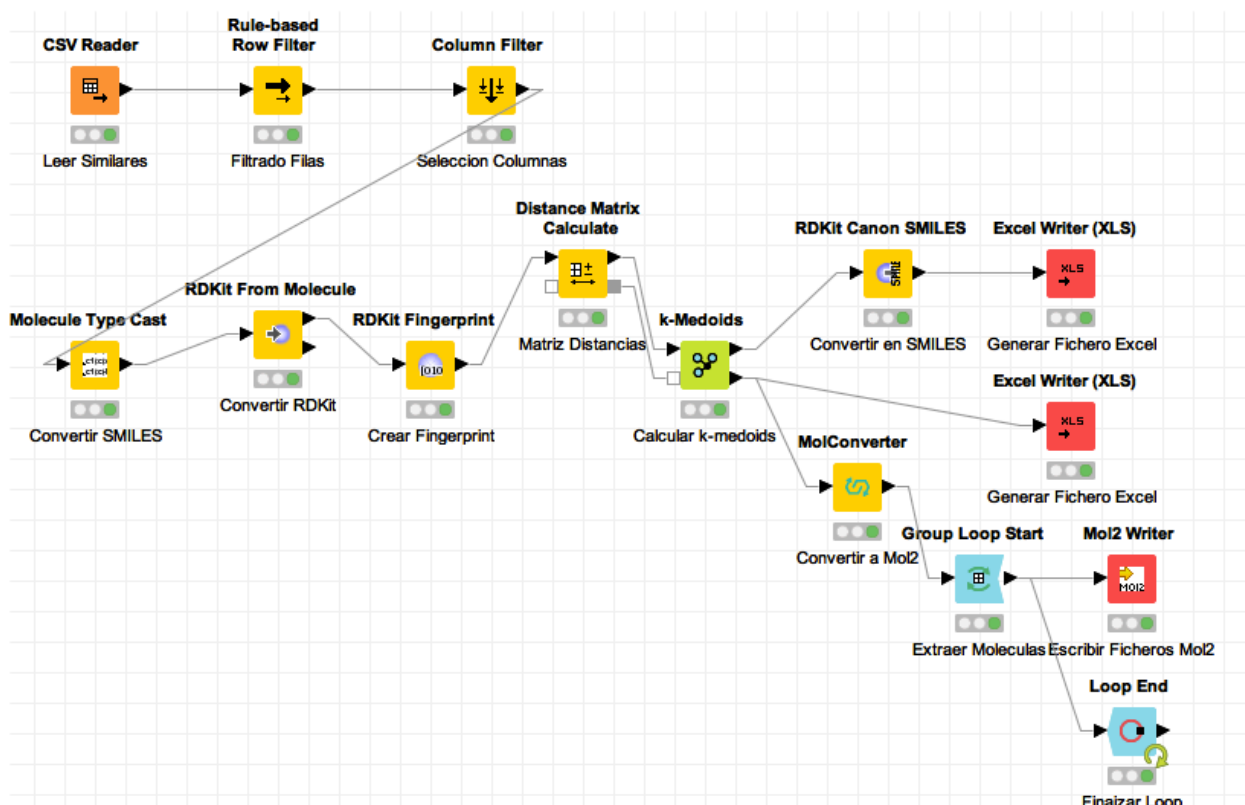


Figura 7 Flujo de trabajo en *KNIME* utilizado para el filtrado, agrupación y obtención de ficheros de los ligandos a estudiar.

4.3. Análisis interacción ligando-proteína

Una vez obtenidas las moléculas similares a los ligandos que se sabe interactúan con los receptores y escogido aquellos con ciertas propiedades ADMET, se pasó a analizar la interacción ligando-proteína. Para ello se han seguido los siguientes pasos:

- Descargar las estructuras cristalina de las proteínas de *ProteinDataBank*⁵⁵ (PDB).
- Preparar los ficheros de las proteína con *Chimera*²²:
 - o Eliminar otras cadena, ligandos y solventes.
 - o Añadir cargas.

- Añadir hidrógenos.
- Determinar la caja de acoplamiento (*docking box*) y guardar coordenadas. La caja de acoplamiento se ha determinado por ligandos que existen interaccionando con el receptor en la estructura cristalina descargada.
- Preparar los ficheros *.pdbqt* que contiene coordenadas atómicas, cargas parciales y parámetros de solvatación para todos los átomos de las macromoléculas, con *AutoDock Tools*^{56,57}.
- Descargar ligandos y prepararlos en ficheros *.pdbqt* que contiene coordenadas atómicas y cargas parciales con *AutoDock Tools*^{56,57}.
- Realizar el análisis de acoplamiento con *AutoDock Vina*²³.

5 Cribado basado en el ligando (*ligand-based screening*)

Se ha realizado un estudio de acoplamiento ligando-receptor de las moléculas escogidas para cada nutraceutico con el receptor correspondiente, tal y como se indica en la Tabla 10.

Tabla 10 Receptores asociados a nutraceuticos con efecto en el tratamiento de la esclerosis múltiple. Los nutraceuticos asociados a cada receptor son aquellos cuyas celdas no están sombreadas.

Receptor	PDB	Biotina	Cúrcuma	Vitamina D3	DHA
PPARG	2VV0				
CBR1	3BHI				
GSTP1	18GS				
PC	3BG3				
VDR	1DB1				

5.1. Receptor Vitamina D (VDR)

Según información encontrada en *UniProt*⁵⁸, el receptor de vitamina D (VDR) es un receptor nuclear de calcitriol, la forma activa de la vitamina D3. Modula la actividad de la vitamina D3 en la célula, activando la transcripción de genes diana que reaccionan a la vitamina D3. Juega un papel central en la homeostasis del calcio⁵⁸.

La estructura de la proteína escogida es la entrada de **1DB1** *Crystal Structure of the Nuclear Receptor for Vitamin D Complexed to Vitamin D* de PDB. El ligando asociado a este receptor es la Vitamina D3 (VDX).

5.1.1 Evaluación del acoplamiento con el ligando cristalográfico

En la Figura 8 se muestra el análisis con PLIP⁵⁹ de la interacción de 1DB1 con calcitriol.

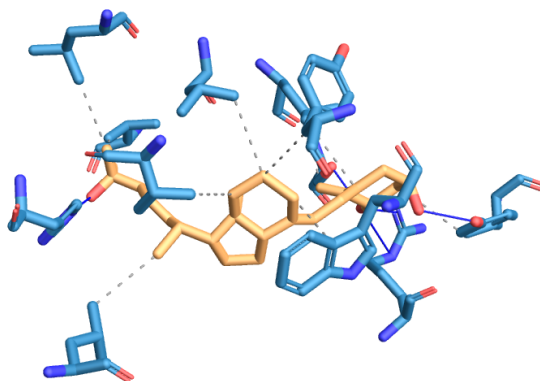


Figura 8 Interacciones proteína (1DB1) – ligando (calcitriol) identificadas con PLIP.

En dicho análisis se han identificado:

- Diez interacciones hidrofóbicas (Tabla 11):

Tabla 11 Interacciones hidrofóbicas entre 1DB1 y calcitriol.

	Residuo	AA	Distancia (Å)	Átomo Ligando	Átomo Proteína
1	143A	TYR	3.93	1997	200
2	227A	LEU	3.54	2021	454
3	230A	LEU	3.96	2006	480
4	233A	LEU	3.54	2014	499
5	233A	LEU	3.94	2000	501
6	286A	TRP	3.45	2004	915
7	295A	TYR	3.96	2006	989
8	300A	VAL	3.92	2007	1035
9	309A	LEU	3.81	2016	1101
10	418A	VAL	3.99	2022	1952

- Cinco puentes de hidrógeno (Tabla 12):

Tabla 12 Puentes de hidrógeno entre 1DB1 y calcitriol.

	Residuo	AA	Distancia H-A (Å)	Distancia D-A (Å)	Ángulo
1	143A	TYR	1.97	2.83	146.22
2	237A	SER	2.31	2.78	108.78
3	274A	ARG	1.92	2.86	157.47
4	274A	ARG	3.26	4.09	144.51
5	305A	HIS	1.90	2.81	153.83

5.1.2 Acoplamiento ligando - diana terapéutica

Los resultados de la energía de acoplamiento VDR-ligando para las moléculas escogidas tras el análisis de semejanza con cúrcuma y vitamina D3 se muestran en las Tabla 13 y Tabla 14 respectivamente.

En el acoplamiento con las moléculas similares a cúrcuma, observamos dos ligandos (ZINC18062842 y ZIN05257255) con energía de acoplamiento menor (mayor valor absoluto) que la vitamina D3 (-10.0 kcal/mol) y otros tres (ZINC18066836, ZINC17156357 y ZINC06552379) con energía de acoplamiento menor que la cúrcuma (-9.0 kcal/mol)

En el grupo de la vitamina D observamos que existen tres moléculas (DB00246, DB03383 y DB05137) con energía de acoplamiento menor que la vitamina D3 (-

10.0 kcal/mol) y uno (DB08954) con energía menor que la cúrcuma (-9.0 kcal/mol).

Tabla 13 Energía de acoplamiento ligando-proteína para el receptor VDR con moléculas similares a la cúrcuma.

Molécula	E (kcal/mol)
ZINC18062842	-11.5
ZINC05257255	-10.3
ZINC18066836	-9.8
ZINC17156357	-9.4
ZINC06552379	-9.2
ZINC31829800	-8.7
ZINC06639651	-8.0
ZINC83203763	-7.6
ZINC44027235	-7.6
ZINC04958285	-7.3

Tabla 14 Energía de acoplamiento ligando-proteína para el receptor VDR con moléculas similares a la vitamina D3.

Molécula	E (kcal/mol)
DB00246	-10.5
DB03383	-10.2
DB05137	-9.9
DB08954	-9.2
DB01079	-8.5
ZINC38337684	-8.1
ZINC38337682	-8.1
DB02495	-8.0
ZINC38337680	-7.9
DB01611	-7.2

5.1.3 Acoplamiento nutracéutico – diana terapéutica

La Tabla 15 muestra el resultado de la energía de acoplamiento VDR-ligando para todos los nutracéuticos identificados. Existen cinco ligandos (DB00153, DB00146, DB00136, DB00169, DB01436) con energía de acoplamiento menor que la vitamina D3 (-10.0 kcal/mol) y otros ocho (DB01708, DB04789, DB00158, DB00755, DB00162, DB01322, DB00163, DB00116) con energía de acoplamiento menor que la cúrcuma (-9.0 kcal/mol).

Tabla 15 Nutracéuticos con menor energía de acoplamiento ligando-proteína para el receptor VDR.

Molécula	E (kcal/mol)
DB00153	-12.4
DB00146	-12.0
DB00136	-11.9
DB00169	-11.6
DB01436	-11.4
DB01708	-9.7
DB04789	-9.7
DB00158	-9.6
DB00755	-9.6
DB00162	-9.3
DB01322	-9.2
DB00116	-9.1
DB00163	-9.1

5.2. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma (PPARG)

Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma (PPARG) regula el almacenamiento de los ácidos grasos y el metabolismo de la glucosa. PPAR-gamma reduce la respuesta inflamatoria de las células cardiovasculares y en particular de células endoteliales (*UniProt*⁵⁸).

Agonistas de PPAR-gamma modulan el desarrollo de la enfermedad encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE, *experimental autoimmune encephalomyelitis*), un modelo animal de la esclerosis múltiple (EM)⁶⁰. Agonistas de PPAR-gamma [como tiazolidinedionas (TZDs) y 15-deoxi-Delta(12,14) prostaglandina J(2) (15d-PGJ(2))], han sido efectivos en el tratamiento de EAE⁶¹.

La estructura de la proteína descargada de PDB es **2VV0** *hPPARgamma Ligand binding domain in complex with DHA* acoplada con el ácido docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenoico (DHA).

5.2.1 Evaluación del acoplamiento con el ligando cristalográfico

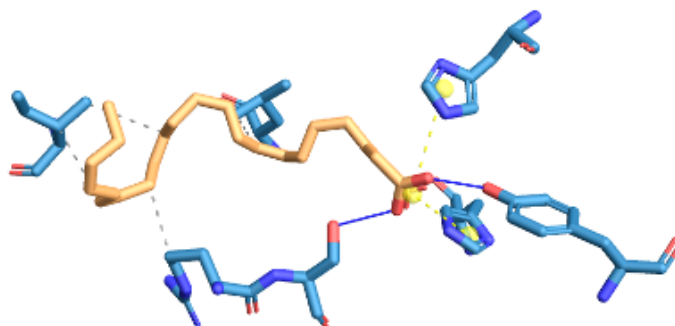


Figura 9 Interacciones proteína (PPAR) – ligando (DHA) identificadas con PLIP.

En el análisis de las interacciones del ligando DHA con la proteína PPARG con el programa PLIP⁵⁹ (Figura 9) se observan tres tipos de interacciones:

- Cuatro interacciones hidrofóbicas (Tabla 16)

Tabla 16 Interacciones hidrofóbicas entre PPARG y DHA.

	Residuo	AA	Distancia (Å)	Átomo Ligando	Átomo Proteína
1	288A	ARG	3.24	4102	564
2	330A	LEU	3.76	4095	902
3	341A	ILE	3.72	4104	979
4	341A	ILE	3.73	4100	981

- Tres puentes de hidrogeno (Tabla 17)

Tabla 17 Puentes de hidrógeno entre PPARG y DHA.

	Residuo	AA	Distancia H-A (Å)	Distancia D-A (Å)	Ángulo
1	289A	SER	1.93	2.76	142.47
2	289A	SER	1.93	2.76	146.37
3	473A	TYR	2.12	3.01	159.26

- Dos puentes salinos (Tabla 18)

Tabla 18 Puentes salinos entre PPARG y DHA.

	Residuo	AA	Distancia (Å)	Grupo Ligando	Átomos Ligando
1	323A	HIS	4.25	Carboxylate	4087, 4088
2	449A	HIS	4.46	Carboxylate	4087, 4088

5.2.2 Acoplamiento ligando - diana terapéutica

En la Tabla 19 se observa que, de las moléculas similares a la cúrcuma, cuatro (ZINC18062842, ZINC18066836, ZINC05257255, ZINC17156357) tienen energía de acoplamiento menor que la cúrcuma (-7.6 kcal/mol) y tres (ZINC06552379, ZINC06639651, ZINC31829800) con energía menor que DHA (-7.1 kcal/mol)

Tabla 19 Energía de acoplamiento ligando-proteína para el receptor PPARG con moléculas similares a la cúrcuma.

Molécula	E (kcal/mol)
ZINC18062842	-9.9
ZINC18066836	-8.9
ZINC05257255	-8.2
ZINC17156357	-8.1
ZINC06552379	-7.5
ZINC06639651	-7.5
ZINC31829800	-7.2
ZINC44027235	-6.9
ZINC83203763	-6.5
ZINC04958285	-6.5

De las moléculas similares a DHA (Tabla 20) observamos que tres (ZINC95369153, ZINC95369154, ZINC95369677) tienen energía de acoplamiento menor que la cúrcuma y el DHA.

Tabla 20 Energía de acoplamiento ligando-proteína para el receptor PPARG con moléculas similares a DHA.

Molécula	E (kcal/mol)
ZINC95369153	-9.7
ZINC95369154	-8.8
ZINC95369677	-8.5
ZINC98088385	-7.0
ZINC75621890	-6.6
ZINC75621888	-6.6
ZINC98088383	-6.4
ZINC38435423	-6.1
ZINC98092116	-5.9
ZINC75601513	-5.8

5.2.3 Acoplamiento nutraceutico – diana terapéutica

Cuando analizamos la energía de acoplamiento de los nutraceutico con PPARG (Tabla 21) observamos que hay 20 posibles nutraceuticos (DB04789, DB00158, DB00116, DB00153, DB00146, DB00136, DB00169, DB00157, DB00171, DB01436, DB00163, DB01708, DB00140, DB00755, DB01322, DB00118, DB08887, DB00162, DB00758, DB00170) con energía de acoplamiento menor o igual a la cúrcuma (-7.6 kcal/mol) y a DHA (-7.1 kcal/mol).

Tabla 21 Nutraceuticos con menor energía de acoplamiento ligando-proteína para el receptor PPARG.

Molécula	E (kcal/mol)
DB04789	-9.5
DB00158	-9.4
DB00116	-9.3
DB00153	-9.1

Molécula	E (kcal/mol)
DB00136	-8.9
DB00146	-8.9
DB00169	-8.7
DB00157	-8.6
DB00171	-8.5
DB01436	-8.3
DB00163	-8.2
DB01708	-8.1
DB00140	-8.0
DB00755	-7.5
DB01322	-7.4
DB00118	-7.3
DB00162	-7.2
DB08887	-7.2
DB00170	-7.1
DB00758	-7.1
DB00131	-7.0
DB00159	-7.0
DB00168	-7.0
DB01992	-7.0

5.3. Carbonyl reductase [NADPH] 1 (CBR1)

Según leemos en *UniProt*⁵⁸, *Carbonyl reductase [NADPH] 1*, es una reductasa dependiente de NADPH que cataliza la reducción de una amplia variedad de compuestos carbonílicos, incluyendo quinonas, prostaglandinas, menadiona y varios xenobióticos. Cataliza la reducción de antraciclinas antitumoral, convierte prostaglandina E2 a prostaglandina F2- α y puede enlazar glutatión, lo que explica la gran afinidad por sustratos conjugados con glutatión. Cataliza también la reducción de *S-nitrosoglutatión*.

La estructura cristalina de la proteína descargada de PDB es **3BHI** *Crystal structure of human Carbonyl Reductase 1 in complex with NADP*, que contiene el ligando *Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato* (NADP). Este ligando se ha incluido en el análisis de acoplamiento para ver cómo se comparan con otras moléculas.

5.3.1 Evaluación del acoplamiento (*docking*) con el ligando cristalográfico

En el análisis con PLIP⁵⁹ de la interacción de CBR1 con NADP (Figura 10) se han identificado:

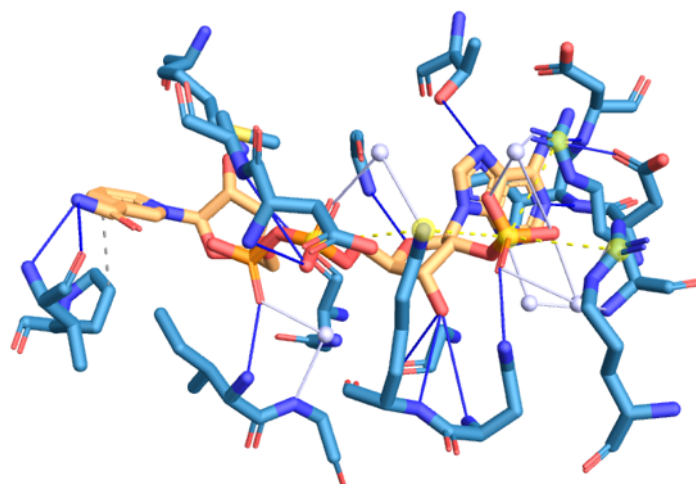


Figura 10 Interacciones proteína (CBR1; 3BHI) – ligando (NADP) identificadas con PLIP.

- Una interacción hidrofóbica (Tabla 22)

Tabla 22 Interacciones hidrofóbicas entre CBR1 y NADP.

	Residuo	AA	Distancia (Å)	Átomo Ligando	Átomo Proteína
1	227A	PRO	3.74	2146	1729

- Diecisiete puentes de hidrogeno (Tabla 23)

Tabla 23 Puentes de hidrogeno entre CBR1 y NADP.

	Residuo	AA	Distancia H-A (Å)	Distancia D-A (Å)	Ángulo
1	11A	GLY	2.88	3.37	112.34
2	13A	ASN	3.37	4.09	130.89
3	13A	ASN	1.76	2.73	169.89
4	14A	LYS	3.33	4.10	136.51
5	16A	ILE	1.80	2.75	161.01
6	37A	ARG	3.36	3.90	116.54
7	62A	ASP	1.97	2.78	138.48
8	63A	ILE	2.35	3.25	151.96
9	64A	ASP	3.27	4.00	132.00
10	89A	ASN	1.86	2.70	142.89
11	91A	GLY	2.57	3.50	156.40
12	112A	THR	3.00	3.94	164.25
13	197A	LYS	2.04	2.96	148.56
14	230A	VAL	2.11	3.08	170.22
15	230A	VAL	2.91	3.69	136.51
16	233A	ASP	3.09	3.62	115.09
17	234A	MET	3.25	4.01	135.70

- Seis puentes de agua (Tabla 24)

Tabla 24 Puentes de agua entre CBR1 y NADP.

	Residuo	AA	Distancia A-W (Å)	Distancia D-W (Å)	Ángulo Dador	Ángulo Agua	Átomo Agua
1	14A	LYS	3.30	2.97	119.09	102.52	2179
2	17A	GLY	2.83	2.82	145.22	89.71	2154
3	37A	ARG	3.04	2.91	159.32	81.47	2153
4	37A	ARG	2.70	3.54	111.59	75.95	2176
5	37A	ARG	3.98	3.47	128.37	133.40	2296
6	37A	ARG	2.87	3.47	128.37	137.44	2296
7	41A	ARG	3.64	3.77	130.41	113.91	2176

- Cuatro puentes salinos (Tabla 25)

Tabla 25 Puentes salinos entre CBR1 y NADP.

	Residuo	AA	Distancia (Å)	Grupo Ligando	Átomos Ligando
1	14A	LYS	4.79	Phosphate	2148, 2148, 2114, 2149, 2150, 2151
2	14A	LYS	5.08	Phosphate	2104, 2104, 2105, 2106, 2107, 2126
3	37A	ARG	4.21	Phosphate	2148, 2148, 2114, 2149, 2150, 2151
4	41A	ARG	4.53	Phosphate	2148, 2148, 2114, 2149, 2150, 2151

5.3.2 Acoplamiento ligando - diana terapéutica

El ligando NADP tiene una energía de acoplamiento con el receptor de -11.0 kcal/mol y la cúrcuma de -8.4 kcal/mol. En la Tabla 26 observamos que los ligandos ZINC18062842 y ZINC18066836 tienen energías de acoplamiento entre el NADP y la Cúrcuma. Existen además cinco moléculas (ZINC05257255, ZINC06639651, ZINC06552379, ZINC17156357, ZINC44027235) con energía de interacción entre -8.4 kcal/mol y -7.0 kcal/mol.

Tabla 26 Ligandos con menor energía de acoplamiento ligando-proteína para el receptor CBR1.

Molécula	E (kcal/mol)
ZINC18062842	-10.4
ZINC18066836	-8.9
ZINC05257255	-8.2
ZINC06639651	-8.2
ZINC06552379	-8.0
ZINC17156357	-7.8
ZINC44027235	-7.1
ZINC31829800	-6.9
ZINC04958285	-6.5
ZINC83203763	-6.0

5.3.3 Acoplamiento nutracéutico – diana terapéutica

El análisis de acoplamiento entre los nutracéuticos y CBR1 da como resultado diez nutracéuticos con energía de interacción entre -10.8 kcal/mol y -8.0 kcal/mol (Tabla 27).

Tabla 27 Nutracéuticos con menor energía de acoplamiento ligando-proteína para el receptor CBR1.

Molécula	E (kcal/mol)
DB00157	-10.8
DB00158	-9.8
DB04789	-9.7
DB00116	-9.6
DB00171	-9.2
DB00131	-8.7
DB00136	-8.3
DB00140	-8.1
DB01436	-8.1
DB01992	-8.0

5.4. Glutathione S-transferase P (GSTP1) - Glutatión

Glutathione S-transferase P (GSTP1) agrupa el glutatión reducido con un amplio número de electrófilos hidrofóbicos exógenos y endógenos. Asimismo, regula negativamente la actividad de CDK25 vía translocación p25/p35 para prevenir la neurodegeneración (*UniProt*⁵⁸).

La estructura de la proteína la descargamos de la entrada de PDB **18GS** *Human Pyruvate Carboxylase (missing the biotin carboxylase domain at the N-terminus)*, que incluye los ligandos s-(2,4-dinitrofenil)glutatión [GDN] y ácido 2-(n-morfolino)etanosulfónico [MES].

5.4.1 Evaluación del acoplamiento (*docking*) con el ligando cristalográfico

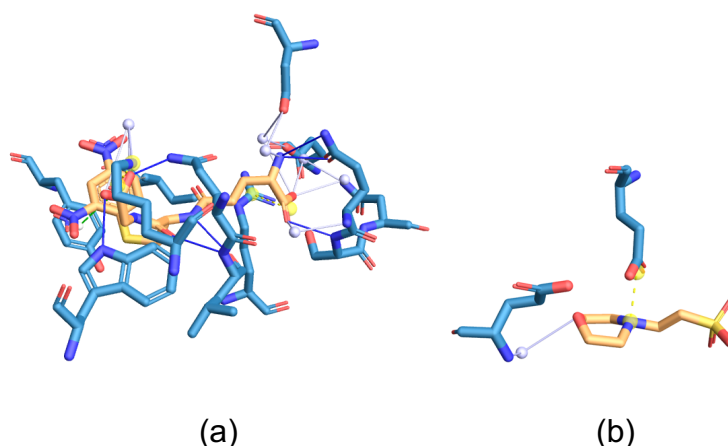


Figura 11 Interacciones (a) proteína (GSTP1) – ligando (glutatión) (b) proteína (GSTP1) – ligando (MES) identificadas con PLIP.

En el análisis con PLIP⁵⁹ de la interacción de GSTP1 con el ligando glutatión (Figura 11a) se han identificado:

- Una interacción hidrofóbica (Tabla 28)

Tabla 28 Interacciones hidrofóbicas entre GSTP y glutatión.

	Residuo	AA	Distancia (Å)	Átomo Ligando	Átomo Proteína
1	104A	ILE	3.72	3289	818

- Siete puentes de hidrogeno (Tabla 29)

Tabla 29 Puentes de hidrogeno entre GSTP y glutatión.

	Residuo	AA	Distancia H-A (Å)	Distancia D-A (Å)	Ángulo
1	38A	TRP	2.14	2.95	144.73
2	51A	GLN	2.02	3.00	171.85
3	52A	LEU	2.08	3.07	175.67
4	52A	LEU	2.11	2.98	145.50
5	64A	GLN	3.26	3.75	112.47
6	64A	GLN	1.74	2.72	158.46
7	65A	SER	1.84	2.80	164.29

- Nueve puentes de agua (Tabla 30)

Tabla 30 Puentes de agua entre GSTP y glutatión.

	Residuo	AA	Distancia A-W (Å)	Distancia D-W (Å)	Ángulo Dador	Ángulo Agua	Átomo Agua
1	44A	LYS	2.69	3.49	130.52	97.98	3604
2	44A	LYS	3.85	3.49	130.52	122.56	3604
3	64A	GLN	3.89	2.75	139.29	118.75	3429
4	64A	GLN	2.83	2.80	148.43	75.83	3357
5	66A	ASN	2.75	3.30	116.67	75.38	3429
6	66A	ASN	3.11	3.06	128.40	75.52	3397
7	97A	GLU	3.46	3.78	157.21	96.21	3522
8	98B	ASP	3.91	3.78	157.21	91.04	3522
9	98B	ASP	3.73	3.46	112.22	119.31	3366

- Una interacción π - π (Tabla 31)

Tabla 31 Interacción π - π entre GSTP y glutatión.

	Residuo	AA	Distancia (Å)	Angulo	Tipo	Átomos Ligando
1	108A	TYR	4.14	20.23	P	3285, 3286, 3287, 3288, 3289, 3290

- Dos puentes salinos (Tabla 32)

Tabla 32 Puentes salino entre GSTP y glutatión.

	Residuo	AA	Distancia (Å)	Grupo Ligando	Átomos Ligando
1	13A	ARG	4.36	Carboxylate	3268, 3269
2	44A	LYS	3.06	Carboxylate	3283, 3284

En la interacción de GSTP1 con el ligando MES (Figura 11b) se identifican:

- Un puente de agua (Tabla 33)

Tabla 33 Puente de agua entre GSTP y MES.

	Residuo	AA	Distancia A-W (Å)	Distancia D-W (Å)	Ángulo Dador	Ángulo Agua	Átomo Agua
1	30A	GLU	3.44	2.91	175.14	97.34	3394

- Un puente salino (Tabla 34)

Tabla 34 Puentes salino entre GSTP y MES.

	Residuo	AA	Distancia (Å)	Grupo Ligando	Átomos Ligando
1	197A	GLU	2.52	Tertamine	3300

5.4.2 Acoplamiento ligando - diana terapéutica

Observamos en la Tabla 35 que existen tres ligandos (ZINC18062842, ZINC18066836, ZINC05257255) con energía de interacción menor que la cúrcuma (-7.1 kcal/mol), dos ligandos (ZINC17156357, ZINC06552379) con energía de interacción entre la de la cúrcuma y GDN (-6.6 kcal/mol) y cinco moléculas con energía de interacción entre GDN y MES (-4.7 kcal/mol).

Tabla 35 Ligandos con menor energía de acoplamiento ligando-proteína para el receptor GSTP1 con moléculas similares a la cúrcuma.

Molécula	E (kcal/mol)
ZINC18062842	-9.2
ZINC18066836	-7.3
ZINC05257255	-7.2
ZINC17156357	-6.8
ZINC06552379	-6.7
ZINC06639651	-6.5
ZINC31829800	-6.4
ZINC83203763	-5.9
ZINC04958285	-5.9
ZINC44027235	-5.8

5.4.3 Acoplamiento nutracéutico – diana terapéutica

De los nutracéuticos analizados, 26 tienen energía de interacción ≤ -7.0 kcal/mol (Tabla 36).

Tabla 36 Nutracéuticos con menor energía de acoplamiento ligando-proteína para el receptor GSTP1.

Molécula	E (kcal/mol)
DB00153	-8.4
DB00116	-8.2
DB01708	-8.2
DB06747	-8.2
DB00146	-8.1
DB06755	-8.0
DB00169	-7.8
DB06743	-7.8
DB06744	-7.8
DB06745	-7.8
DB06746	-7.8
DB00136	-7.7
DB00137	-7.7
DB00140	-7.7
DB00157	-7.7
DB00158	-7.7
DB04789	-7.7
DB01436	-7.6
DB06750	-7.6
DB00162	-7.4
DB00755	-7.4
DB01322	-7.3
DB06748	-7.3
DB01892	-7.1
DB00163	-7.0
DB00758	-7.0

5.5. Pyruvate carboxylase (PC)

Pyruvate carboxylase cataliza una reacción de dos pasos que incluye, en un primero, la carboxilación dependiente de ATP de la biotina enlazada covalentemente, seguido de la transferencia del grupo carboxilo al piruvato. Cataliza las reacciones iniciales de síntesis de glucosa a partir de piruvato (hígado, riñones) y lípidos (tejido adiposo, hígado, cerebro). Provoca el incremento de producción de ATP en neuronas y astrocitos (*UniProt*⁵⁸).

La estructura de la proteína se ha descargado de la entrada PDB **3BG3** *Crystal Structure of Human Pyruvate Carboxylase (missing the biotin carboxylase domain at the N-terminus)*, que tiene asociados los ligandos biotina y ácido pirúvico.

5.5.1 Evaluación del acoplamiento (*docking*) con el ligando cristalográfico

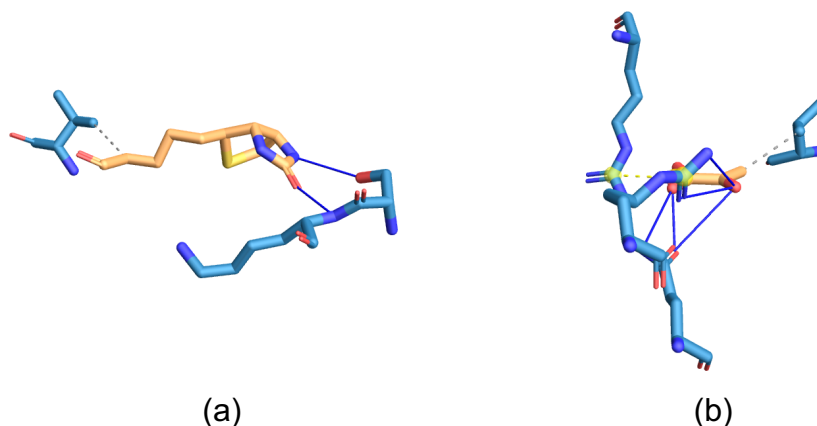


Figura 12 Interacciones (a) proteína (PC) – ligando (biotina) y (b) proteína (PC) – ligando (ácido pirúvico) identificadas con PLIP.

En el análisis con PLIP⁵⁹ de la interacción PC-biotina (Figura 12a) se identifican:

- Una interacción hidrofóbica (Tabla 37)

Tabla 37 Interacciones hidrofóbicas entre PC y biotina.

	Residuo	AA	Distancia (Å)	Átomo Ligando	Átomo Proteína
1	614B	VAL	3.89	19784	6159

- Dos puentes de hidrógeno (Tabla 38)

Tabla 38 Puentes de hidrógeno entre PC y biotina.

	Residuo	AA	Distancia H-A (Å)	Distancia D-A (Å)	Ángulo
1	911B	SER	3.34	3.77	109.42
2	912B	LYS	2.65	3.11	108.50

Y en la interacción PC – ácido pirúvico (Figura 12b) se observan:

- Una interacción hidrofóbica (Tabla 39)

Tabla 39 Interacciones hidrofóbicas entre PC y ácido pirúvico.

	Residuo	AA	Distancia (Å)	Átomo Ligando	Átomo Proteína
1	907A	VAL	3.65	19781	3176

- Cinco puentes de hidrógeno (Tabla 40)

Tabla 40 Puentes de hidrógeno entre PC y ácido pirúvico.

	Residuo	AA	Distancia H-A (Å)	Distancia D-A (Å)	Ángulo
1	571A	ARG	3.26	4.08	142.06
2	571A	ARG	2.58	3.56	173.02
3	575A	GLN	3.12	3.71	120.16
4	575A	GLN	2.31	2.73	106.42
5	575A	GLN	3.16	3.77	122.02

- Dos puentes salinos (Tabla 41)

Tabla 41 Puentes salinos entre PC y ácido pirúvico.

	Residue	AA	Distance	Ligand Group	Ligand Atoms
1	571A	ARG	5.00	Carboxylate	19777, 19778
2	644A	ARG	3.47	Carboxylate	19777, 19778

5.5.2 Acoplamiento ligando - diana terapéutica

De los resultados obtenidos del acoplamiento de la proteína PC con las moléculas similares a la biotina BTI (Tabla 42), ocho (DB00121, ZINC19981565, ZINC43511211, ZINC02565014, ZINC01580603, ZINC71722840, ZINC40566041, ZINC70502483) tienen una energía de acoplamiento menor que la biotina (-3.5 kcal/mol).

Tabla 42 Ligandos con menor energía de acoplamiento ligando-proteína para el receptor PC con moléculas similares a la biotina.

Molécula	E (kcal/mol)
DB00121	-4.1
ZINC19981565	-3.9
ZINC02565014	-3.9
ZINC43511211	-3.9
ZINC71722840	-3.8
ZINC01580603	-3.8
ZINC40566041	-3.7
ZINC70502483	-3.6
ZINC42445105	-3.4
DB03775	-2.9

5.5.3 Acoplamiento nutracéutico – diana terapéutica

De los nutracéuticos analizados, 47 (Tabla 43) tienen energía de acoplamiento menor que la biotina (-3.5 kcal/mol).

Tabla 43 Nutracéuticos con menor energía de acoplamiento ligando-proteína para el receptor PC.

Molécula	E (kcal/mol)
DB00157	-5.4
DB00116	-5.0
DB00136	-5.0
DB04789	-5.0
DB06745	-5.0
DB06746	-5.0
DB06743	-4.9
DB06747	-4.9
DB00140	-4.8
DB06744	-4.8
DB00146	-4.7
DB00153	-4.6
DB00158	-4.6
DB00171	-4.6
DB06748	-4.6
DB06749	-4.6
DB00118	-4.5
DB00169	-4.4
DB01892	-4.4
DB06750	-4.3
DB00131	-4.2
DB00162	-4.2
DB00755	-4.2
DB01322	-4.2
DB00170	-4.1
DB01708	-4.1
DB02959	-4.1
DB00114	-4.0
DB00121	-4.0
DB00168	-3.9
DB06755	-3.9
DB00147	-3.8
DB00758	-3.8
DB00126	-3.7
DB00137	-3.7
DB00144	-3.7
DB00150	-3.7
DB00152	-3.7
DB00165	-3.7
DB01065	-3.7

6 Evaluación basada en el receptor (*receptor-based screening*)

Se ha analizado el acoplamiento de los nutraceuticos encontrados en *DrugBank* con los receptores (dianas terapéuticas) de medicamentos aprobados o en vías de investigación para la esclerosis múltiple que se detallan en la Tabla 8. Estos receptores son dianas terapéuticas encontradas en *Therapeutic Target Database*¹⁵, cuyos medicamentos son moléculas químicas pequeñas y no anticuerpos.

6.1. Apoptosis regulator Bcl-2 (BCL2)

En *UniProt*⁵⁸ se indica que Bcl-2 suprime la apoptosis en una variedad de sistemas celulares, incluyendo células neuronales. Regula la muerte celular controlando la permeabilidad de la membrana celular. Puede disminuir la inflamación limitando la actividad del inflammasoma NLRP1, y, por consiguiente, la activación CASP1 y la liberación de IL1B.

La estructura de la proteína se ha obtenido de la entrada de PDB **5JSN** *Bcl2-inhibitor complex*. El medicamento asociado a este receptor es MCI-186. En la Figura 13 se muestra el acoplamiento de BCL2 y MCI-186.

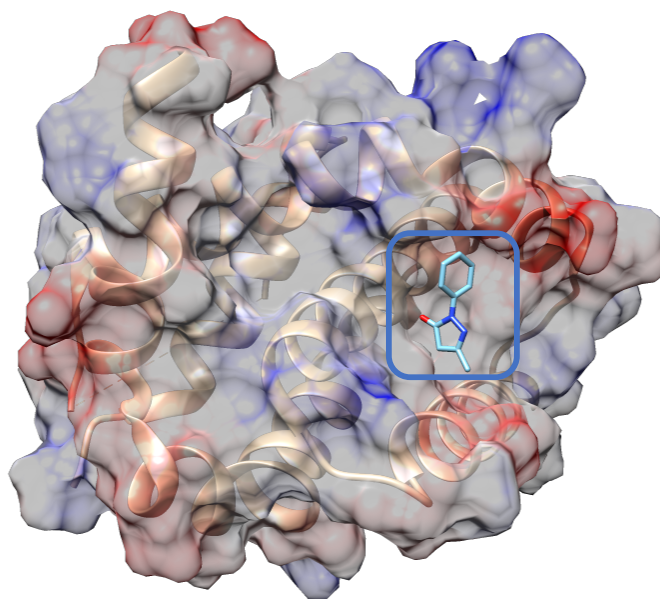


Figura 13 Acoplamiento BCL2 – MCI-186.

De los nutraceuticos analizados, 38 tienen energía de acoplamiento menor que MCI-186 (-5.6 kcal/mol). En la Tabla 44 se muestran lo que tienen energía de acoplamiento menor que -7.0 kcal/mol.

Tabla 44 Nutracéuticos con menor energía de acoplamiento ligando-proteína para el receptor BCL2.

Molécula	E (kcal/mol)
DB06749	-8.4
DB06748	-8.2
DB06755	-8.2
DB00137	-8.0
DB00153	-7.9
DB06750	-7.7
DB06743	-7.6
DB00169	-7.5
DB00146	-7.4
DB00157	-7.4
DB06744	-7.4
DB04789	-7.3
DB06747	-7.3
DB00116	-7.1
DB01436	-7.1
DB01708	-7.1
DB06745	-7.1
DB06746	-7.1
DB00158	-7.0

6.2. Sphingosine 1-phosphate receptor 1 (S1PR1)

Según se lee en *UniProt*⁵⁸, S1PR1 es un receptor acoplado a la proteína G por el *lysosphingolipid sphingosine 1-phosphate* (S1P). La señalización lleva a la activación de RAC1, SRC, PTK2/FAK1 y MAP. Juega un papel importante en la migración celular. Se requiere para la quimiotaxis de la esfingosina 1-fosfato. Entre los múltiples mecanismos en los que está implicado este receptor, se requiere para salida de células T maduras desde el timo al corriente sanguíneo y a los órganos linfáticos periféricos.

La estructura cristalina de la proteína se ha obtenido de la estructura cristalina **3V2Y** *Crystal Structure of a Lipid G protein-Coupled Receptor at 2.80 Å*. Esta estructura tiene como ligandos N-acetil-d-glucosamina (NAG) y ácido {(3R)-3-amino-4-[(3-hexilphenyl)amino]-4-oxobutil}fosfónico (ML5). El medicamento asociado a este receptor es fingolimod. En la Figura 14 se muestra el acoplamiento de S1PR1 y fingolimod.

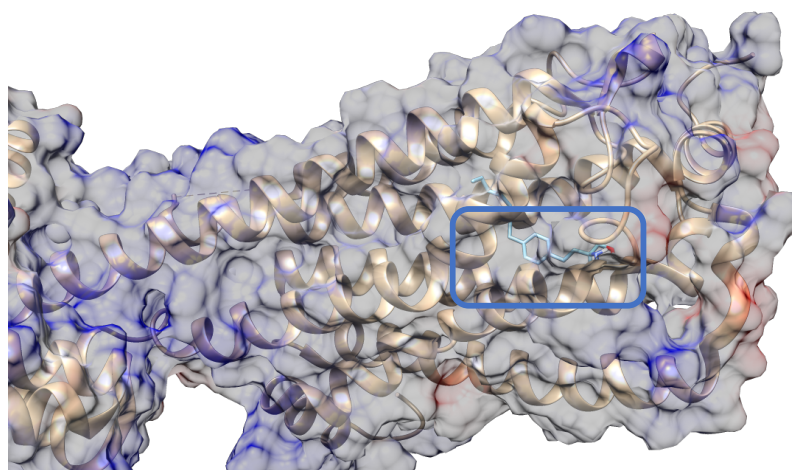


Figura 14 Acoplamiento S1PR1 – Fingolimod.

De los nutraceuticos estudiados 28 tienen energía de acoplamiento menor a fingolimod (-7.2 kcal/mol). En la Tabla 45 se muestran las moléculas con energía de acoplamiento ≤ -7.0 kcal/mol.

Tabla 45 Nutraceuticos con menor energía de acoplamiento ligando-proteína para el receptor S1PR1.

Molécula	E (kcal/mol)
DB00169	-9.6
DB01436	-9.6
DB00157	-9.4
DB04789	-9.1
DB00136	-9.0
DB00116	-8.7
DB00171	-8.7
DB00146	-8.6
DB00163	-8.5
DB00755	-8.5
DB01992	-8.5
DB00158	-8.4
DB00131	-8.3
DB00140	-8.3
DB06745	-8.3
DB00153	-7.9
DB00159	-7.8
DB01708	-7.8
DB00162	-7.7
DB08887	-7.7
DB01322	-7.6
DB06743	-7.6
DB06744	-7.6
DB00118	-7.4
DB00168	-7.3
DB00132	-7.2
DB00137	-7.2
DB00758	-7.2
DB01065	-7.0

6.3. Tumor necrosis factor (TNF)

TNF es una citoquina que interacciona con TNFRSF1A/TNFR1 y TNFRSF1B/TNFR. Es liberada por los macrófagos y puede inducir la muerte celular. Es un potente pirógeno que causa fiebre por efecto directo o por estimulación de la secreción de interleuquina-1. Puede estimular la proliferación celular e inducir la diferenciación celular. Limita la función de las células T reguladoras (Treg) vía desfosforilación de FOXP3 (*UniProt*⁵⁸).

La estructura de la proteína se ha obtenido de la entrada de PDB **1TNF** *The Structure of Tumor Necrosis Factor-Alpha at 2.6 Angstroms Resolution*. El medicamento asociado a este receptor es el celastrol. En la Figura 15 se muestra el acoplamiento de TNF y celastrol.

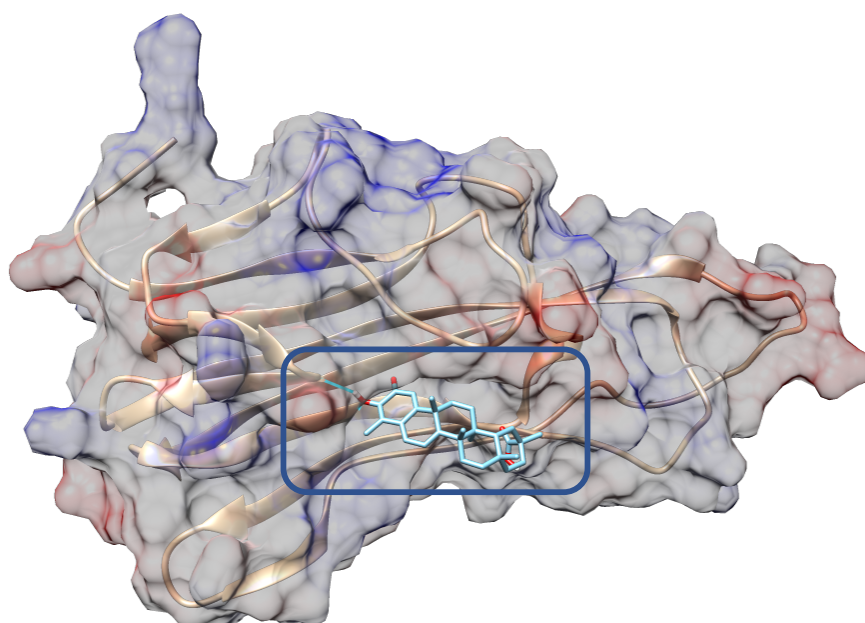


Figura 15 Acoplamiento TNF – Celastrol.

Observamos que la energía de acoplamiento del celastrol con el receptor es de -7.7 kcal/mol. De los nutraceuticos estudiados, todos tienen una energía de acoplamiento mayor, pero cercana al celastrol (Tabla 46). En concreto hay seis moléculas (DB06748, DB00137, DB00116, DB00157, DB06755, DB04789) que tienen energía de acoplamiento entre -7.7 y -7.0 kcal/mol.

Tabla 46 Nutraceuticos con menor energía de acoplamiento ligando-proteína para el receptor TNF.

Molécula	E (kcal/mol)
DB06748	-7.6
DB00137	-7.5
DB00116	-7.4
DB00157	-7.2
DB04789	-7.0
DB06755	-7.0

6.4. Interferon gamma (IFNG)

IFN-gamma produce linfocitos activados por antígenos o mitógenos específicos. Adicionalmente, tiene actividad antiviral e importantes funciones inmunoreguladoras. Es un activador potente de macrófagos, tiene efecto antiproliferativo en células transformadas y puede potenciar el efecto antiviral y antitumoral de los interferones tipo I (*UniProt*⁵⁸).

Se ha descargado la estructura de la proteína de la entrada PDB **1EKU** *Crystal Structure of a Biologically Active Single Chain Mutant of Human IFN-Gamma*. El medicamento asociado a es el ácido fumárico (Fumaric Acid). En la Figura 16 se muestra el acoplamiento de IFNG y el ácido fumárico.

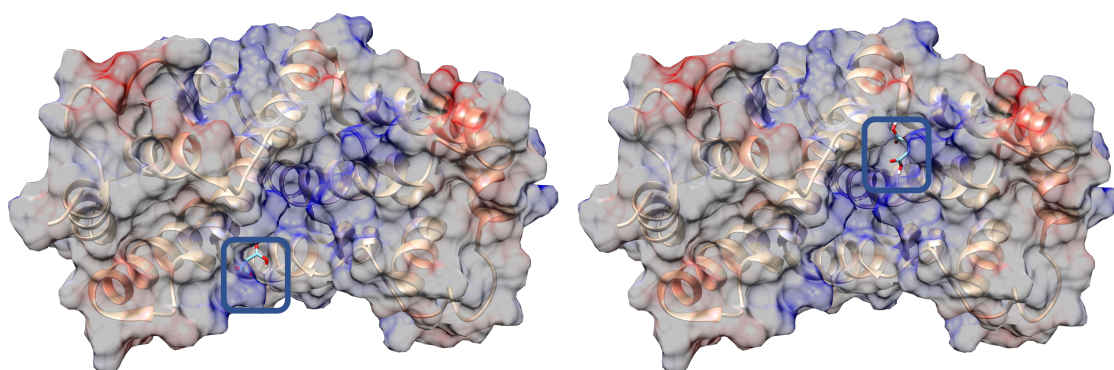


Figura 16 Acoplamiento IFNG – ácido fumárico.

De los nutraceuticos analizados, la mayoría (75) tienen energía de acoplamiento menor que el ácido fumárico (-3.9 kcal/mol). En la Tabla 47 se muestran los nutraceuticos con energía de acoplamiento < -7.0 kcal/mol.

Tabla 47 Nutraceuticos con menor energía de acoplamiento ligando-proteína para el receptor IFNG.

Molécula	E (kcal/mol)
DB00157	-8.4
DB00137	-8.2
DB06749	-7.7
DB06755	-7.7
DB00158	-7.5
DB00153	-7.3
DB00755	-7.3
DB06748	-7.3
DB01708	-7.2
DB04789	-7.2

7 Conclusiones

La investigación ha seguido, en líneas generales, el planteamiento inicial de tareas a realizar. Se planeó estudiar los mecanismo y proteínas implicadas en la aparición y desarrollo de las enfermedades autoinmunes y en concreto de la esclerosis múltiple, para poder identificar las dianas terapéuticas asociadas a la enfermedad. Este análisis, dio como resultado un amplio número de mecanismos y posibles dianas terapéuticas, lo que dificultó en un primer momento la identificación de los receptores a estudiar.

La búsqueda de nutraceuticos en relación al tratamiento de la esclerosis múltiple en *DrugBank*, resultó en cuatro nutraceuticos (vitamina D3, cúrcuma, omega 3, biotina) con cinco receptores asociados a la enfermedad (VDR, PPAR γ , CBR1, GSTP1, PC). Estos nutraceuticos sirvieron como moléculas de referencia para un análisis de semejanza con el objetivo de encontrar moléculas y/o nutraceuticos similares que se acoplaran con las dianas terapéuticas definidas. La selección de los nutraceuticos originales se realizó en base a las publicaciones existentes en *PubMed* que relacionaran el nutraceutico con la esclerosis múltiple. Asimismo, se intentaron escoger nutraceuticos de origen diverso, limitando el número de vitaminas incluidas a dos (vitamina D3 y biotina). Se podrían haber seleccionado otras moléculas de origen y estudios posteriores podrían incluir otros nutraceuticos. Asimismo, del listado de receptores seleccionados, podría ampliarse y realizar un análisis de acoplamiento con otras proteínas.

Paralelamente, la búsqueda de dianas terapéuticas asociadas a la esclerosis múltiple en TTP resultó en diversos receptores, de los cuales se escogieron las cuatro (BCL2, S1PR1, TNF, IFNG) contra los que existen medicamentos basados en moléculas sencillas (MCI-186, fingolimod, celastrol, ácido fumárico). Estas dianas terapéuticas se utilizaron como receptores contra los que realizar un análisis de acoplamiento de nutraceuticos. Se podrían haber escogido otras dianas terapéuticas y evaluar el nivel de acoplamiento de los nutraceuticos contra las mismas, aunque en este caso no se tendría la referencia de moléculas sencillas ya existentes y con conocida eficacia.

Tras el análisis de semejanza realizado sobre los nutraceuticos seleccionados, se obtuvieron diversas moléculas similares a los nutraceuticos de interés, de las cuales se seleccionaron aquellas que tienen las propiedades ADMET de capacidad terapéutica, biodisponibilidad y accesibilidad sintética deseadas. Se podrían haber elegido otras propiedades ADMET para seleccionar moléculas. Inicialmente, se había previsto que el análisis ADMET se realizara únicamente en las moléculas que tuvieran energías de acoplamiento favorables con los receptores de interés, pero durante la realización del trabajo se consideró que se podrían utilizar las propiedades ADMET para establecer criterios de selección y reducir el número de moléculas con las que llevar a cabo los estudios de acoplamiento. Para limitar el número de moléculas a evaluar, se realizó una agrupación en diez grupos por *k-medoides* y se escogieron diez moléculas representativas. Los procesos de selección, agrupación por *k-medoides* y

extracción de ficheros de las moléculas escogidas se realizaron utilizando el programa *KNIME*, lo cual no se tenía previsto inicialmente.

Paralelamente, se identificaron todos los nutraceuticos recogidos en la base de datos *DrugBank*.

Finalmente, el análisis de acoplamiento de las moléculas seleccionadas con las dianas terapéuticas de interés, ha permitido encontrar moléculas y nutraceuticos con energías de acoplamiento menores (valor absoluto mayor) o similares a los de los nutraceuticos y medicamentos de referencia. Ello sugiere que estas moléculas podrían ser candidatas a análisis de eficacia para el tratamiento de la esclerosis múltiple.

Como continuación de este estudio, se propone analizar el tipo de enlace (*binding mode*) de los receptores con las moléculas y nutraceuticos seleccionados y compararlo con el de las moléculas y nutraceuticos de referencia, para ver que el tipo de enlace se mantiene.

A partir de los resultados obtenidos, se podrían iniciar estudios experimentales en los que se evaluara la actividad de estas moléculas sobre las dianas terapéuticas de interés, determinar una posible eficacia y plantear estudios de toxicidad.

Asimismo, durante esta investigación se ha podido ver que existen múltiples mecanismos implicados en la enfermedad. Futuros estudios deberían evaluar otras dianas terapéuticas o moléculas que no se han incluido en este análisis.

8 Glosario

ADMET:	Absorción, distribución, metabolismo y excreción.
ALS:	<i>Amyotrophic Lateral Sclerosis</i> .
BBB:	<i>Blood Brain Barrer</i> , barrera hematoencefálica.
BCL2:	Apoptosis regulator Bcl-2.
CBR1:	Carbonyl reductase [NADPH] 1.
CMH:	Complejo Mayor de Histocompatibilidad.
CPA:	Células presentadoras de antígeno.
CTL:	Cytotoxic T lymphocyte.
DC:	Dendritic cells.
DHA:	Ácido docosahexaenoico.
EBV:	Virus Epstein-Barr.
EM:	Esclerosis múltiple.
GDN:	Glutación s-(2,4 dinitrobenceno).
GSTP1:	Glutathione S-transferase P.
HDL:	Lipoproteínas de alta densidad.
IFNG:	Interferon gamma.
LDL:	Low-density lipoproteins.
LES:	Lupus eritematoso sistémico.
MAG:	Myelin associated glycoprotein.
MES:	Ácido 2-(n-morfolino)-etanesulfónico.
ML5:	Ácido {(3R)-3-amino-4-[(3-hexilphenyl)amino]-4- oxobutil}fosfónico.
NAG:	N-acetil-d-glucosamina.
NF-kB:	Factor nuclear kappa B.
ODC:	Oligodendrocitos.
PARP:	Poly (ADN-ribose) polimerasa.
PC:	Pyruvate carboxylase.
PDB:	Protein Data Bank.
PLIP:	Protein-Ligand Interaction Profiler.
PPARG:	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma.
PPMS:	Primary Progressive Multiple Sclerosis.
PRMS:	Progressive Relapse Multiple Sclerosis.
PTI:	Púrpura trombocitopénica inmune.
RRMS:	Relapsing Remitent Multiple Sclerosis.
S1PR1:	Sphingosine 1-phosphate receptor 1.
SCA:	Síndrome clínico aislado.
SCN:	Sistema central nervioso.
SPMS:	Secondary Progressive Multiple Sclerosis.
Th:	Células T colaboradoras.
TNF:	Tumor necrosis factor.
Treg:	Células T reguladoras.
TTD:	<i>Therapeutic Target Database</i> .
VDR:	Vitamin D receptor.

9 Bibliografía

1. Autoimmune Disease Statistics • AARDA. *AARDA* (2016).
2. Autoimmune Statistics. *The Autoimmune Registry* Available at: <http://www.autoimmuneregistry.org/autoimmune-statistics/>. (Accessed: 28th September 2017)
3. Autoimmune Diseases | NIH: National Institute of Allergy and Infectious Diseases. Available at: <https://www.niaid.nih.gov/diseases-conditions/autoimmune-diseases>. (Accessed: 28th September 2017)
4. Multiple Sclerosis Information Page | National Institute of Neurological Disorders and Stroke. Available at: <https://www.ninds.nih.gov/Disorders/All-Disorders/Multiple-Sclerosis-Information-Page>. (Accessed: 28th September 2017)
5. ClinicalTrials.gov. Available at: https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=Multiple+Sclerosis&Search=Apply&recrs=b&recrs=a&recrs=d&age_v=&gndr=&type=&rslt=. (Accessed: 28th September 2017)
6. Wu, H.-J. & Wu, E. The role of gut microbiota in immune homeostasis and autoimmunity. *Gut Microbes* **3**, 4–14 (2012).
7. Vieira, S. M., Pagovich, O. E. & Kriegel, M. A. Diet, Microbiota and Autoimmune Diseases. *Lupus* **23**, 518–526 (2014).
8. Kau, A. L., Ahern, P. P., Griffin, N. W., Goodman, A. L. & Gordon, J. I. Human nutrition, the gut microbiome and the immune system. *Nature* **474**, 327–336 (2011).
9. von Geldern, G. & Mowry, E. M. The influence of nutritional factors on the prognosis of multiple sclerosis. *Nat. Rev. Neurol.* **8**, 678–689 (2012).
10. Farinotti, M. *et al.* Dietary interventions for multiple sclerosis. *Cochrane Database Syst. Rev.* **12**, CD004192 (2012).
11. Alharbi, F. M. Update in vitamin D and multiple sclerosis. *Neurosciences* **20**, 329–335 (2015).
12. Bright, J. J. Curcumin and autoimmune disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* **595**, 425–451 (2007).
13. pubmeddev. Home - PubMed - NCBI. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>. (Accessed: 21st October 2017)
14. DrugBank. Available at: <https://www.drugbank.ca/>. (Accessed: 21st October 2017)
15. Chen, X., Ji, Z. L. & Chen, Y. Z. TTD: Therapeutic Target Database. *Nucleic Acids Res.* **30**, 412–415 (2002).
16. Li, Y. H. *et al.* Therapeutic target database update 2018: enriched resource for facilitating bench-to-clinic research of targeted therapeutics. *Nucleic Acids Res.* (2017). doi:10.1093/nar/gkx1076
17. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. Available at: <http://www.kegg.jp/>. (Accessed: 26th October 2017)
18. Kanehisa, M. & Goto, S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res.* **28**, 27–30 (2000).
19. Kanehisa, M., Sato, Y., Kawashima, M., Furumichi, M. & Tanabe, M. KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. *Nucleic Acids Res.* **44**, D457–462 (2016).

20. Kanehisa, M., Furumichi, M., Tanabe, M., Sato, Y. & Morishima, K. KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic Acids Res.* **45**, D353–D361 (2017).
21. Gfeller, D. *et al.* SwissTargetPrediction: a web server for target prediction of bioactive small molecules. *Nucleic Acids Res.* **42**, W32–W38 (2014).
22. Pettersen, E. F. *et al.* UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **25**, 1605–1612 (2004).
23. Trott, O. & Olson, A. J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput. Chem.* **31**, 455–461 (2010).
24. Zoete, V., Daina, A., Bovigny, C. & Michielin, O. SwissSimilarity: A Web Tool for Low to Ultra High Throughput Ligand-Based Virtual Screening. *J. Chem. Inf. Model.* **56**, 1399–1404 (2016).
25. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific Reports* Available at: <https://www.nature.com/articles/srep42717>. (Accessed: 21st November 2017)
26. Yamamoto, K. Mechanisms of Autoimmunity. *J. Jpn. Med. Assoc.* **47**, 403–406 (2004).
27. Rosenblum, M. D., Remedios, K. A. & Abbas, A. K. Mechanisms of human autoimmunity. *J. Clin. Invest.* **125**, 2228–2233 (2015).
28. Tzivion, G. Medical Microbiology & Immunology. (2015).
29. Miljković, D. & Spasojević, I. Multiple sclerosis: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Antioxid. Redox Signal.* **19**, 2286–2334 (2013).
30. Bolon, B. Cellular and molecular mechanisms of autoimmune disease. *Toxicol. Pathol.* **40**, 216–229 (2012).
31. Gaby, A. Multiple sclerosis. *Glob. Adv. Health Med.* **2**, 50–56 (2013).
32. Heidker, R. M., Emerson, M. R. & LeVine, S. M. Metabolic pathways as possible therapeutic targets for progressive multiple sclerosis. *Neural Regen. Res.* **12**, 1262–1267 (2017).
33. Lucchinetti, C. *et al.* Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann. Neurol.* **47**, 707–717 (2000).
34. Carson, M. J., Doose, J. M., Melchior, B., Schmid, C. D. & Ploix, C. C. CNS immune privilege: hiding in plain sight. *Immunol. Rev.* **213**, 48–65 (2006).
35. Rodriguez, M. *Advances in Multiple Sclerosis and Experimental Demyelinating Diseases*. (Springer Science & Business Media, 2007).
36. McFarland, H. F. & Martin, R. Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. *Nat. Immunol.* **8**, ni1507 (2007).
37. Lopez-Diego, R. S. & Weiner, H. L. Novel therapeutic strategies for multiple sclerosis — a multifaceted adversary. *Nat. Rev. Drug Discov.* **7**, 909–925 (2008).
38. Steinman, L. & Zamvil, S. Transcriptional analysis of targets in multiple sclerosis. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 483–492 (2003).
39. Haghikia, A., Hohlfeld, R., Gold, R. & Fugger, L. Therapies for multiple sclerosis: translational achievements and outstanding needs. *Trends Mol. Med.* **19**, 309–319 (2013).
40. Steinman, L., Merrill, J. T., McInnes, I. B. & Peakman, M. Optimization of current and future therapy for autoimmune diseases. *Nat. Med.* **18**, 59–65 (2012).

41. Danikowski, K. M., Jayaraman, S. & Prabhakar, B. S. Regulatory T cells in multiple sclerosis and myasthenia gravis. *J. Neuroinflammation* **14**, 117 (2017).
42. Buzzard, K. A., Broadley, S. A. & Butzkueven, H. What Do Effective Treatments for Multiple Sclerosis Tell Us about the Molecular Mechanisms Involved in Pathogenesis? *Int. J. Mol. Sci.* **13**, 12665–12709 (2012).
43. Pantzaris, M. C., Loukaides, G. N., Ntzani, E. E. & Patrikios, I. S. A novel oral nutraceutical formula of omega-3 and omega-6 fatty acids with vitamins (PLP10) in relapsing remitting multiple sclerosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled proof-of-concept clinical trial. *BMJ Open* **3**, (2013).
44. Wishart, D. S. *et al.* DrugBank: a comprehensive resource for in silico drug discovery and exploration. *Nucleic Acids Res.* **34**, D668-672 (2006).
45. Wishart, D. S. *et al.* DrugBank: a knowledgebase for drugs, drug actions and drug targets. *Nucleic Acids Res.* **36**, D901-906 (2008).
46. Law, V. *et al.* DrugBank 4.0: shedding new light on drug metabolism. *Nucleic Acids Res.* **42**, D1091-1097 (2014).
47. Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W. & Feeney, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **46**, 3–26 (2001).
48. Ghose, A. K., Viswanadhan, V. N. & Wendoloski, J. J. A knowledge-based approach in designing combinatorial or medicinal chemistry libraries for drug discovery. 1. A qualitative and quantitative characterization of known drug databases. *J. Comb. Chem.* **1**, 55–68 (1999).
49. Veber, D. F. *et al.* Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *J. Med. Chem.* **45**, 2615–2623 (2002).
50. Egan, W. J., Merz, Kenneth M. & Baldwin, J. J. Prediction of Drug Absorption Using Multivariate Statistics. *J. Med. Chem.* **43**, 3867–3877 (2000).
51. Muegge, I., Heald, S. L. & Brittelli, D. Simple selection criteria for drug-like chemical matter. *J. Med. Chem.* **44**, 1841–1846 (2001).
52. Martin, Y. C. A bioavailability score. *J. Med. Chem.* **48**, 3164–3170 (2005).
53. The PubChem Project. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. (Accessed: 21st October 2017)
54. Berthold, M. R. *et al.* KNIME: The Konstanz Information Miner. in *Data Analysis, Machine Learning and Applications* 319–326 (Springer, Berlin, Heidelberg, 2008). doi:10.1007/978-3-540-78246-9_38
55. Berman, H. M. *et al.* The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* **28**, 235–242 (2000).
56. Morris, G. M. *et al.* AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. *J. Comput. Chem.* **30**, 2785–2791 (2009).
57. Sanner, M. F. Python: a programming language for software integration and development. *J. Mol. Graph. Model.* **17**, 57–61 (1999).
58. UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* **45**, D158–D169 (2017).
59. Salentin, S., Schreiber, S., Haupt, V. J., Adasme, M. F. & Schroeder, M. PLIP: fully automated protein–ligand interaction profiler. *Nucleic Acids Res.* **43**, W443–W447 (2015).
60. Drew, P. D., Xu, J. & Racke, M. K. PPAR-gamma: Therapeutic Potential for Multiple Sclerosis. *PPAR Res.* **2008**, 627463 (2008).

61. Storer, P. D., Xu, J., Chavis, J. & Drew, P. D. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists inhibit the activation of microglia and astrocytes: implications for multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* **161**, 113–122 (2005).

10 Anexos

Para cada uno de los nutraceuticos escogidos, se han identificado en *DrugBank*^{14,44-46} las dianas farmacológicas correspondientes (**Target**). En *KEGG*¹⁷⁻²⁰ se ha realizado la búsqueda del compuesto (*KEGGCompound*) y del medicamento (*KEGGDrug*) para hallar los mecanismos en los que intervienen en el organismo (**KEGG Pathways**) y a que enfermedades está asociado (**KEGG Disease**)

<i>DrugBank</i>	<i>KEGG</i>	Descripción	Target	<i>KEGG Pathways</i>	<i>KEGG Disease</i>
DB11094		Vitamin D			
DB00169	C05443 (D00188)	Vitamin cholecalciferol	D3 A - VDR (Vitamin D3 Receptor)	map00100 Steroid biosynthesis map01100 Metabolic pathways map04977 Vitamin digestion and absorption map05323 Rheumatoid arthritis	H01371 Hypercalcemia infantile; Idiopathic infantile hypercalcemia H01372 Vitiligo
DB00153	C05441 (D00187)	Vitamin ergocalciferol	D2	map00100 Steroid biosynthesis map01100 Metabolic pathways map01130 Biosynthesis of antibiotics	na
DB01373	C00076	Calcium	20 targets (4 active, 16 NA)	103	na
DB00122	C00114 (D07690)	Choline (Lecitine)	U - Choline-phosphate cytidyltransferase B U - Acetylcholinesterase U - Choline-phosphate cytidyltransferase A U - Phospholipase D2 U - Cholinesterase U - Phospholipase D1 U - Phosphoethanolamine/ phosphocholine phosphatase U - Neuronal acetylcholine receptor subunit alpha-7	map00260 Glycine, serine and threonine metabolism map00564 Glycerophospholipid metabolism map01100 Metabolic pathways map02010 ABC transporters map04725 Cholinergic synapse map04976 Bile secretion map05231 Choline metabolism in cancer	na
DB00140	C00255 (D00050)	Riboflavin (Vitamin B2)	A - Riboflavin kinase A - Riboflavin synthase A - Flavin reductase (NADPH)	map00740 Riboflavin metabolism map01100 Metabolic pathways map01110 Biosynthesis of secondary metabolites map04977 Vitamin digestion and absorption	H01249 Ethylmalonic encephalopathy (EE) H01582 Pellagra
DB11133	na	Omega-3	A - Peroxisome proliferator-activated receptor gamma U - Peroxisome proliferator-activated receptor alpha U - Sterol regulatory element-binding protein 1	na	na

DrugBank	KEGG	Descripción	Target	KEGG Pathways	KEGG Disease
DB13168	na	Omega-6 (Linoleic acid)	na	na	na
DB00115	C02823 (D00166)	Cyanocobalamin (Vitamin B12)	A - Methionine synthase A - Methylmalonyl-CoA mutase, mitochondrial U - Methionine synthase reductase U - Methylmalonic aciduria type A protein, mitochondrial U - Methylmalonic aciduria and homocystinuria type C protein U - Methylenetetrahydrofolate reductase	map00860 Porphyrin and chlorophyll metabolism map01100 Metabolic pathways	H01711 Spinal stenosis
DB00121	C00120 (D00029)	Biotin (Vitamin B7)	U - Propionyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial U - Biotin--protein ligase U - Sodium-dependent multivitamin transporter U - Methylcrotonoyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial U - Acetyl-CoA carboxylase 2 U - Methylcrotonoyl-CoA carboxylase subunit alpha, mitochondrial U - Pyruvate carboxylase, mitochondrial U - Propionyl-CoA carboxylase alpha chain, mitochondrial U - Acetyl-CoA carboxylase 1	map00780 Biotin metabolism map01100 Metabolic pathways map02010 ABC transporters map04977 Vitamin digestion and absorption	H01182 Biotinidase deficiency; BTD deficiency; Late-onset multiple carboxylase deficiency H01231 Biotin-responsive basal ganglia disease (BBGD)
DB00126	C00072 (D00018)	Vitamin C	26 targets (unknown pharmacology action)	map00053 Ascorbate and aldarate metabolism map00480 Glutathione metabolism map01100 Metabolic pathways map01110 Biosynthesis of secondary metabolites map01120 Microbial metabolism in diverse environments map02060 Phosphotransferase system (PTS) map04066 HIF-1 signaling pathway map04977 Vitamin digestion and absorption	H01354 Leigh syndrome, including: Leigh syndrome, French-Canadian type (LSFC); X-linked Leigh syndrome H01580 Vitamin C deficiency; Scurvy H01724 HTLV1-Associated Myelopathy (HAM); Tropical spastic paraparesis (TSP)

<i>DrugBank</i>	<i>KEGG</i>	<i>Descripción</i>	<i>Target</i>	<i>KEGG Pathways</i>	<i>KEGG Disease</i>
DB00158	C00504 (D00070)	Folic Acid (Vitamin B family)	U - Folate receptor beta U - Folate receptor gamma U - Folate receptor alpha	map00670 One carbon pool by folate map00790 Folate biosynthesis map01061 Biosynthesis of phenylpropanoids map01100 Metabolic pathways map01523 Antifolate resistance map04976 Bile secretion map04977 Vitamin digestion and absorption	H00262 Spina bifida; Myelomeningocele; Myeloschisis H01561 Chiari malformation; Chiari syndrome
DB00163	C02477	Vitamin E	U - SEC14-like protein (2,3 and 4) U - Nuclear receptor subfamily 1 group I member 2 U - Protein kinase C beta type U - Arachidonate 5-lipoxygenase U - Protein kinase C alpha type U - Diacylglycerol kinase alpha U - Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit alpha and beta isoform	map00130 Ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis map01060 Biosynthesis of plant secondary metabolites map01100 Metabolic pathways map01110 Biosynthesis of secondary metabolites map04216 Ferroptosis map04977 Vitamin digestion and absorption	
DB00152	C00378	Thiamine (Vitamin B1)	A - Thiamin pyrophosphokinase 1 U - Thiamine transporter 1	map00730 Thiamine metabolism map01100 Metabolic pathways map02010 ABC transporters map04122 Sulfur relay system map04977 Vitamin digestion and absorption	
DB06757	C19610 (D04854)	Manganese	U - Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha and gamma, mitochondrial U - TGF-beta-activated kinase 1 and MAP3K7-binding protein 1 U - Arginase-1 U - Serotransferrin	na	na

<i>DrugBank</i>	<i>KEGG</i>	<i>Descripción</i>	<i>Target</i>	<i>KEGG Pathways</i>	<i>KEGG Disease</i>
DB06774 (DB05318)	C06866 (D00250)	Capsaicin	A - Transient receptor potential cation channel subfamily V member 1 U - Prohibitin-2	map00360 Phenylalanine metabolism map01060 Biosynthesis of plant secondary metabolites map01063 Biosynthesis of alkaloids derived from shikimate pathway map01100 Metabolic pathways map01110 Biosynthesis of secondary metabolites map04750 Inflammatory mediator regulation of TRP channels	na
DB11672	C10443	Curcuma	U - Peroxisome proliferator-activated receptor gamma U - Vitamin D3 receptor U - Multidrug resistance-associated protein 5 U - Carbonyl reductase [NADPH] 1 U - Glutathione S-transferase P	map00945 Stilbenoid, diarylheptanoid and gingerol biosynthesis map01110 Biosynthesis of secondary metabolites	na