



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE  
AMBATO**  
**FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA  
EN ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA**



**CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA**

---

Identificación de posibles dianas terapéuticas en Alzheimer utilizando pipeline bioinformático combinado para aplicarlas al diseño de fármacos asistidos por computadora

---

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

**AUTOR:** Luis Leonardo Barriga Sanchez

**TUTOR:** Mg. Cristian Fernando Galarza Galarza

**Ambato – Ecuador**

**Septiembre - 2023**

## **APROBACIÓN DEL TUTOR**

Mg. Cristian Fernando Galarza Galarza

### **CERTIFICA:**

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

Ambato, 21 de julio de 2023

---

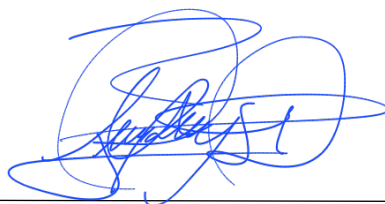
Mg. Cristian Fernando Galarza Galarza

C.I.: 1803160272

**TUTOR**

## **AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN**

Yo, Luis Leonardo Barriga Sanchez, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniero Biotecnólogo, son absolutamente originales, auténticos y personales, a excepción de las referencias bibliográficas.



---

Luis Leonardo Barriga Sanchez

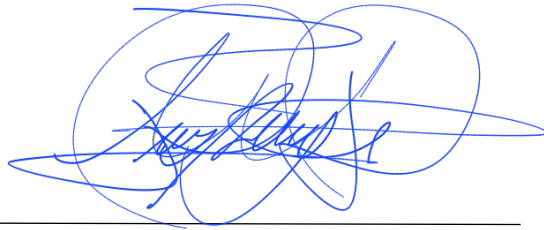
C.I 1850150036

**AUTOR**

## **DERECHOS DE AUTOR**

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

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

A handwritten signature in blue ink, consisting of several overlapping loops and lines, positioned above a horizontal line.

Luis Leonardo Barriga Sanchez

C.I 1850150036

**AUTOR**

## **APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO**

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

Para Constancia firman:

---

Presidente de Tribunal

---

PhD. Mario Daniel García Solís

C.I 1103605471

---

PhD. Lorena de los Ángeles Núñez Villacís

C.I 1804256905

Ambato, 24 de agosto de 2023

## DEDICATORIA

*“Supongo que la próxima vez lo haré mejor*

*¿Qué? ¿No va a haber una próxima vez?*

*¿En serio lo dices?*

*Porque si hubiera sabido que esta era mi única oportunidad,  
de vivir como un mono parlanchín, flotando en una pequeña piedrita en el espacio.*

*En el mejor punto de la historia,  
formando parte de la especie más inteligente del planeta.  
Utilizando magia diariamente como los celulares, internet o los aviones.*

*Con acceso a toda la información  
recolectada por la humanidad en la palma de mi mano,  
podría haber hablado de lo impresionante que es en realidad estar vivo.*

*Quizás no me hubiera preocupado por lo que la gente pensaba,  
podría haber pasado más tiempo haciendo buen arte,  
o buena ciencia, o enamorándome  
o simplemente no siendo un reverendo estúpido.*

*¡Mierda!*

***¡Si solo lo hubiera sabido!”***

***- Sr. O -***

*En ocasiones solo necesitamos un momento para respirar;  
para olvidarnos de todos los problemas.  
Ser nosotros mismos por lo menos un segundo,  
es tan fácil perdernos en la vida que olvidamos como vivirla.*

***¡Así que levántate y disfruta lo que tienes ahora,  
antes que el mañana te lo arrebatte todo!***

***- Luis Leonardo Barriga Sanchez -***

## AGRADECIMIENTO

Agradezco a todo lo imprevisto, a la suerte y todo lo que no se puede ver, ni percibir, lo que me ha llevado hasta este punto.

Agradezco a mi madre, padre y hermano que siempre me han apoyado, gracias por brindarme su amor, sus consejos y su sabiduría. Doy gracias por ser parte de ustedes y que ustedes formen parte de mí.

A mi gato, Chester que jamás me iré sin llevarlo conmigo, jamás me desharé de él cuando sea adulto o este enfermo. Siempre estaré ahí para abrazarlo, ya que también es parte de mi familia.

A mi tutor, Mg. Cristian Galarza por depositar su confianza en mí, por ser mi guía durante esta travesía, por sus enseñanzas, consejos y apoyo en cada etapa de este trabajo. Muchas gracias por todo.

Quiero agradecer de igual manera al PhD. Mario García, PhD. William Calero y PhD. Santiago Casado por los conocimientos que me han impartido y los consejos que me han dado durante este último año.

A mis mejores amigos, Diego, Rina y Erika, gracias por todos los momentos inolvidables, gracias por ser mis compañeros en mis locuras y mis aventuras. Y aunque ahorita estén lejos, no cabe duda de que nos volveremos a encontrar.

A mis amigos y amigas: Víctor, Serge, Dome, Pauli, Katy, Gaby J, Gaby L, Chino, Claudio, David y Jonathan, por regalarme su tiempo, por los buenos momentos y las risas que nunca faltaron.

## ÍNDICE DE GENERAL DE CONTENIDOS

<b>APROBACIÓN DEL TUTOR .....</b>	<b>ii</b>
<b>AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN .....</b>	<b>iii</b>
<b>APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO .....</b>	<b>v</b>
<b>DEDICATORIA .....</b>	<b>vi</b>
<b>AGRADECIMIENTO .....</b>	<b>vii</b>
<b>ÍNDICE DE GENERAL DE CONTENIDOS.....</b>	<b>viii</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS .....</b>	<b>xi</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>xii</b>
<b>RESUMEN EJECUTIVO .....</b>	<b>xiv</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xv</b>
<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>1</b>
<b>MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>1</b>
1.1    Antecedentes investigativos .....	1
1.1.1    Justificación.....	1
1.1.2    Factores de Riesgos en el Alzheimer .....	3
1.1.2.1 Enfermedades cerebrovasculares .....	3
1.1.2.2 Hipertensión .....	3
1.1.2.3 T2DM .....	4
1.1.2.4 Dislipidemia .....	5
1.1.3    Déficit de tratamientos contra el Alzheimer.....	5
1.1.4    Mecanismos moleculares del Alzheimer.....	6
1.1.4.1 Hipótesis Tau .....	6
1.1.4.2 Procesamiento de APP.....	7
1.1.5    Bioinformática en el descubrimiento de fármacos.....	8
1.1.5.1 Pipeline Bioinformático.....	8



1.1.5.2	Análisis de expresión diferencial.....	9
1.1.5.3	Redes de interacción proteína-proteína (PPI).....	10
1.1.5.4	Acoplamiento molecular .....	10
1.2	Objetivos.....	11
1.2.1	Objetivo general.....	11
1.2.2	Objetivos específicos .....	11
<b>METODOLOGÍA .....</b>		<b>12</b>
2.2	Materiales .....	12
2.1	Métodos .....	13
2.1.1	Búsqueda de datos transcriptómicos .....	13
2.1.2	Análisis de expresión diferencial .....	14
2.1.3	Análisis de enriquecimiento funcional de los genes con alta y baja expresión.....	15
2.1.4	Construcción de la red de interacción Proteína-Proteína (PPI).....	16
2.1.5	Análisis topológico y de agrupamiento de redes de la red PPI en Cytoscape.....	16
2.1.6	Construcción de redes regulatorias e identificación de biomarcadores	17
2.1.7	Identificación de genes clave (Hub) y cuello de botella (Bottleneck) .	17
2.1.8	Análisis de supervivencia en GEPIA2 .....	18
2.1.9	Redes de interacción fármaco-gen y fármaco-proteína.....	19
2.1.10	Acoplamiento Molecular de fármacos y proteínas.....	20
2.1.11	Evaluación de las propiedades farmacocinéticas .....	22
2.1.11.1	Análisis ADMET de los ligandos .....	22
2.1.11.2	Verificación de los ligandos en Quimiotecas .....	23
<b>CAPITULO III.....</b>		<b>24</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>		<b>24</b>
3.1	Análisis y discusión de resultados.....	24

3.1.1	Identificación de DEGs y análisis de enriquecimiento funcional .....	24
3.1.2	Análisis de redes PPI y detección de biomarcadores .....	27
3.1.3	Determinación de dianas terapéuticas por análisis de supervivencia...	34
3.1.4	Acoplamiento Molecular.....	40
3.1.4.1	Análisis de los sitios activos.....	53
3.1.5	Evaluación de las propiedades farmacocinéticas .....	55
<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....</b>		<b>63</b>
4.1	Conclusiones.....	63
4.2	Recomendaciones .....	64
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>		<b>65</b>
<b>ANEXOS .....</b>		<b>95</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b>	Parámetros topológicos globales de la red de interacción .....	28
<b>Tabla 2.</b>	Análisis de enriquecimiento funcional de los clústers obtenidos de Cytoscape por MCODE .....	30
<b>Tabla 3.</b>	Resumen de las funciones biológicas de los genes identificados como Hub y Bottleneck.....	35
<b>Tabla 4.</b>	Resultados de los acoplamientos moleculares en AutoDockVina X y HDock de las interacciones de los fármacos con las dianas terapéuticas.....	44
<b>Tabla 5.</b>	Resultados del acoplamiento molecular en cada uno de los SA identificados .....	54
<b>Tabla 6.</b>	Análisis de hepatotoxicidad, mutagenicidad y carcinogénicos de cada uno de los fármacos identificados.....	55
<b>Tabla 7.</b>	Análisis de absorción (A) de cada uno de los fármacos.....	57
<b>Tabla 8.</b>	Análisis de distribución (D) de los fármacos identificados .....	58
<b>Tabla 9.</b>	Resultados de los análisis metabólicos (M) de los fármacos .....	59
<b>Tabla 10.</b>	Análisis de excreción (E) por medio de la plataforma pKcsM.....	60
<b>Tabla 11.</b>	Resultados de los análisis de toxicidad (T).....	60

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	<i>Descripción general de los mecanismos involucrados en el Alzheimer generados por T2D</i> .....	4
<b>Figura 2.</b>	<i>Comparación de los cambios generados en el cerebro</i> .....	6
<b>Figura 3.</b>	<i>Rol de la proteína Tau en la estabilidad neuronal.</i> .....	7
<b>Figura 4.</b>	<i>Flujo de trabajo resumiendo de los métodos necesarios para desarrollar un fármaco</i> .....	8
<b>Figura 5.</b>	<i>Análisis de expresión diferencia del GEO dataset: GSE28146</i> .....	24
<b>Figura 6.</b>	<i>Términos de enriquecimiento de cada uno de los DEGs con un FDR&lt;0,01</i> .....	25
<b>Figura 7.</b>	<i>Red PPI conformado por los genes expresados e inhibidos</i> .....	28
<b>Figura 8.</b>	<i>Detección de clusters usando MCODE plugin en Cytoscape</i> .....	29
<b>Figura 9.</b>	<i>Red de interacción regulatoria miARN-miARN de los genes del MCODE1</i> .....	33
<b>Figura 10.</b>	<i>Identificación de genes Hub y Bottleneck empleando “cytoHubba”</i> .....	34
<b>Figura 11.</b>	<i>Análisis de supervivencia de los genes en la matriz LGG.</i> .....	38
<b>Figura 12.</b>	<i>Red de interacción fármaco-proteína de los genes candidatos CD44 y CDK6</i> .....	40
<b>Figura 13.</b>	<i>Acoplamiento molecular de la proteína CD44 con Silibina y Doxorrubicina, realizado en AutoDockVina X.</i> .....	46
<b>Figura 14.</b>	<i>Acoplamiento molecular de la proteína CD44 con Silibina y Doxorrubicina, realizado en HDOCK.</i> .....	47
<b>Figura 15.</b>	<i>Acoplamiento molecular de la proteína CDK6 con Palbociclib y Dorsomorfina, realizado en ADVX.</i> .....	48
<b>Figura 16.</b>	<i>Resultados del acoplamiento molecular realizado en HDOCK con Palbociclib y Dorsomorfina</i> .....	49

<b>Figura 17.</b> <i>Acoplamiento molecular de la proteína CCND1 con Curcumina, Estradiol y Tricostatina A</i> .....	51
<b>Figura 18.</b> <i>Acoplamiento molecular de la proteína CCND1 con Curcumina, Estradiol y Tricostatina A desarrollado en HDOCK</i> .....	52
<b>Figura 19.</b> <i>Identificación de los sitios activos para las proteínas CD44, CDK6 y CCND1</i> .....	53

## RESUMEN EJECUTIVO

La bioinformática tiene potencial uso biotecnológico, permite estudiar diferentes enfermedades genéticamente complejas y proponer tratamientos desde el enfoque *in silico*. Se utilizaron datos transcriptómicos relacionados con el Alzheimer, para la identificación de posibles dianas terapéuticas y diseño de fármacos asistidos por computadora. La aplicación del análisis multinivel de redes de interacción biológica, acoplamiento molecular y evaluación de las propiedades farmacocinéticas de los fármacos permite proponer un posible medicamento para tratar la enfermedad.

Se encontraron en total, 507 y 478 genes con alta y baja expresión respectivamente, los cuales están presentes en estudios de cerebros que muestran diferentes estados de la enfermedad. Se identificó un biomarcador (hsa-miR-34a-5p) para el diagnóstico de AD y AD asintomático en pacientes con cáncer, utilizando redes de interacción proteína-proteína y miARN-miARN. Los análisis de supervivencia revelaron que CDK6 y CD44 son posibles dianas terapéuticas para el AD. Por otra parte, se identificó a CCND1 como otra posible diana terapéutica, a través del análisis de la red fármaco-proteína. Estas redes reflejaron 4 posibles fármacos candidatos, Estradiol, Tricostatina A, Doxorubicina y Dorsomorfina, que se pueden usar en el tratamiento de la enfermedad.

El acoplamiento molecular demostró que Estradiol y Tricostatina A pueden generar una inhibición de la proteína CCND1, mientras que Dorsomorfina induce la inhibición de CDK6, puesto que, la energía libre de unión de este complejo es menor que en la interacción de referencia. La evaluación de las propiedades farmacocinéticas, indicaron que solo Tricostatina A puede ser usada para el tratamiento de AD en humanos.

**Palabras clave:** *in silico*, análisis de supervivencia, acoplamiento molecular.

## ABSTRACT

Bioinformatics has potential biotechnological applications, allowing the study of different genetically complex diseases and proposing treatments from an *in silico* approach. Transcriptomic data related to Alzheimer's disease were used to identify potential therapeutic targets and design computer-assisted drug molecules. The application of multi-level analysis of biological interaction networks, molecular docking, and evaluation of drug pharmacokinetics allows for the proposal of a potential medication to treat the disease.

A total of 507 and 478 genes with high and low expression, respectively, were found in studies of brains showing different disease states. A biomarker (hsa-miR-34a-5p) was identified for diagnosing AD and asymptomatic AD in patients with cancer, using protein-protein interaction and miRNA-miRNA networks. Survival analyses revealed CDK6 and CD44 as possible therapeutic targets for AD. Furthermore, CCND1 was identified as another potential therapeutic target through drug-protein network analysis. These networks identified four potential drug candidates, Estradiol, Trichostatin A, Doxorubicin, and Dorsomorphin, for use in treating the disease.

Molecular docking demonstrated that Estradiol and Trichostatin A can generate inhibition of the CCND1 protein, while Dorsomorphin induces inhibition of CDK6, as the binding free energy of this complex is lower than the reference interaction. Evaluation of pharmacokinetic properties indicated that only Trichostatin A can be used for AD treatment in humans.

**Keywords:** *in silico*, survival analysis, molecular docking.

# CAPÍTULO I

## MARCO TEÓRICO

### 1.1 Antecedentes investigativos

#### 1.1.1 Justificación

La pérdida progresiva de neuronas tanto en su estructura como funcionamiento ya sea por disfunciones mitocondriales, estrés oxidativo, neuro inflamación, problemas genéticos, entre otras (**Muddapu et al., 2020**), convergen al aparecimiento de trastornos neurológicos (ND: Neurodegenerative Disorders) (**Shi et al., 2021**). Enfermedades como el Alzheimer (AD; Alzheimer Disease), Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), Huntington, atrofia muscular espinal (SMA) forman parte de este trastorno (**Pfriegeer, 2021**). En el caso del AD, es una enfermedad neurodegenerativa compleja que puede aparecer de forma esporádica o genética (**Wijeratne et al., 2023**). En 2020, se han reportado 43.8 millones de personas que padecían esta ND, lo que presenta un aumento de 117% de los casos reportados desde 1990 (**Perveen et al., 2022**). Se espera que para el 2050 alrededor de 152 millones de personas desarrollen la enfermedad, puesto que se pronostica 5 millones de nuevos casos cada año (**Nichols et al., 2022**).

El AD, es una enfermedad poligénica a causa de un mal funcionamiento en múltiples genes (**Xiao et al., 2020**). El estudio de este tipo de enfermedades puede llevar años y el desarrollo de un posible tratamiento eficiente implica aún más tiempo (**Sun et al., 2022**). No obstante, la combinación del conocimiento biológico, ciencias computacionales, estadística y matemáticas dan lugar al aparecimiento de una ciencia emergente denominada Bioinformática (**Roy et al., 2018**). La cual, mediante la aplicación de diferentes herramientas ha permitido explorar los mecanismos moleculares subyacentes de un sin número de enfermedades, tales como: cáncer, enfermedades degenerativas y genéticas (**Puls et al., 2022**). Las investigaciones *in silico* pueden presentar una alternativa en el estudio de la AD, convirtiéndose en una



fuente confiable para el desarrollo de nuevos fármacos en base a múltiples análisis bioinformáticos reduciendo así el tiempo de investigación y recursos (**Tutone & Almerico, 2021**).

En años recientes la bioinformática y bioinformática estructural han tomado una mayor relevancia en el estudio y diseño de fármacos (**Yu et al., 2021**). Por ejemplo, los estudios reportados por **Guevara (2022), Laguna (2022) & López (2021)**, han establecido una metodología basada en la aplicación de un pipeline bioinformático que permite identificar posibles dianas terapéuticas en enfermedades como, *Diabetes Mellitus tipo 2* (T2DM), *Cáncer papilar de tiroides* (PTC) y ELA respectivamente. Esta metodología inicia identificando los genes involucrados en cada una de las enfermedades en bases de datos confiables e integrándolos para la generación de redes de interacción biológica. Este proceso permitió identificar una extensa gama de fármacos comerciales y estructuras en desarrollo que pueden ser utilizadas como posibles fármacos para tratamiento de las enfermedades.

Otros enfoques similares, como el reportado por **Sagulkoo et al. (2022)**, parte del análisis de expresión diferencial e integra los datos en diversas redes de interacción biológicas para identificar biomarcadores y desarrollar un fármaco *in silico* contra el SARS-CoV2. Por otra parte, el pipeline usado por **Yu et al. (2021)**, se observa una variación en el procesamiento de los datos. En su enfoque se utiliza Logistic Regression (LASSO) para la identificación de biomarcadores y luego se establecen correlaciones con análisis en bases de datos de sangre periférica para la determinación de ligandos y genes clave en el AD.

Finalmente, con base en los resultados obtenidos de los trabajos citados anteriormente, se buscó las posibles dianas terapéuticas en AD aplicando un análisis de redes biológicas multinivel y reutilización de fármacos. Partiendo del análisis de expresión diferencial, redes biológicas basado en un modelo celular de gliomas de bajo grado (LGG) que permitió identificar nuevos biomarcadores y genes clave. Posteriormente identificando fármacos aprobados, preaprobados y en vías de desarrollo para la

realización de un acoplamiento molecular rígido. Así, este estudio se enfocó en el descubrimiento de biomarcadores y dianas terapéuticas aplicando herramientas bioinformáticas para proponer el diseño de nuevos fármacos brindando una alternativa al tratamiento del Alzheimer.

## 1.1.2 Factores de Riesgos en el Alzheimer

### 1.1.2.1 Enfermedades cerebrovasculares

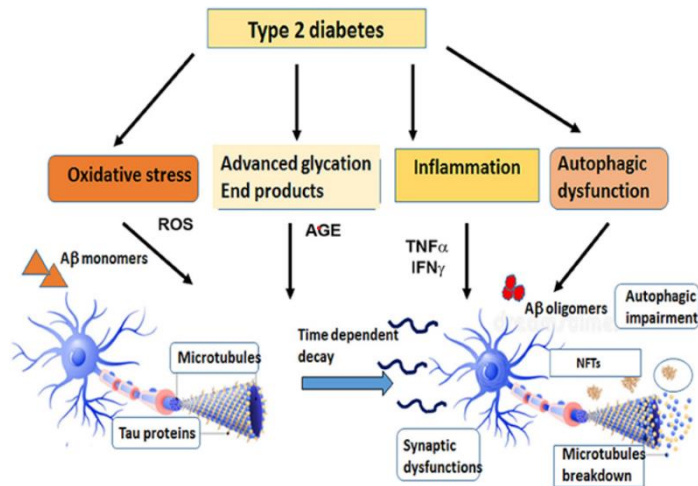
Tanto las enfermedades cerebrovasculares y el AD comparten ciertos factores de riesgos que en su mayoría se superponen (**Biessels, 2022**). Los cambios cerebrovasculares como los infartos hemorrágicos, corticales isquémicos pequeños y grandes, vasculopatías y cambios en la sustancia blanca cerebral aumenta el riesgo de padecer algún tipo de ND (**Lao et al., 2020**). De acuerdo con análisis post mortem de cerebros que presentaban AD demuestran la presencia de enfermedades vasculares parenquimatosas (angiopatía amiloide por péptido  $\beta$ -amiloides ( $A\beta$ ) y enfermedades arterioscleróticas de pequeños vasos); encontrando que el 50% de los casos se encontraron brotes hemorrágicos e infartos (**Verdelho et al., 2021**). Esto implicaría que los mecanismos homeostáticos del AD como la acumulación de proteínas  $A\beta$ 42 y tau tiene algún tipo de sinergia con las enfermedades cerebrovasculares.

### 1.1.2.2 Hipertensión

La hipertensión es uno de los riesgos vasculares más comunes, afectando casi un tercio de los adultos y dos tercios de los adultos mayores en todo el mundo (**Castilla, 2022**). Incluso cuando se presenta en baja mediada, esta puede afectar negativamente al rendimiento cognitivo (**Eglit et al., 2020**). La hipertensión es un factor de riesgos para el Alzheimer, ya que genera alteraciones en las paredes vasculares que pueden conducir a hipoperfusión, isquemia e hipoxia cerebral (**Canavan & O'Donnell, 2022**). De acuerdo con **Gabin et al. (2017)**, la isquemia cerebral conduce a la acumulación de APP y  $A\beta$ , además de desencadenar en una sobreexpresión de presenilina (involucrado en la síntesis de  $A\beta$ ).

### 1.1.2.3 T2DM

Según estudios epidemiológicos la T2DM puede duplicar el riesgo de padecer Alzheimer (Jash et al., 2020). Los mecanismos asociados a estas dos enfermedades pueden ser la resistencia y déficit de insulina, receptores alterados de insulina, hiperglucemia, daño cerebrovascular, efectos secundarios por glicación avanzada, entre otras (Athanasaki et al., 2022). El uso de modelos animales ha confirmado la relación de estas enfermedades, ya que la resistencia a insulina aumenta la acción de las enzimas  $\beta$  y  $\gamma$ -secretasas; además, promueve la reducción del aclaramiento de  $A\beta$ , lo que conduce a una acumulación de plaquetas  $A\beta$  en el tejido cerebral (Bellenguez et al., 2022). Adicionalmente, la resistencia y déficit de insulina inducen la hiperfosforilación de la proteína Tau, implicando en el desarrollo de ovillos neurofibrilares (NFT) (Chatterjee & Mudher, 2018). Aparte de los estudios reportados, se ha determinado que los productos finales de la glicación avanzada (producido por el gen *AGE*), inducen la muerte neuronal mediante la activación de vías de muerte celular (Nagar et al., 2022). También estimula la sobreexpresión de complejos  $\beta$  y  $\gamma$ -secretasas (producida por los genes *BACE* y *PSENI*) (Jash et al., 2020). La Figura 1 resume la interacción de la diabetes tipo 2 con el Alzheimer.



**Figura 1.** Descripción general de los mecanismos involucrados en el Alzheimer generados por T2D

Fuente: Chatterjee & Mudher (2018)

#### 1.1.2.4 Dislipidemia

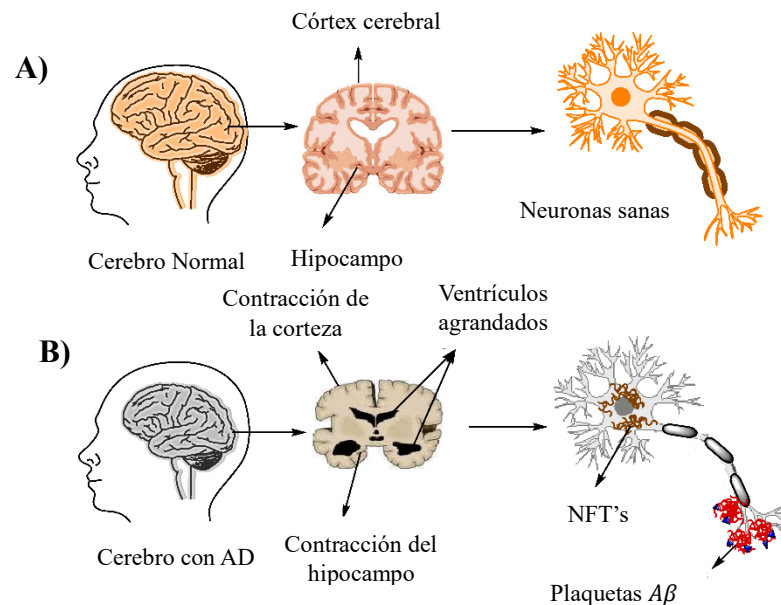
De acuerdo con estudios, los niveles de colesterol son un 10 % mayores en personas que padecen AD, a comparación de individuos sanos (**Moreno et al., 2020**). La dislipidemia afecta la barrera hematoencefálica (BBB), lo que da como resultado al apareamiento de NFTs y un aumento considerable de plaquetas  $A\beta$  (**Novikova et al., 2021**). Estudios en modelos animales, confirman que el hipercolesterolemia induce un aumento de los péptidos  $A\beta$ , y una formación descontrolada de NFT, conduciendo a un deterioro cognitivo, neuro inflamación, disfunción de neuronas colinérgicas y presencia de microhemorragias cerebrales (**Sáiz et al., 2020**).

#### 1.1.3 Déficit de tratamientos contra el Alzheimer

A pesar del aumento de pacientes con AD, solo se han registrados 5 tratamientos efectivos para contrarrestar los síntomas cognitivos en humanos (**Gauthier et al., 2019**). Tres de los cinco tratamientos consisten en inhibidores de colinesterasa (donepezilo, galantamina y rivastigmina) (**Li et al., 2019**); el cuatro tratamiento con un antagonista del receptor N-metil-D-aspartato (memantina; descubierto en 2003) (**Folch et al., 2018**). El último tratamiento es una formulación entre memantina y donepezilo, descubierto en el 2014 (**Guo et al., 2020**). Durante la última década, se ha observado una falta significativa de avances en el desarrollo de nuevos fármacos. Esto sumado a que la mayoría de los agentes terapéuticos que han estado en desarrollo en matrices *in vivo* e *in vitro* durante los últimos 15 años no han presentado resultados favorables (**Cummings et al., 2019**). Solo ciertos fármacos han sido evidenciados para tratar el AD *in vivo*. No obstante, aún siguen en la fase preclínica (**Su et al., 2021**). De acuerdo con la información presentada, se puede evidenciar que en más de dos décadas no ha habido un avance significativo en el desarrollo de un tratamiento 100 % eficiente contra el AD.

### 1.1.4 Mecanismos moleculares del Alzheimer

La acumulación de plaquetas  $A\beta$  y la formación de NFTs son las características más comunes en el desarrollo del AD, éstas se propagan en el hipocampo y las regiones de la corteza cerebral (Guo et al., 2020). Un cerebro que presenta AD se caracteriza por una degeneración de las neuronas en los lóbulos frontales, temporal y parietal de la corteza cerebral y otras regiones relacionadas con la disfunción sináptica (Wang et al., 2021). Todos estos factores convergen en una disminución del tamaño del cerebro a comparación de un cerebro sano (Coupé et al., 2019).

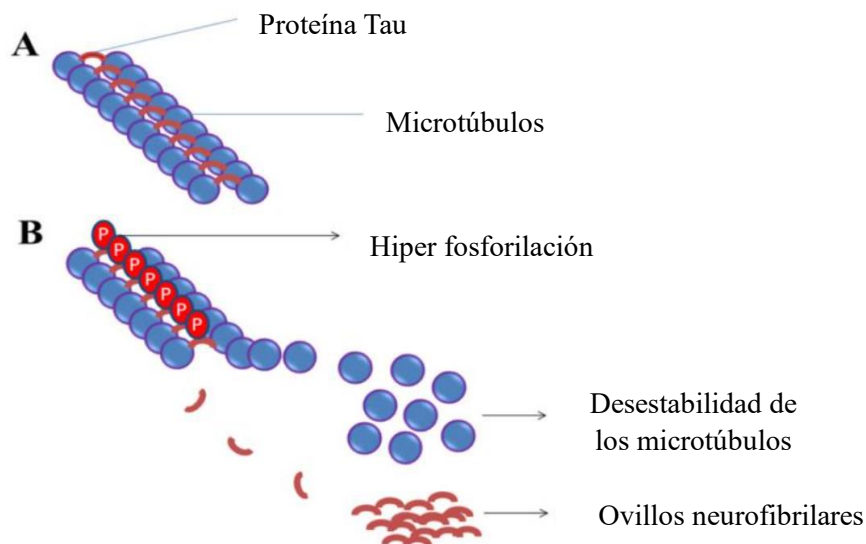


**Figura 2.** Comparación de los cambios generados en el cerebro.

A) Cerebro normal; B) Cerebro con AD. Fuente: Adaptado de Breijyeh & Karaman (2020)

#### 1.1.4.1 Hipótesis Tau

Esta hipótesis establece que la hiper fosforilación de la proteína Tau, genera NFT dentro de las neuronas (Miao et al., 2019). Debido a que la Tau está relacionada con la unión de los microtúbulos, proporcionando estabilidad y facilitando el transporte axonal. Pero al ser hiper fosforilado produce una disociación de los microtúbulos y emparejamiento con los filamentos helicoidales, causando deterioro sináptico y neurodegeneración (Meng et al., 2022).



**Figura 3.** Rol de la proteína Tau en la estabilidad neuronal.

A) Los microtúbulos junto a la proteína Tau estabilizan y mantienen la integridad de una neurona. B) La hiper fosforilación de Tau induce una disociación de las proteínas Tau y desestabiliza los microtúbulos de la neurona, produciendo NFT y la pérdida de la estructura funcional de la neurona.

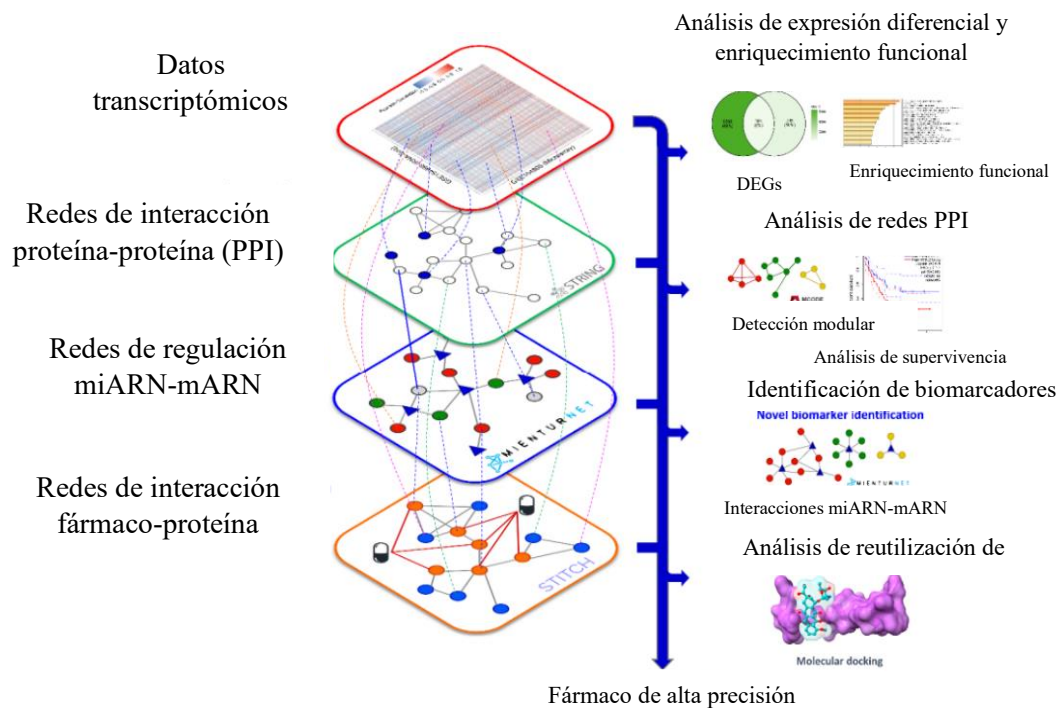
Fuente: Adaptado de Siddappaji & Gopal (2021)

#### 1.1.4.2 Procesamiento de APP

El procesamiento desregulado del gen APP contribuye a la patogénesis del AD, al elevar la producción de  $A\beta$  y reducir la relación de  $A\beta_{40}/42$  (Rahman et al., 2021). De acuerdo con Zhao et al. (2020), las alteraciones en la relación  $A\beta_{40}/42$  se debe a las mutaciones en los genes APP y Presenilina (PSEN1, PSEN2 y PS2). Las mutaciones en PSEN1 son prominentes en el AD, se han identificado 221 mutaciones patogénicas, 32 mutaciones para APP y 19 mutaciones para PSEN2 (Xiao et al., 2021). Las alteraciones bioquímicas en PS1 y PS2 alteran en mayor medida la escisión de APP, lo que conduce a una disminución en la relación  $A\beta_{40}/42$  (Hampel et al., 2021). Todas estas afectan y aumenta la producción de  $A\beta$ . El péptido  $A\beta$  es un componente principal de las placas seniles y es esencial para la disfunción neuronal y sináptica durante el apareamiento del AD (Grimm et al., 2020). El  $A\beta$  oligomérico ( $oA\beta$ ) puede elevar de forma anormal los niveles extrasinápticos de glutamato, mediada por el receptor ácido N-metil-D aspártico extrasináptico (NMDAR), resultando una depresión postsináptica y pérdida de espinas dendríticas (Rahman et al., 2021).

### 1.1.5 Bioinformática en el descubrimiento de fármacos

Como se explicó anteriormente debido a la combinación de diferentes ciencias se ha podido desarrollar la Bioinformática, con el paso del tiempo se han desarrollado nuevas herramientas para el análisis de enfermedades, reduciendo los tiempos de investigación y desarrollo de fármacos. Los avances tanto en esta ciencia como en la bioinformática estructural han permitido establecer técnicas y métodos para el desarrollo de fármacos de alta precisión como se esquematiza en el flujo de trabajo de la **Figura 4**.



**Figura 4.** Flujo de trabajo resumiendo de los métodos necesarios para desarrollar un fármaco

El pipeline bioinformático inicia con el análisis de datos transcriptómicos, redes de interacción proteína-proteína, redes regulatorias de miARN-mARN, redes de interacción proteínas-fármacos y Docking molecular. Fuente adaptado de **Sagulkoo et al. (2022)**

#### 1.1.5.1 Pipeline Bioinformático

El pipeline bioinformático (PB) hace referencia a una serie de procedimientos, usando diferentes herramientas bioinformáticas para analizar datos biológicos (**Roy et al.,**

2018). Los PBs facilitan el estudio de datos de gran tamaño provenientes de secuenciaciones de ADN, datos proteómicos o transcriptómicos (**Porter & Hajibabaei, 2022**). Sin embargo, el PB puede ser modificado para ajustarse a los tipos de datos a analizar y dependiendo del enfoque del estudio (**Xu et al., 2022**). A continuación, se presenta un ejemplo de un pipeline bioinformático: 1) recopilación de datos transcriptómicos, 2) procesamiento de datos mediante programación, 3) análisis de expresión diferencial, 3) anotaciones biológicas, 4) modelado y diseño de redes de interacción proteína-proteína, 5) análisis de supervivencia de genes en matrices celulares (**Zanini et al., 2018**). No obstante, el análisis de expresión diferencial es una constante para el estudio de enfermedades como: SARS-COV2, Cáncer de hígado, Parkinson, Norrie, Infarto de miocardio, entre (**Fan et al., 2018; Iqbal & Kumar, 2022**).

#### *1.1.5.2 Análisis de expresión diferencial*

El análisis de expresión diferencial (DEA) permite evidenciar la expresión de genes en diversas condiciones o tratamientos (**Lamarre et al., 2018**). El procesamiento de los datos se lo pueden realizar en distintos lenguajes de programa como R, Python, C++ o JavaScript, ya que existen librerías especializadas en el análisis de datos biológicos (**Bystrykh, 2021; Westwood, 2018**). Pese a ello, el procesamiento de los datos puede ser complejo, debido a que dependiendo de la matriz (humanos, ratones o líneas celulares) en la que se haya realizado, el código puede variar significativamente (**Hoffman & Roussos, 2021**). Sin embargo, sigue siendo una de las herramientas bioinformáticas más usadas para detectar la variación de los genes en diferentes enfermedades (**Kakati et al., 2019**). DEA es uno de los primeros pasos para determinar los genes que tienen una implicación biológica en el desarrollo de una enfermedad (**Abbas & Manzalawy, 2020**).



#### *1.1.5.3 Redes de interacción proteína-proteína (PPI)*

Las redes de interacción proteína-proteína (PPI, por sus siglas en inglés) son esquemas que indican las interacciones funcionales entre proteínas, de acuerdo con su cercanía biológica, es decir su relación entre sí (**Fionda, 2019**). Esta relación da paso al análisis de múltiples genes y cual posiblemente sea su rol en la regulación de las funciones celulares y vías metabólicas, o en procesos biológicos (**Pellegrini, 2019**).

#### *1.1.5.4 Acoplamiento molecular*

El acoplamiento molecular, también conocido como docking molecular, es una técnica computacional ampliamente usado en la química y la bioinformática (**Shao et al., 2022**). Este permite estudiar y predecir la interacción entre una molécula pequeña (ligando) y una macromolécula (receptor) (**Dnyandev et al., 2021**). El objetivo del acoplamiento molecular es predecir las interacciones del ligando con los aminoácidos del receptor (**Stanzione et al., 2021**). Permitiendo así entender y diseñar compuestos químicos con propiedades específicas, con actividad farmacológica (**Vidal et al., 2022**). El acoplamiento molecular es un estudio preliminar, ampliamente utilizado en el diseño de fármacos.

## **1.2 Objetivos**

### **1.2.1 Objetivo general**

- Identificar posibles dianas terapéuticas para Alzheimer utilizando pipeline bioinformático combinado para aplicarlas en el diseño de fármacos asistido por computador.

### **1.2.2 Objetivos específicos**

- Analizar los genes involucrados en el Alzheimer y su interacción a partir de un análisis de expresión diferencial y de enriquecimiento funcional.
- Diseñar redes de interacción biológicas para identificar biomarcadores y genes claves en el Alzheimer.
- Seleccionar las posibles dianas terapéuticas mediante la combinación de herramientas bioinformáticas descritas en pipelines.
- Evaluar las propiedades farmacocinéticas de los compuestos bioactivos y su potencial uso en el diseño de nuevos fármacos.

## CAPITULO II

### METODOLOGÍA

#### 2.2 Materiales

**Tabla 1.** Recursos bioinformáticos

Recursos	Enlace
Rstudio	<a href="https://posit.co/download/rstudio-desktop/">https://posit.co/download/rstudio-desktop/</a>
Bioconductor	<a href="https://www.bioconductor.org/">https://www.bioconductor.org/</a>
GEO (Gene Expression Omnibus )	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/</a>
Metascape	<a href="https://metascape.org/gp/index.html#/main/step1">https://metascape.org/gp/index.html#/main/step1</a>
String	<a href="https://string-db.org/">https://string-db.org/</a>
Cytoscape	<a href="https://cytoscape.org/">https://cytoscape.org/</a>
Mienturnet	( <a href="http://userver.bio.uniroma1.it/apps/mienturnet/">http://userver.bio.uniroma1.it/apps/mienturnet/</a> )
GEPIA2	( <a href="http://gepia2.cancer-pku.cn/#index">http://gepia2.cancer-pku.cn/#index</a> )
DrugBank Database	<a href="https://go.drugbank.com/">https://go.drugbank.com/</a> ),
Therapeutic Target Database	<a href="http://db.idrblab.net/ttd/">http://db.idrblab.net/ttd/</a>
Comparative Toxicogenomics Databases	<a href="http://ctdbase.org/">http://ctdbase.org/</a>
GeneCards	<a href="https://www.genecards.org/">https://www.genecards.org/</a>
STITCH	<a href="http://stitch.embl.de/">http://stitch.embl.de/</a>
Protein Data Bank	<a href="https://www.rcsb.org/">https://www.rcsb.org/</a>
PubChem	<a href="https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/">https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/</a>
Protein Plus	<a href="https://proteins.plus/">https://proteins.plus/</a> ),
AutoDock Vina X	<a href="https://vina.scripps.edu/downloads/">https://vina.scripps.edu/downloads/</a>
HDOCK	<a href="http://hdock.phys.hust.edu.cn/">http://hdock.phys.hust.edu.cn/</a>
Vega Software	<a href="https://www.vegahub.eu/portfolio-types/vega-software/">https://www.vegahub.eu/portfolio-types/vega-software/</a>
pkCSM	<a href="https://biosig.lab.uq.edu.au/pkcsm/prediction">https://biosig.lab.uq.edu.au/pkcsm/prediction</a>

SwissBiosostere	<a href="http://www.swissbiosostere.ch/">http://www.swissbiosostere.ch/</a>
Pharmit	<a href="https://pharmit.csb.pitt.edu/">https://pharmit.csb.pitt.edu/</a>

**Tabla 2.** Equipos

Recursos	Cantidad
Computadora portátil	1
Router para internet	1

## 2.1 Métodos

### 2.1.1 Búsqueda de datos transcriptómicos

GEO (Gene Expression Omnibus) es una plataforma del NCBI (por sus siglas en inglés), en la cual se encuentra alrededor de 170 mil series de datos con casi 5 millones de muestras (Hunt et al., 2022). Se seleccionó la opción de “GEO DataSets” y en el apartado de “Search” se usaron los siguientes parámetros de búsqueda: “Alzheimer’s disease” AND “*Homo Sapiens*” [Organism] AND “CEL” [Supplementary Files] AND “Expression profiling by array” [DataSet Type] para poder identificar potenciales GEO Datasets (conjuntos de datos) (Ma et al., 2022). Los criterios de selección de los conjuntos de datos fueron adaptados de Huang et al. (2018): 1) pacientes diagnosticados con Alzheimer, 2) tipo de muestra y cuál fue el método empleado para su obtención, 3) pacientes que no presentan ningún trastorno neurodegenerativo (control), 4) perfilado de expresiones por matriz y datos no procesados en formato “.CEL”, 5) experimentos realizados en la plataforma GPL570 ([HGU133\_Plus\_2] Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array) 6) el número de muestras por cada conjunto de dato debe ser mayor a 10 (>10).

## 2.1.2 Análisis de expresión diferencial

El análisis de expresión diferencial es una técnica bioinformática que usa datos de secuenciación de ARN (RNA-seq) sin procesar, por ejemplo, mapeos y ensamblajes para luego someterlos a pruebas estadísticas (Stupnikov et al., 2021). Se usó Rstudio v2023.03.1+446, R v4.3.0 y librerías de Bioconductor v3.17 para la exportación y análisis de los datos. La librería “GEOquery” se empleó para importar y transformar los datos GEO en formatos de estructuras de datos R, con el fin de aplicar un control de calidad de los datos por medio de la librería “ArrayQualityMetrics” (Zhang et al., 2023). Se corrigió, normalizo y filtró los datos para evitar sesgos en los análisis siguientes (Zhou, et al., 2019). Posteriormente se realizó el análisis de expresión diferencial usando la librería “limma”, primero se diseñó el modelo lineal con la función “model.matrix” y se ajustó el modelo a los conjuntos de datos mediante la función “lmFit” (Lu et al., 2021). Para realizar las comparaciones de cada uno de los casos de AD con el grupo control se usó la función “makeContrasts”, los contrastes fueron integrados al modelo ajustado con “contrasts.Fit” y se aplicó estadística bayesiana “ebayes” para obtener los genes de expresión diferencial (Panitch et al., 2022; Yu et al., 2021).

Los resultados fueron transformados en un dataframe con la función “topTable” y las librerías “hgu133plus2.db” y “AnnotationDbi” se utilizaron para agregar los símbolos de los genes con la función “mapIds”, debido a que estos están en una anotación específica de GPL570 (Modarres et al., 2021). En el caso que no se haya agregado el símbolo del gen, sino la terminación “NA” serán eliminados con la función “!is.na”. Adicionalmente con la librería “ggplot2” se desarrolló un volcano plot usando los valores del  $\log_2 FC$  (logFC) y  $-\log_{10}(P.value)$  para los ejes “x” y “y” respectivamente (Yang & Hong, 2020). De igual manera ejecutando la librería “pheatmap” se generó un mapa de calor comparando las 30 muestras con los resultados obtenidos. Cada uno de los gráficos mencionados se usaron para identificar de manera visual los genes con alta y baja expresión, y los que no mostraban un cambio significativo (Mullan et al., 2021; Williams et al., 2019). De acuerdo con Li et al. (2022), los DEGs que obtuvieron un  $\log_2 FC > 1$  y  $\log_2 FC < -1$ , deben ser

considerados como up-regulated (UR; alta expresión) y down-regulated (DR; baja expresión) respectivamente. Los resultados fueron guardados con la función “write.csv” bajo el nombre “Resultados\_DEGs.csv”. Aplicando los siguientes parámetros: una tasa de descubrimiento falso (FDR por sus siglas en inglés) menor que 0,05 ( $FDR < 0,05$ ) y un logFC absoluto mayor que 1 ( $|\log_2 FC > 1|$ ), con la finalidad de no mostrar los resultados no significativos (Ge et al., 2021; Stupnikov et al., 2021). El código empleado para el análisis de expresión diferencial se encuentra en el Anexo 1.

### 2.1.3 Análisis de enriquecimiento funcional de los genes con alta y baja expresión

El análisis de enriquecimiento funcional también conocido como pruebas de enriquecimiento de conjuntos de genes, fue usado para identificar enfermedades y mecanismos farmacológicos en base a conjuntos de datos biológicos de gran escala (Wijesooriya et al., 2022). Adicionalmente proporciona un análisis de las vías metabólicas involucradas por cada uno de los genes en Gene ontology biological process (GO-BP), Kyoto Encyclopedia of genes and Genomes (KEGG) pathways, Reactome pathways, WikiPathways, Canonical y CORUM pathway (Giurgiu et al., 2019; Kanehisa et al., 2017; Sagulkoo et al., 2022). Se empleó Metascape para realizar el análisis de enriquecimiento funcional, análisis de interactomas, anotaciones de genes y búsqueda de genes relacionados en más de 40 bases de datos (Zhou et al., 2019).

Los genes UR y DR se listaron en formato “.txt” como: “DEGs\_upregulated.txt” y “DEGs\_downregulated.txt”. La interfaz de Metascape está separada en tres secciones: en “Step 1” se cargaron los archivos correspondientes en la sección de “Upload File Format”. En “Step 2” tanto en el “Input as species” y “Analysis as species” se seleccionó la opción de “*Homo sapiens*”. Para el “Step 3” se escogió la opción de “Express Analysis”, y se generó un “Analysis Report Page” (Zhang et al., 2020; Zhou et al., 2019). Este proceso se realizó para cada una de las listas antes mencionadas. Los resultados se descargaron en formato “.csv” y se empleó los parámetros

establecidos por **Maghsoudi et al. (2022)** y **Pistis et al. (2022)**: donde los términos de enriquecimiento deben tener un nivel de significancia de  $FDR < 0.05$  ( $p < 0.05$ ). Los genes que cumplieran con el criterio de ambas listas de datos fueron enlistados conjuntamente como “DEGs\_up\_down\_regulated.txt”. Cabe destacar que se usó Metascape de forma recurrente para los análisis siguientes.

#### **2.1.4 Construcción de la red de interacción Proteína-Proteína (PPI)**

STRINGv11.5 es una herramienta bioinformática diseñada para predecir las PPI (**Li et al., 2020**). STRING recoge información de interactomas humanos aproximadamente de 19,556 proteínas y 11938498 interacciones (**Sagulkoo et al., 2022**). La interfaz de STRING está dividida en 10 segmentos, se escogió “Multiple proteins” para ingresar una mayor cantidad de genes, el archivo “DEGs\_up\_down\_regulated.txt” se usó como información de entrada y se importó en el apartado de “upload a file”. Se seleccionó el organismo “*H. sapiens*” en la sección de “Organisms”, mientras que en “Advance settings” se empleó los parámetros utilizados por **Maghsoudi et al. (2022)** y **Sagulkoo et al. (2022)** donde especifica que “Network Type” y “FDR stringency” se mantienen como predeterminados, para “Requiere score” se empleó “medium score confidence (0.400)”. Finalmente el PPI se descargó en formato “.png” de alta calidad y “.tsv” como: “String\_resultados.tsv”, este último se exportó a Cytoscape para realizar análisis de la red PPI.

#### **2.1.5 Análisis topológico y de agrupamiento de redes de la red PPI en Cytoscape**

Cytoscape es usado para el análisis de redes complejas de interacciones moleculares (**Nudin et al., 2018**). En Cytoscape mediante la opción “File”; “Import”; “Import from file” se escogió el archivo “.tsv”. Se utilizó el “Network Analyzer plugin” para realizar el cálculo de los parámetros topológicos globales como: grado promedio, diámetro, radio, coeficiente de agrupamiento promedio, longitud de ruta más corta promedio y densidad de la red (**Doncheva et al., 2019**). En el caso de los cálculos locales como el

grado de cercanía, la intermediación y el coeficiente de agrupamiento se utilizó la misma función.

En la interfaz de Cytoscape se seleccionó la opción “Apps”; “MCODE” para realizar los clusters de la red PPI (**Dhasmana et al., 2020**). Los parámetros de entrada fueron los mismos descritos por **Xu & Yang (2021)**, con un límite de grado 2; límite de puntuación de nodo 0.2; k-core igual a 2; una profundidad máxima 100. Se seleccionó los clusters cuyo valor fue mayor a 4 (**Ge et al., 2022**), los genes de cada uno de los clusters se nombraron como: “MCODE1.txt”, “MCODE2.txt” y “MCODE3.txt”.

### **2.1.6 Construcción de redes regulatorias e identificación de biomarcadores**

MiTurnet es un software especializado para la construcción de redes regulatorias de microARN (miARN)-ARNm en base a miRTarBase (una base de datos de miARN-targets validados por datos experimentales) (**Yuen et al., 2020**). Primero se estableció el tipo de organismo en la sección “Data upload”, “Select Organism”; “*Homo Sapiens*”, los genes de cada uno de los clusters identificados, se importaron a la plataforma en “Enter imput list”; “Upload a file”. En la sección “miRNA-target Enrichment”, se emplearon los parámetros establecidos por **Licursi et al. (2019)**: el “Set a threshold for the minimum number of miRNA-target interactions” se estableció por defecto en 2 y en “Set a threshold for the adjust p-value (FDR)” se estableció en 0.05. Los miARNs que cumplan con los parámetros determinados se consideraron como potenciales biomarcadores en el AD.

### **2.1.7 Identificación de genes clave (Hub) y cuello de botella (Bottleneck)**

Los genes Hub son determinados por la centralidad de grado (Degree), mientras que los genes Bottleneck por la intermediación (Betweenness) (**Kumar & Haider, 2022**); el cálculo de la centralidad de grado y la intermediación se realizó con “Network



Analyzer plugin” y “cytoHubba” (Ma et al., 2021). Cabe recalcar que los resultados del “Network Analyzer plugin” fueron obtenidos en el apartado 2.1.5. Con la segunda “App” se realizó el cálculo en base a un solo parámetro, lo que permitió una mayor precisión en el resultado. Primero en la interfaz de Cytoscape se seleccionó la opción “Apps”, luego, “cytoHubba”, se desplegó una nueva interfaz, en el apartado de “Target Network”, se escogió el archivo “.tsv” antes cargado. En el siguiente apartado “Node’s Score” se seleccionó la opción de “Calculate”, para la sección de “Select nodes”; “Hubba nodes”, se activó la opción “Top”; “Degree” y se estableció en 20, de la misma manera se procedió para la intermediación (“Top”; “Betweenness”). Es importante mencionar que al elegir la opción “Top”, los nodos se organizan automáticamente con una intermediación superior al percentil 95% para cada uno de los casos (Khan et al., 2022). Los resultados fueron descargados en formato “.csv” como “Hub\_genes.csv” y “Bottleneck\_genes.csv” para posteriores análisis.

### 2.1.8 Análisis de supervivencia en GEPIA2

GEPIA2 es una herramienta que provee un análisis de la esencialidad del gen en diferentes tipos de cáncer por medio de un análisis de supervivencia y un análisis de expresión genético basado en diversas bases de datos como: “The Cancer Genome Atlas” (TCGA), y “Genotype-Tissue Expression data” (GTEx) (Tang et al., 2019). La plataforma cuenta con diversas funciones, se escogió la función “Expression Analysis”; “Survival analysis”, en la nueva interfaz se seleccionó la opción de “Gene” y se usó los genes Hub y Bottleneck obtenidos del apartado 2.1.7 como información de entrada (Wei et al., 2022).

Los siguientes apartados fueron seleccionados en el orden que aparecen a continuación “Methods”; “Overall Survival”; “Group Cutoff”, en este último se estableció “Median” con un “Cutoff-High (%)” y “Cutoff-Low (%)” de 50 % (Gui et al., 2021). En las secciones de “Hazards Ratio (HR)”, “95% Confidence Interval” y “Axis Units” se trabajó con las opciones predeterminadas (Xie et al., 2020). En el apartado final “Multiple Datasets”; “Datasets Selection”, de acuerdo con Lehrer &

**Rheinstein (2019)** y **Lu et al. (2022)**, los gliomas de bajo grado (LGG) tiene una correlación con el apareamiento del Alzheimer e incluso genes como: *MASP1*, *LINC00836*, *APOE* y *CD33* se expresan en ambas enfermedades, por esta razón se determinó como modelo de tipo celular para la identificación de genes.

El análisis de supervivencia se hizo para cada uno de los genes ya que la plataforma no puede hacer un análisis de varios genes a la vez. El gen o genes que obtengan una supervivencia general significativa menor a 0.05 ( $\log - rank\ p - value < 0.05$ ) y cociente de riesgo alto igual o mayor a 1.7 ( $HR \geq 1.7$ ) fueron seleccionados como los genes con mayor relevancia, los parámetros fueron establecidos por **Sagulkoo et al. (2022)** con un intervalo de confianza del 95%. Los genes fueron enlistados como “Genes\_relevantes.txt” y se guardaron para el siguiente análisis.

### **2.1.9 Redes de interacción fármaco-gen y fármaco-proteína**

La lista de genes obtenidos del análisis de supervivencia se ingresó en cada una de las siguientes bases de datos de interacción fármacos-gen y fármaco-proteína: “DrugBank database”, “Therapeutic Target Database” (TTD), “Comparative Toxicogenomics Databases” (CTD) y GeneCards, para identificar dianas terapéuticas (**Sahoo et al., 2021**). Los fármacos obtenidos se enlistaron en un archivo “.xlsx” como: “Drugs\_repulsing.xlsx”. Tanto los genes como fármacos se enlistaron conjuntamente en un archivo “.txt” como “farmocos\_genes.txt”. STITCH, es una base de datos de interacción fármaco-proteína (**Galletti et al., 2021**).

En la interfaz de la plataforma se seleccionó la opción de “Multiple names”; “List of Names” se cargó el archivo “farmacos\_genes.txt” y posteriormente se seleccionó “*Homo sapiens*” como tipo de organismo; en “Advance settings” se estableció una puntuación de confianza superior de 0,400 (**Wang et al., 2020**). Las interacciones fármaco-fármaco, fármaco-proteína y proteína-proteína se determinaron por el color de la red siendo rojo, verde y plomo respectivamente (**Ferrante et al., 2020**). Los

fármacos que presentan una interacción directa o semi directa con los genes de interés fueron escogidos para la siguiente etapa del proceso.

### 2.1.10 Acoplamiento Molecular de fármacos y proteínas

Se empleó Protein Data Bank (PDB) para la búsqueda de las estructuras de CD44, CDK6 y CCND1. Para la selección de las estructuras, se tomó en cuenta los parámetros del “Structura Validation”, con un R-value Work menor 0,3 ( $R - value Work < 0,3$ ) y una resolución menor a 3 Å (**Bittrich et al., 2023; Shao et al., 2022; Tunyasuvunakool et al., 2021**). Una vez identificadas las estructuras se descargaron en formato “.pdb” y utilizando ChimeraX v1.6.1 se procesó cada una de ellas eliminando los ligandos u otro tipo de estructuras que no correspondan a la proteína de interés (**Haque et al., 2022; Pettersen et al., 2021**). Se utilizó PubChem, con el fin de descargar las estructuras 3D de Doxorubicina, Dorsomorfina, Tricostina A y Estradiol.

La cavidad catalítica de cada uno de los receptores fue establecida de acuerdo con la información presentada por **Chen et al. (2016), Karim et al. (2016) y Patel et al., (2018)**, la información de los residuos involucrados en el sitio activo se encuentra en el Anexo 2. Por otra parte, la predicción de los sitios drugables se realizó por medio de Protein Plus, primero se importaron las estructuras procesadas en el apartado de “Upload Protein” y se seleccionó el archivo deseado. Se desplegó una nueva interfaz donde se usó la opción “DoGSiteScorer” que permitió identificar los sitios activos y se inició el proceso con la opción “Calculate” (**Schöning et al., 2020**). Los parámetros para determinar los mejores sitios de unión fueron establecidos por **Michel et al. (2019)**, donde menciona que los valores del “DrugScore” que sean entre 0.5 y 1 son significativos para su estudio, haciendo énfasis en que los resultados más cercanos a 1 son considerados como los mejores sitios drugables.

El acoplamiento molecular rígido se llevó a cabo tanto en HDOCK y AutoDock Vina XB. En el caso de AutoDockVina X, se cargaron las estructuras de los receptores en el apartado de “File; Read Molecule”, con la opción de “Edit” se procesó cada una de las estructuras eliminando las moléculas de agua, se añadió hidrógenos y se agregó cargas de Kollman (en el apartado de “Charges”), las estructuras se guardaron en formato “.pdbqt” (Desta et al., 2020). Los ligandos se importaron en la sección de “Ligand; Input; Open” y se volvió a guardar en formato “.pdbqt” con la opción “Ligand, Output” (Salmaso & Moro, 2018). Con las estructuras ya cargadas en el software se estableció el sitio de unión con la función “Grid”, se seleccionaron las moléculas en “Molecules; Choose”, se determinó los tipos de mapas en “Set Map types; Directly”, la localización del sitio activo se estableció con la opción de “Grid Box” (en el Anexo 3, se muestra las coordenadas de todos los sitios activos) y se guardó en formato “.gpf”. Empleando el archivo “autogrid4.exe” y el código fuente del computador, se realizó el cálculo del “grid” de cada una de las moléculas y el archivo final se guardó en formato “.glg” (Tang et al., 2022).

Una vez establecido el “grid”, se procedió a realizar el acoplamiento molecular rígido con la opción “Docking; Macromolecule; Set Rigid Filename” y se escogió la molécula en formato “.pdbqt”. Se seleccionó al ligando en la sección “Docking; Ligand; Choose”, los parámetros del análisis se establecieron en “Docking; Search parameters; Genetic Algorithm” (Eberhardt et al., 2021). Se estableció el número de predicciones en 50 para los sitios de unión preestablecidos bibliográficamente y solo 10 predicciones para los sitios de unión identificados por “DogSiteScorer” debido al tiempo que conlleva realizar este tipo de análisis. El archivo se guardó en formato “.dpf”, se usó la terminal del computador para realizar las predicciones y se guardó en formato “.dlg”.

Por otra parte, en HDOCK se cargaron las moléculas y los ligandos en la sección “Input Receptor Molecule; Upload File” y “Input Ligand Molecule” respectivamente, se subieron los archivos en formato “.pdbqt” (Huang, et al., 2022). En la sección de “Advance Options; Specify the residues of the binding site” se estableció los sitios

activos de cada una de las moléculas, para iniciar el acoplamiento se seleccionó la opción “Submit” (Yan et al., 2020). Cabe recalcar, que para las predicciones de los sitios de unión solo empleo AutoDockVina X, debido a la precisión que tiene y debido a que el modelo matemático empleado es más riguroso que HDOCK (Ngoc et al., 2021).

Para comparar las predicciones del acoplamiento molecular se establecieron a Palbociclib, Silibina y Curcumina como fármacos de control correspondientes a CDK6, CD44, CCND1 con una energía libre de unión de -10.00, -7.23 y -4.63 kcal/mol respectivamente (Chen et al., 2016; Karim et al., 2016; Patel et al., 2018). De acuerdo con Chen et al. (2018), la Silibina genera una inhibición del 90 % de la expresión de CD44 y disminuye los niveles de la proteína CD44c7-10 en el cáncer de próstata. Mientras que Palbociclib es un compuesto selectivo que puede unirse a los sitios ATP de CDK4 y CDK6 inhibiendo su actividad, pero debido a su selectividad no es efectivo contra otros tipos de CDKs (Gupta et al., 2019).

Por otro lado, estudios demuestran que Curcumina puede generar una baja expresión de CCND1 y bloquear la transición de las células de G1 a la fase S, inhibiendo la proliferación de células tumorales (Rahimi et al., 2019). Las estructuras 3D y 2D fueron visualizados con UCSF ChimeraX v1.6.1 y Discovery Studio 2021. Cabe destacar que los resultados de AutoDockVina X se presentaron en el formato “Ball and Stick”, mientras que los resultados de HDOCK se representaron en formato “Stick”. Los ligandos de referencia se presentaron con el color verde.

## 2.1.11 Evaluación de las propiedades farmacocinéticas

### 2.1.11.1 Análisis ADMET de los ligandos

Usando el paquete Vega se estudió la actividad biológica de cada uno de los ligandos. Posteriormente, se realizó las pruebas de mutagenicidad, carcinogénesis y hepatotoxicidad utilizando los códigos SMILES (Simplified molecular-input line-

entry system) de estas estructuras (**Pedretti et al., 2021**). En la interfaz de Vega se ingresó uno por uno los códigos SMILES y se seleccionó los análisis de mutagenicidad, carcinogénesis y hepatotoxicidad. Se analizó las propiedades farmacocinéticas de los fármacos con el programa pkCSM, en el cual se ejecutó las pruebas ADMET (Absorción, Distribución, Metabolismo, Excreción y Toxicidad) utilizando también los códigos SMILES. Los códigos se cargaron en la sección del Step1 en “Provide a Smiles string”, en el Step 2 se seleccionó la opción “ADMET” para iniciar con el proceso (**Dong et al., 2018**).

#### *2.1.11.2 Verificación de los ligandos en Quimiotecas*

Se empleó “SwissBioisostere” con la finalidad de identificar posibles bioésteres. En la interfaz del programa, en la sección “SMILES”, se ingresó el código SMILES de cada uno de los fármacos identificados. Luego se inició el proceso con la opción “Query Database” (**Cuozzo et al., 2022**). Se usó Pharmit para identificar si el fármaco ya está valido en las coordenadas del sitio activo.

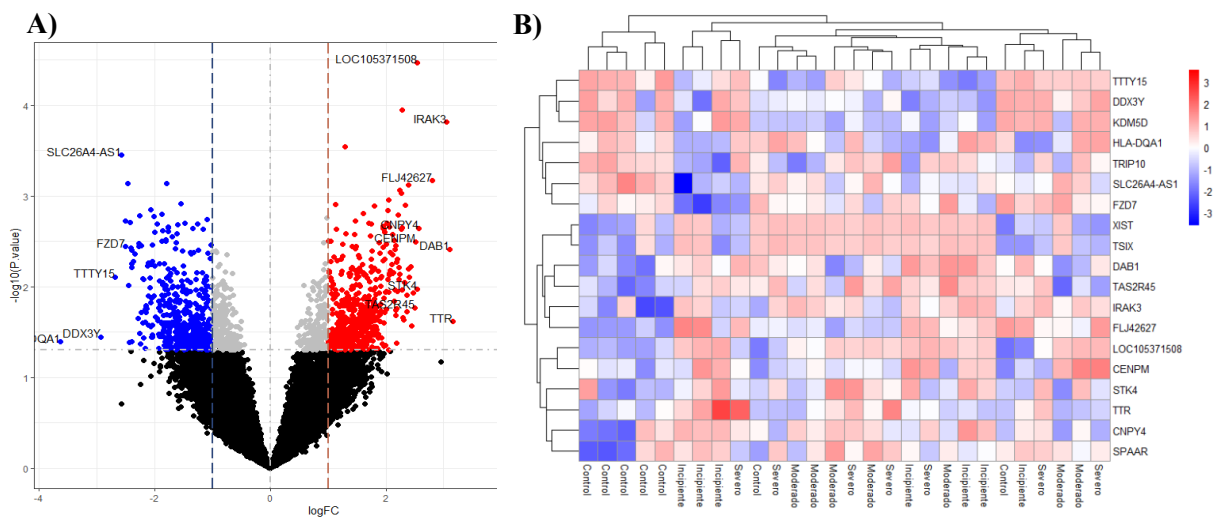
## CAPITULO III

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 Análisis y discusión de resultados

##### 3.1.1 Identificación de DEGs y análisis de enriquecimiento funcional

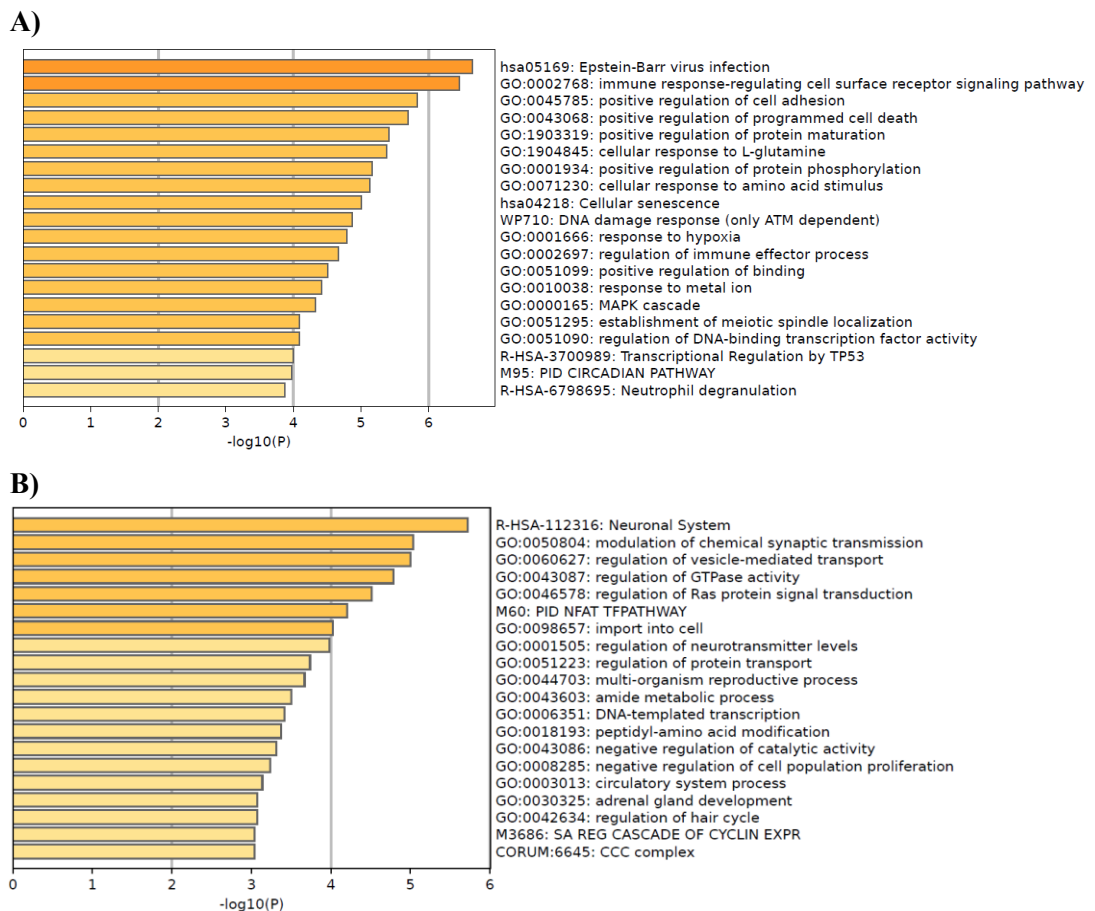
Una de las enfermedades más comunes de la demencia es el AD, caracterizada por ser una enfermedad compleja y poligénica con una tasa de heredabilidad del 60 y 80 % (He et al., 2023). Para poder comprender la patogenicidad del AD *in silico*, se usó el GEO dataset de acceso público: GSE28146, el cual contiene 30 muestras disecadas del hipocampo de diferentes pacientes (8 Controles, 7 pacientes AD en estado incipiente, 8 pacientes AD en estado moderado, 7 pacientes AD en estado severo). De acuerdo con el análisis de expresión diferencial, se identificaron 508 y 478 DEGs correspondientes a genes con alta (UR; up-regulated) y baja (DR; down-regulated) expresión (Figura 5A), el mapa de calor indicó la co-expresión de cada uno de los genes con respecto a los grupos del dataset (Figura 5B).



**Figura 5.** Análisis de expresión diferencial del GEO dataset: GSE28146

A) “Volcano plot”, los colores azul, rojo, plomo y negro indican alta, baja expresión, no significativos y con ningún cambio genético respectivamente. B) El mapa de calor representó la co-expresión de los genes en cada uno de los grupos (solo se muestran los primeros 20 genes) y la leyenda representa el valor de “logFC”.

El análisis de enriquecimiento funcional de los DEGs se muestra en la **Figura 6**. Los términos de enriquecimiento para los genes UR se decantaron para infecciones del virus Epstein-Barr (EBV), activación o perturbación de la respuesta inmune, procesos que activen y aumenten la frecuencia de la adhesión y muerte celular programada (PCA; por sus siglas en inglés) (**Figura 6A**). Estudios han demostrado que EBV genera una reentrada abortiva del ciclo celular en neuronas (generando necrosis) y neuro inflamación (**Tiwari et al., 2022**). Debido a una interferencia en el complejo de Ciclina D/CDK4 en el inicio de la fase G1 y la proliferación del virus en células endoteliales del cerebro al pasar la barrera hematoencefálica (BBB; Blood Brain Barrier) respectivamente (**Zhang et al., 2022**).



**Figura 6.** Términos de enriquecimiento de cada uno de los DEGs con un  $FDR < 0,01$

A) Enriquecimiento funcional de los DEGs expresados. B) Enriquecimiento funcional de los DEGs inhibidos.



La apoptosis y piroptosis son formas de PCA, la actividad desregulada de alguna de ellas es deletérea para las neuronas (**Bertheloot et al., 2021**). La sobre activación de caspasas en la apoptosis neuronal conduce a que la caspasa-3 se asocie con el APP y se forme un péptido neurotóxico (C31), induciendo citotoxicidad al generar plaquetas  $A\beta$  y NFTs (**Sharma et al., 2021**). El inflammasoma NLRP3 se asocia con la caspasa 1, la cual desencadena una activación de la gasdermina D (GSDMD), produciendo piroptosis (**Huang et al., 2022**). Se ha evidenciado que en pacientes AD,  $A\beta$  activa el eje NLRP3-caspasa 1-GSDMD, generando piroptosis neuronal, neuro inflamación y una acelerada progresión del AD (**Zhou et al., 2023**).

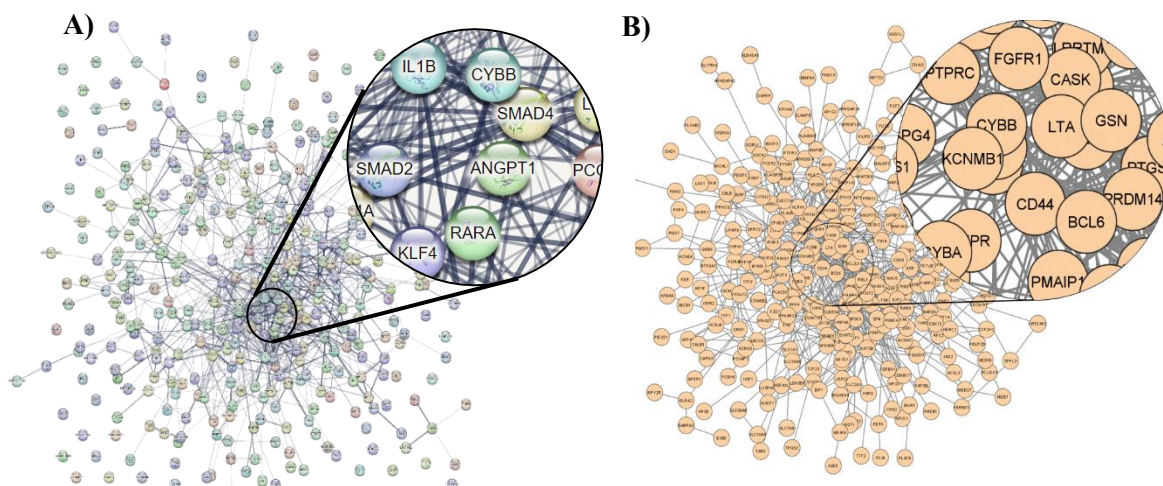
La adhesión celular en el cerebro está ligada al crecimiento neuronal, formación de sinapsis y regulación de la neurotoxicidad producida por  $A\beta$  mediante la unión de integrinas (un componente de la adhesión celular) (**Kozlova et al., 2020; Nielsen & Wennström, 2012**). Otros términos de enriquecimiento indican que los genes están relacionados con la fosforilación de proteínas, senescencia celular y una respuesta a la hipoxia. De acuerdo con **Ferrer et al. (2021)**, el aumento de la fosforilación de proteínas en regiones cerebrales induce el apareamiento de NFTs y plaquetas seniles (SPs; depósitos extracelulares de  $A\beta$ ), conduciendo al desarrollo de AD esporádico (sAD). Adicionalmente, los NFTs y SPs pueden inducir la senescencia celular, ya que NFTs pueden regular la expresión de CDKN1A y CDKN2A, evitando que la neurona entre en el proceso apoptótico (**Liu, 2022**). Mientras la acumulación de NFTs aumenta, la neurotoxicidad también, lo que obliga a las neuronas a entrar en un estado de senescencia (**Saez & Masliah, 2020**). La hipoxia afecta la actividad de la neprilisina, una peptidasa capaz de degradar las plaquetas  $A\beta$ , cuando se desregulariza conduce a un aumento desmedido de  $A\beta$  y por ende a la muerte neuronal (**Hassan & Chen, 2021**).

Los genes DR presentaron términos de enriquecimiento relacionados con la modulación química de la transmisión sináptica, regulaciones de la actividad de GTPasa y transducción de la proteína Ras (**Figura 6B**). En el AD,  $\alpha A\beta$  produce una acumulación extracelular de glutamato, induciendo una desregularización del ciclo del

glutamato y generando toxicidad en la sinapsis química (Findley et al., 2019). Esto se debe a: 1)  $A\beta$  reduce la captación neuronal de glutamato, desencadenando la deslocalización del transportador de glutamato en los astrocitos, 2)  $A\beta$  activa los NMDAR extrasinápticos, dando como resultado la neurotoxicidad (Zhang et al., 2022). Específicamente la actividad de GTPasas Rab induce la expresión de Rab5, interactúan con APP, generando un alargamiento endosomal y posteriormente un aumento en la producción de  $A\beta_{40}$  y  $A\beta_{42}$  (Jordan et al., 2022). Ras7 es otro de los componentes GTPasas y se asocia con la ruta metabólica MAPK (Ras/MAPK), la cual está involucrada en la formación de espinas dendríticas, pero la acumulación de  $A\beta$  genera pérdida de espinas dendríticas y sinapsis (Sastre et al., 2020). En base a lo mencionado se evidencia que la mayoría de los términos de enriquecimiento se asocian con el desarrollo y apareamiento del AD.

### 3.1.2 Análisis de redes PPI y detección de biomarcadores

La red PPI se generó en STRING, en donde se observó que existe una gran interacción entre genes, denotado por la cantidad de nodos conectados (Figura 7). Sin embargo, otros genes no presentaron ninguna interacción con los demás y no se visualizó algún tipo de conexión. STRING también brindó un análisis del grado de nodo promedio, el número esperado de aristas y el coeficiente de agrupamiento siendo 4.54, 689 y 0.367 respectivamente. Además, el valor de enriquecimiento de la red fue (PPI p-value) de  $1.4 e^{-09}$ . Este último valor indica que las interacciones entre cada una de las proteínas no son generadas de manera aleatoria, sino que están conectadas biológicamente (Zhou et al., 2021). Los estudios reportados por Sagulkoo et al. (2022) y Banerjee et al. (2019) en el análisis de mecanismos moleculares del SARS-COV-2 y la enfermedad celíaca presentaron un PPI p – value  $< 1e^{-8}$ , reflejando en ambos casos que los genes tienen una interacción por su cercanía biológica.



**Figura 7.** Red PPI conformado por los genes expresados e inhibidos

Se observó que los genes tienen una gran interacción entre sí, esto se denota por la cantidad de aristas generadas en cada uno de los genes para las dos redes presentadas. A) Red generada a partir de String, se identificó que existen genes con ningún tipo de interacción. B) Red procesada por medio de Cytoscape, se observó una red en la cual todos los genes estaban conectados.

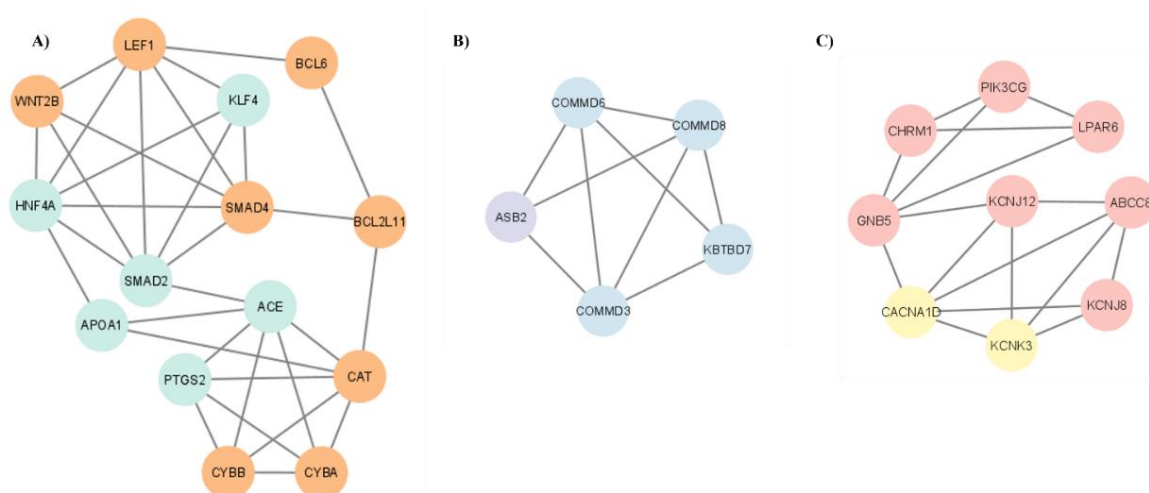
Empleando Cytoscape se determinó los parámetros globales y locales de la red PPI por medio del “Network Analyzer plugin”, los resultados se observan en la **Tabla 3** (en el Anexo 5, se encuentran todos los cálculos realizados). La longitud media del camino más corto (*mspl*) fue de 3.912 y coeficiente de agrupamiento promedio (*acc*) de 0.221. El *mspl* permite descubrir la cercanía funcional biológica entre los genes, conduciendo a la identificación de determinantes genéticos en diferentes enfermedades (**Ren et al., 2018**).

**Tabla 3.** Parámetros topológicos globales de la red de interacción

Símbolo	Descripción	Valor
$N$	Número de nodos	324
$M$	Número de aristas	851
$\langle k \rangle$	Grado medio	5.421
$d$	Diámetro	10
$R$	Radio	6

<i>mspl</i>	Longitud media del camino más corto	3.912
<i>D</i>	Densidad	0.017
<i>acc</i>	Coefficiente de agrupamiento promedio	0.221

El algoritmo MCODE identificó 3 clusters con una puntuación superior a 4, siendo el MCODE 1, 2 y 3 (**Figura 8**). Los análisis de enriquecimiento de cada uno de los clusters se muestran en la **Tabla 4**. Se observó que el MCODE 1 está relacionado con la inestabilidad cromosómica, repuesta al monosacárido, ante la hipoxia y factores de transcripción FoxO. La respuesta ante la hipoxia ya ha sido abarcada en la sección anterior. La inestabilidad cromosómica (CIN) se expresa como aneuploidía que afecta progresivamente al cerebro dependiendo de la edad (**Iourov et al., 2021**). También su forma submicroscópica produce una reorganización en el gen APP, lo que conduce al proceso neurodegenerativo del tejido cerebral (**Yurov et al., 2019**). Según **Du & Zheng (2021)**, FoxO3 induce la formación de  $A\beta$ , generando apoptosis prematura, lo que conlleva a la pérdida de neuronas y astrocitos. No obstante, FoxO3 en etapas tempranas de AD puede ejercer un efecto neuro protector, pero siendo neurotóxico en etapas avanzadas de la enfermedad (**Santo & Paik, 2018**). Esto implica que el AD puede generar una desregularización genética, haciendo que los genes desempeñen otro tipo de funciones.



**Figura 8.** *Detección de clusters usando MCODE plugin en Cytoscape*

A) MCODE 1 conformado en su mayoría por genes expresados. B) MCODE 2 conformado en su mayoría por genes inhibidos. C) MCODE 3 conformado por genes inhibidos.

**Tabla 4.** Análisis de enriquecimiento funcional de los clústers obtenidos de Cytoscape por MCODE

Cluster	V	ID	Término biológico	#	$\log_{10}(P)$
MCODE 1	4.92	R-HSA- 9614085	Transcripción mediada por FoxO	6	-12.64
		4 GO:003284	Respuesta al monosacárido	7	-12.43
		WP4216	Inestabilidad cromosómica y de microsatélites en el cáncer colorrectal	5	-9.85
		GO:0001666	Respuesta a la hipoxia	6	-8.76
		GO:0034405	Respuesta al esfuerzo cortante del fluido	3	-6.33
		GO:0019216	Regulación del proceso metabólico de los lípidos	3	-3.26
MCODE 2	4.5	R-HSA- 8951664	Nedilación	5	-6,16
		CORUM:6645	Complejo CCC (COMDD/CCDC22/CCDC93)	3	-5,19
MCODE 3	4.25	GO:0043269	Regulación del transporte de iones monoatómicos	8	-12.68
		GO:1904062	Sinapsis colinérgica	5	-10.08
		GO:1904062	Regulación del potencial de membrana	5	-7.62

El símbolo “V” indica el valor del MCODE. “ID”: término de enriquecimiento, mientras que “#” representa el número de genes que involucrados con un término de enriquecimiento en específico.

La deficiencia o sobre activación de la insulina, contribuyen al avance de la neurodegeneración, debido a una resistencia a esta hormona (Yoon et al., 2023). La ingesta descontrolada de monosacáridos inhibe la actividad del receptor de insulina A (IL-A) y sustrato-2 del receptor de insulina (IRS-2) en el hipocampo, provocando efectos negativos en la regulación del metabolismo energético cerebral (Johnson et al.,

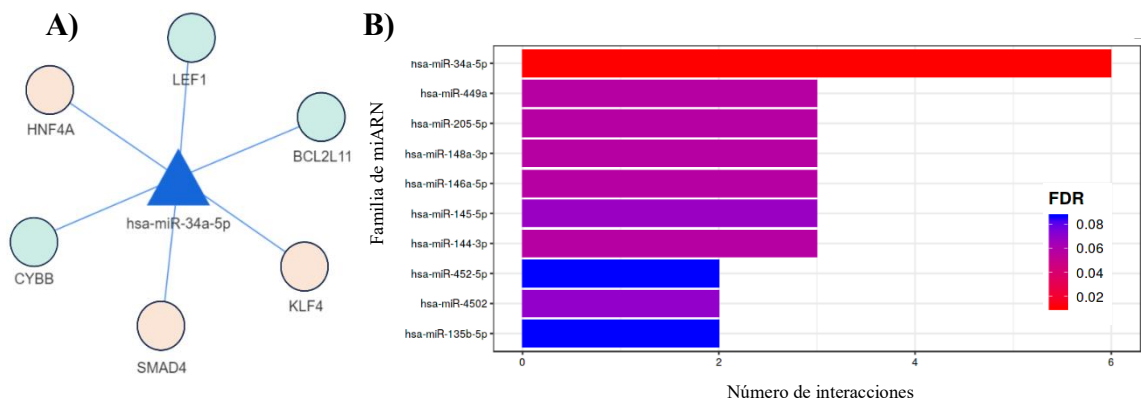
2020). Además, la insulina está involucrada en el mantenimiento de las sinapsis excitatorias, inhibición de la apoptosis prematura cerebral y promueve la formación de espinas dendríticas (Sedzikowska et al., 2021). La desregularización de esta hormona produce efectos deletéreos para el tejido cerebral.

El análisis de enriquecimiento funcional del MCDODE 2 indicó una relación con la nedilación y con el complejo CCC. La nedilación es un proceso por el cual NEDD8 se conjuga con otras proteínas (Confettura et al., 2022). NEDD8 se localiza en el núcleo neuronal y está involucrada en la neurogénesis, neuro diferenciación, degradación de proteínas anormales, prevención de la reentrada abortiva celular y muerte neuronal (Govindarajulu et al., 2022; He et al., 2022). Sin embargo, la generación de  $A\beta_{42}$  activa al gen APP-BP1, produciendo una translocación de NEDD8 en el citoplasma, induciendo la muerte neuronal (Kim et al., 2021). La inhibición del proceso de nedilación resulta en un déficit de la plasticidad sináptica en el hipocampo (Brockmann et al., 2019). El complejo CCC tiene una interacción con la fosforilación de MTMRS2, la cual contribuye al mantenimiento de las sinapsis excitatorias, reduciendo la formación desmesurada de endosomas o la sobre activación de Rab5 (An et al., 2021; Singla et al., 2019; Xu et al., 2018).

Los términos de enriquecimiento del MCODE 3 correspondieron a la regulación del transporte de iones monoatómicos, transmembrana de cationes monoatómicos y con la sinapsis colinérgica. El incremento del ion cobre ( $Cu^+$ ) en el cerebro, y el fluido cerebroespinal, se ha demostrado estar asociados con una deficiencia cognitiva y desarrollo de AD (Squitti et al., 2021).  $Cu^+$  favorece la formación de plaquetas  $A\beta$  y NFTs (An et al., 2022). Adicionalmente,  $Cu^+$  esta relacionado con el aumento de factores neuro inflamatorios como la interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ), factores de tumor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) y IL-6 (Liu et al., 2022). Los niveles elevados de hierro ( $Fe^+$ ), produce una sobreexpresión de APP, lo que ocasiona un aumento en las plaquetas  $A\beta$  (Liu et al., 2022; Liu et al., 2018). Las plaquetas inducen la reducción de  $Fe^{3+}$  a  $Fe^{2+}$ , este proceso libera especies reactivas de oxígeno (ROS), conllevando a la formación de SPs con mayor facilidad (Wang et al., 2022). Cuando  $A\beta$  está

presente en la membrana plasmática neuronal, genera una despolarización y una fluencia de  $Ca^{2+}$  (Valappil et al., 2022). El aumento de la concentración  $Ca^{2+}$  causa un malfuncionamiento de la mitocondria neuronal, produciendo una baja producción de ATP, apoptosis y liberación de ROS (Tong et al., 2018). La sinapsis colinérgica permite transformar la señal electrónica presináptica en una señal química (Colangelo et al., 2019). La formación de  $A\beta$  produce una pérdida de las funciones colinérgicas, disminuyendo la actividad de colina acetilcolina transferasa (ChAT) y acetilcolina (ACh) (Campos et al., 2022); esto provoca un aumento de acetilcolinesterasa, la cual bloquea la transmisión de señales postsinápticas (Chen et al., 2022). Se evidenció que los MCODE tienen una relación directa con el AD, e incluso el apareamiento de está genera desregularización en el mecanismo de acción de ciertas rutas metabólicas, contribuyendo al desarrollo acelerado de la enfermedad. Aunque no se tenga un tratamiento eficiente para prevenir los efectos del AD, la búsqueda de nuevos biomarcadores ayudará a diagnosticar la enfermedad en etapas tempranas de desarrollo (Klyucherev et al., 2022).

En la plataforma Mienturnet se realizó la identificación de biomarcadores basado en los genes obtenidos de los clusters. El análisis reveló que no se encontró ningún miARN que interactúe con los miARN del MCODE 2 y 3. Sin embargo, hsa-miR-34a-5p fue el único miARN que interactúa con los miARN del MCODE1 (Figura 9). De acuerdo con Zhao et al. (2019), miR-34a-5p ha sido identificado como un biomarcador para la detección temprana del AD en sangre periférica, tanto en ratones como en humanos. Según el estudio realizado por Wang et al. (2020), el biomarcador hsa-miR-34a está asociado con la vía de señalización de la insulina y neurotróficas para los genes SORT1, RAF1, FOXO1, CBL, NFKB1, MAPK1, entre otros. Mientras que, en este estudio, se observó que hsa-miR-34a-5p interactúa con los genes LEF1, CYBB, HNF4A, BCL2L11, SMAD4 y KLF4. Implicando que la variación en los niveles de expresión de algunos de los genes mencionados ayudará a la detección temprana del AD (Doroszkiewicz et al., 2022; Tappia & Ramjiawan, 2023).



**Figura 9.** Red de interacción regulatoria miARN-miARN de los genes del MCODE1

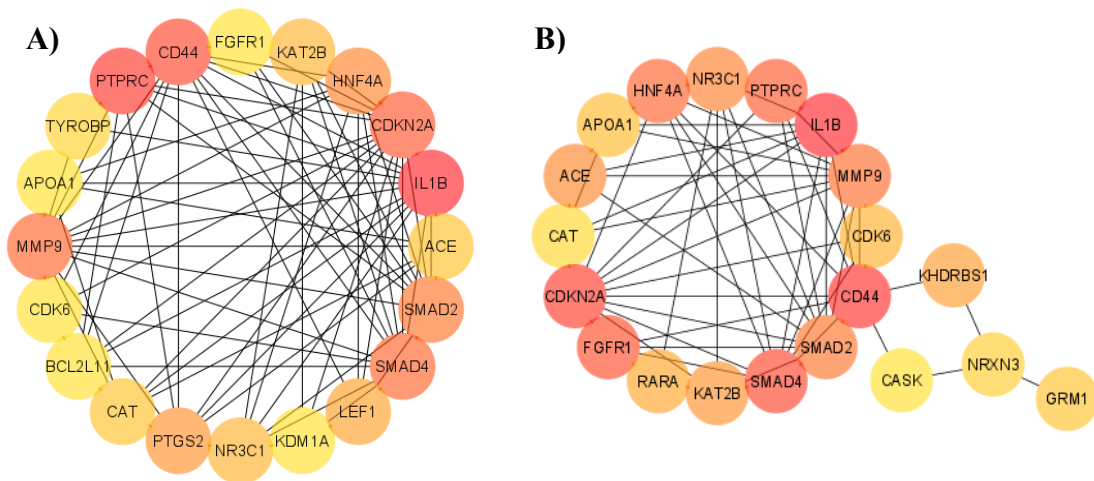
A) La red indica una interacción de 7 nodos y 6 aristas, el color verde y naranja representan los genes con alta y baja expresión respectivamente. B) hsa-miR-34a-5p tiene un FDR<0.05 y que este interactúa con 6 de los genes del MCODE1

De igual manera, hsa-miR-34a-5p ha sido identificado para la detección de las variaciones de p53 en suero sanguíneo (Van Goethem et al., 2023). La disfunción de p53 induce a la formación de tumores y por ende cáncer (Hassin & Oren, 2023). No obstante, p53 también genera una inhibición de BACE1 (encargada de la regulación del aclaramiento de  $A\beta$ ), lo que conlleva a un aumento de las plaquetas  $A\beta$  en el cerebro (Clark et al., 2022). Adicionalmente, se ha demostrado que p53 forma oligómeros y fibrillas las cuales interactúan con las proteínas Tau, contribuyendo al daño del ADN y desarrollo de AD (Sola et al., 2020). Esto implicaría que p53 tiene una alta relación con el apareamiento del AD. Piccirella et al. (2022) menciona que la detección de los niveles de expresión de  $U$ - p53<sup>AZ</sup> (una mutación de p53) puede ayudar a identificar personas con AD asintomáticas o que estén en etapas tempranas de desarrollo de la enfermedad. Indicando que la detección de los niveles de p53 no solo contribuirían al diagnóstico de pacientes con cáncer, sino que también a pacientes con AD en etapas iniciales.



### 3.1.3 Determinación de dianas terapéuticas por análisis de supervivencia

La determinación de los genes clave y cuello de botella se lo realizó con la función “cytoHubba” integrada en Cytoscape. La interacción de los genes se muestra en la **Figura 10**, donde se observó que ciertos genes se encuentran en ambas redes. En la **Tabla 5**, se determinó un total de 27 genes, de los cuales 7 genes fueron identificados como Hub y 7 como bottleneck. Los genes IL1B, PTPRC, CD44, CDKN2A, SMAD4, MMP9, HNF4A, NR3C1, KAT2B, ACE, CDK6, BCL2L11, FGFR1 se identificaron tanto como Hub y Bottleneck.



**Figura 10.** Identificación de genes Hub y Bottleneck empleando “cytoHubba”

La intensidad del color indica el número de interacción de un gen con respecto a otros. A) Red PPI de los genes Hub en base a su centralidad de grado. B) Red PPI de los genes Bottleneck en base a su intermediación.

La mayoría de los genes Hub y Bottleneck se relacionaron con la transcripción mediada por FoxO, la regulación de la respuesta neuro inflamatoria y la modulación de la transmisión sináptica química. La transcripción mediada por FoxO y modulación de la transmisión sináptica química ya han sido abarcadas en las secciones anteriores. La acumulación de  $A\beta$  y NFTs incrementa el estrés del retículo endoplasmático (ERS), provocando muerte neuronal (Shi et al., 2022). Además, causa la activación de la respuesta a proteínas no plegadas (URP) y el factor nuclear kappa-B (NF- $\kappa$ B) a través

de la vía PERK/ JAK1/ STAT3 y IRE1/ TXNIP; lo que conduce a respuestas inflamatorias asépticas (Wang et al., 2023). ERS también aumenta la expresión y secreción de IL-1 $\beta$  en el hipocampo por medio de la vía TXNIP/NLPR3 (Rivera et al., 2019). Como se ha descrito antes IL-1 $\beta$  es responsable de la liberación de factores neuro inflamatorios.

**Tabla 5.** Resumen de las funciones biológicas de los genes identificados como Hub y Bottleneck.

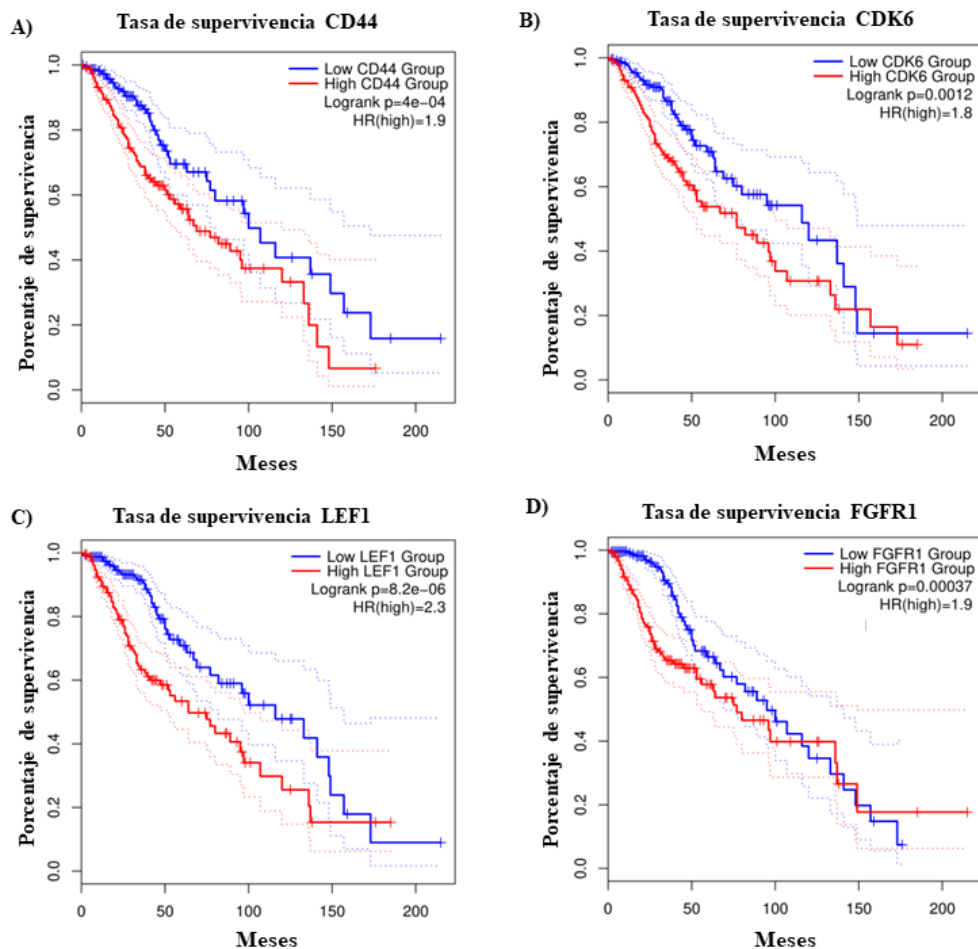
Símbolo	Descripción	Tipo de nodo	Función biológica
SMAD2	Miembro de la familia SMAD 2	Hub	Transcripción mediada por FoxO
PTGS2	Prostaglandina-endoperóxido sintasa 2	Hub	Regulación de la respuesta neuro inflamatoria
LEF1	Factor de unión potenciador linfoide 1	Hub	Transcripción mediada por FoxO
CAT	Catalasa	Hub	Modulación de la transmisión sináptica química
TYROBP	Adaptador de señalización inmune transmembrana TYROBP	Hub	Regulación negativa de la proliferación de la población celular.
APOA1	Apolipoproteína A1	Hub	Regulación de la respuesta neuro inflamatoria
KDM1A	Lisina desmetilasa 1A	Hub	Regulación de la vía de señalización apoptótica
IL1B	Interleucina 1 beta	Hub ,Bottleneck	Modulación de la transmisión sináptica química

PTPRC	Receptor de proteína tirosina fosfatasa tipo C	Hub, Bottleneck	Regulación positiva del proceso apoptótico
CD44	Glicoproteína de superficie celular	Hub, Bottleneck	Regulación de la respuesta neuro inflamatoria
CDKN2A	Inhibidor de cinasa dependiente de ciclina 2A	Hub, Bottleneck	Regulación positiva del proceso apoptótico
SMAD4	Miembro de la familia SMAD 4	Hub, Bottleneck	Transcripción mediada por FoxO
MMP9	Matriz metalopeptidasa 9	Hub, Bottleneck	Modulación de la transmisión sináptica química
HNF4A	Hepatocito nuclear factor 4 alfa	Hub, Bottleneck	Transcripción mediada por FoxO
NR3C1	Subfamilia de receptores nucleares 3 grupo C miembro 1	Hub, Bottleneck	Regulación de la respuesta neuro inflamatoria
KAT2B	Lisina acetiltransferasa 2B	Hub, Bottleneck	Transcripción mediada por FoxO
ACE	Enzima convertidora de angiotensina I	Hub, Bottleneck	Modulación de la transmisión sináptica química
CDK6	Quinasa 6 dependiente de ciclina	Hub, Bottleneck	Transcripción mediada por FoxO
BCL2L11	p21 (RAC1) quinasa activada 1	Hub, Bottleneck	Regulación de la respuesta neuro inflamatoria
FGFR1	Receptor 1 del factor de crecimiento de fibroblastos	Hub, Bottleneck	Regulación de la respuesta neuro inflamatoria
KLF4	Factor de transcripción KLF 4	Bottleneck	Regulación de la respuesta neuro inflamatoria

CHRM1	Receptor colinérgico muscarínico 1	Bottleneck	Modulación de la transmisión sináptica química
RARA	Receptor de ácido retinoico alfa	Bottleneck	Regulación de la respuesta neuro inflamatoria
CASK	Serina proteína quinasa dependiente de calcio/calmodulina	Bottleneck	Modulación de la transmisión sináptica química
KHDRBS1	KH ARN que contiene el dominio de unión, asociado a la transducción de señales 1	Bottleneck	Regulación transcripcional por RUNX3
NRXN3	Neurexina 3	Bottleneck	Modulación de la transmisión sináptica química
GRM1	Receptor metabotrópico de glutamato 1	Bottleneck	Modulación de la transmisión sináptica química

Sin embargo, PTPRC, KDM1A y CDKN2A estaban involucrados en la regulación positiva del proceso apoptótico, explicados en las secciones anteriores. Mientras que TYROBP y KHDRBS1 se relacionan con la regulación negativa de la proliferación celular y la regulación transcripcional mediado por RUNX3 respectivamente. La sobreexpresión de TYROB puede exacerbar la fosforilación de Tau e inducir la activación de TREM2, causando un daño en las células microgliales (**Linnartz et al., 2019**). TYROBP también forma un complejo proteico con DAP12 produciendo fagocitosis, y liberación de ROS (**Haure et al., 2022**). Se ha demostrado que RUNX3 puede inhibir la apoptosis neuronal inducida por la acumulación de plaquetas  $A\beta$  y NFTs, causado por la isquemia cerebral crónica (CCI) (**Shina & Efrati, 2022**). CCI genera un daño en la BBB (barrera hematoencefálica) y disfunciones mitocondriales, afectando a la producción de ATP (**Shi et al., 2022**). La mayoría de los genes identificados tienen una relación en el desarrollo del AD o son antagonistas de está.

El análisis de supervivencia realizado a los 27 genes clave y cuello de botella en los gliomas de bajo grado (LGG), revelaron que LEF1 presenta la mayor tasa de supervivencia ( $\log\text{-rank } p\text{-value} = 8.2e^{-6}$ ) y un coeficiente de riesgos alto mayor a 1.7 ( $HR = 2.3$ ). No obstante, 3 genes también cumplieron con los criterios preestablecidos como: CD44 ( $\log\text{-rank } p\text{-value} = 4e^{-4}$ ;  $HR = 1.9$ ), FGFR1 ( $\log\text{-rank } p\text{-value} = 3.9e^{-3}$ ;  $HR = 1.9$ ), CDK6 ( $\log\text{-rank } p\text{-value} = 1.2e^{-3}$ ;  $HR = 1.8$ ), los resultados se presentan en la **Figura 11**.



**Figura 11.** Análisis de supervivencia de los genes en la matriz LGG.

Los resultados se presentan en base a un  $\log\text{-rank } p\text{-value} < 0.05$  y  $HR \geq 1.7$ . El grupo control y el grupo con el gen sobreexpresado se representan con el color azul y rojo respectivamente. Las líneas punteadas indican los intervalos de confianza para cada grupo. A) Tasa de supervivencia de CD44 ( $\log\text{-rank } p\text{-value} = 4e^{-4}$ ;  $HR = 1.9$ ). B) Tasa de supervivencia de CDK6 ( $\log\text{-rank } p\text{-value} = 1.2e^{-3}$ ;  $HR = 1.8$ ). C) Tasa de supervivencia LEF1 ( $\log\text{-rank } p\text{-value} = 8.2e^{-6}$ ;  $HR=2.3$ ). D) Tasa de supervivencia FGFR1 ( $\log\text{-rank } p\text{-value} = 3.9e^{-3}$ ;  $HR = 1.9$ ).

**Xu et al. (2022)** reportó a CD44 como un gen clave en el desarrollo de AD, involucrado en la regulación de la adhesión celular, migración de células inmunes, daño de astrocitos y microglía. De acuerdo con **Moreno et al. (2020)**, el aumento de astrocitos disfuncionales por CD44 está asociado con la formación de plaquetas  $A\beta$  y desarrollo de tumores cerebrales. LEF1 se ha identificado como un regulador en la diferenciación y proliferación de las células “natural killer T” (NKT) (**Gong et al., 2018**). Sin embargo, los mecanismos moleculares que relacionan al gen con el Alzheimer aún no han sido especificados, por lo que se requieren más estudios al respecto. CDK6 tiene una interacción pleiotrópica en el AD, su sobreexpresión conduce a la reentrada abortiva de las neuronas en el ciclo celular, resultando en la apoptosis neuronal (**Ukrainseva et al., 2020**). Se ha evidenciado que CDK6 tiene una interacción epistática en el desarrollo del AD, corroborando la idea de la complejidad genética de esta enfermedad (**Marwa et al., 2022**).

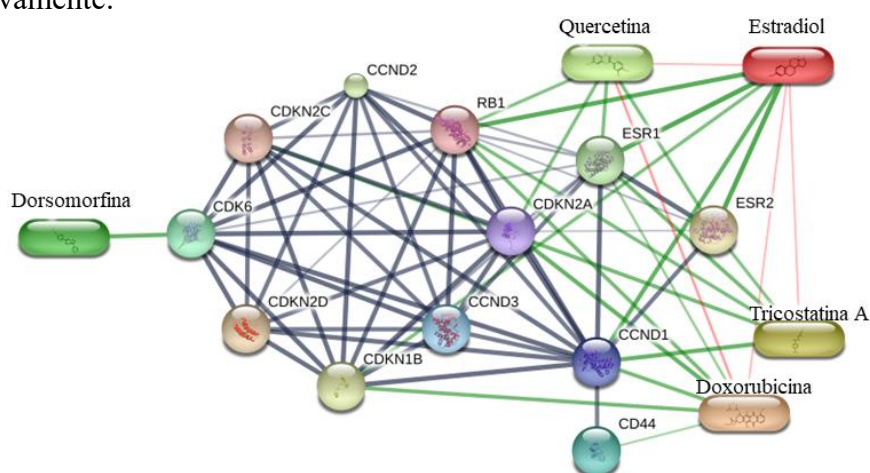
FGFR1 está relacionado con la regeneración del tejido neuronal y axones, su sobreexpresión estimula la regeneración de axones periféricos y formación de neuritas (**Klimaschewski & Claus, 2021**). Las neuritas están implicadas en el desarrollo y mantenimiento del sistema nervioso, contribuyendo a la regeneración de neuronas dañadas por plaquetas  $A\beta$  y NFTs (**He et al., 2018; Walker, 2020**). Como se observó en la **Figura 11D**, al haber una sobreexpresión de FGFR1, una persona tiene un 20 % de probabilidad de sobrevivir a los 200 meses. Mientras que una baja expresión indicó que el paciente solo tiene un 10 % de probabilidades de supervivencia. Se ha reportado que en pacientes con AD, los niveles de FGFR1 son elevados (**Ramy et al., 2022**). Por otra parte, en la **Figura 11A, B y C** se observó que la sobreexpresión de LEF1, CD44 y CDK6 generaron una probabilidad de supervivencia menor al 20 % a los 200 meses en comparación con la baja expresión de estos.

En resumen, debido a la falta de información que relacione a LEF1 en el desarrollo del AD y que FGFR1 es un gen antagonista, contrarrestando los efectos negativos de la enfermedad. Estos dos genes no fueron seleccionados para la siguiente parte de la investigación. En el caso de los genes CD44 como CDK6 fueron seleccionados como

dianas terapéuticas que tiene una relación directa en el desarrollo del AD. No obstante, otros genes como KHDRBS1 ( $\log\text{-rank } p\text{-value} = 1.9e^{-2}$ ;  $HD = 1.6$ ) y PTPRC ( $\log\text{-rank } p\text{-value} = 1.6e^{-2}$ ;  $HD = 1.6$ ) (Anexo 6), no se ajustaron a los parámetros establecidos y se consideraron no significativos en este estudio, pero se tomaron en cuenta para la búsqueda de fármacos en bases de datos fármaco-gen, con la finalidad de obtener una muestra de contraste más significativa.

### 3.1.4 Acoplamiento Molecular

CD44 y CDK6, KHDRBS1, LEF1 y PTPRC se usaron como información de entrada para la búsqueda de fármacos candidatos en bases de interacción fármaco-gen como CTT, DrugBank y TTA. En total se encontraron 23 fármacos aprobados por la FDA que tienen interacción con los genes significativos: CD44 y CDK6 (Anexo 7). Empleando la plataforma STITCH se generó la red de interacción fármaco-proteína. En la **Figura 12**, se identificó que CDK6 tiene una interacción directa con la Dorsomorfinina (4-(6-(4-(2-(piperidin-1-il)etoxi)fenil)pirazolo (1,5-a)pirimidin-3-il)piridina) y una interacción semidirecta con Quercetina (2-(3,4-dihidroxifenil)-3,5,7-trihidroxi-4H-1-benzopirán-4-ona), Estradiol (Estra-1,3,5(10)-triene-3,17 $\beta$ -diol) y Tricostatina A ((2E, 4E,6R)-7-(4-(dimetilamino)fenil)-N-hidroxi-4,6-dimetil-7-oxo-2,4-heptadienamida), por medio de los genes RB1, CDKN2A y CDKN1B respectivamente.



**Figura 12.** Red de interacción fármaco-proteína de los genes candidatos CD44 y CDK6

Los colores de las aristas indican el tipo de interacción, gris: interacción gen-gen, verde: interacción fármaco-proteína y rojo: interacción fármaco-fármaco.

El gen CDKN1B codifica para la proteína p27<sup>Kip1</sup>, la cual se integra a los microtúbulos de las neuronas promoviendo un correcto transporte axonal, formación de espinas dendríticas y migración neuronal (**Morelli et al., 2018**). De acuerdo con **Martínez et al. (2022)**, la baja expresión de p27<sup>Kip1</sup> causa un déficit en el transporte axonal y reduce los niveles de acetilación de tubulina. Este último proceso se relaciona con la estabilización de microtúbulos neuronales a través de la agregación de grupos acetilo, provenientes de la proteína tubulina; evitando su mal funcionamiento a causa del estrés mecánico (**Brotzakis et al., 2021**). Sin embargo, se ha evidenciado que la presencia de A $\beta$ 42 genera una desregularización de p27<sup>Kip1</sup>, promoviendo la necrosis neuronal o evitando que las neuronas entren en el proceso apoptótico natural lo que induce neurotoxicidad (**García et al., 2022**).

P16<sup>Ink4a</sup> (p16) y p14<sup>ARF</sup> (p14) son proteínas supresoras tumorales codificadas por CDKN2A (**Chan et al., 2021**). Según **Dorigatti et al. (2022)**, el envejecimiento produce una sobreexpresión de p16, induciendo senescencia de los astrocitos, contribuyendo a la neuro inflamación. De acuerdo con **Talma et al. (2021)**, una alta expresión de p16 puede ser un subproducto neurotóxico (causado por algún traumatismo cerebral), derivando a una disfunción de la capacidad homeostática del tejido cerebral. No obstante, la sobreexpresión de p16 también cumple una función protectora de las neuronas ante la alta expresión de las ciclinas dependientes de quinasas (CDK), que pueden inducir a la necrosis neuronal (**Safwan et al., 2022**). Adicionalmente, **Kfoury et al. (2018)** menciona que, la baja expresión o inhibición de p16 tiene consecuencias nocivas para los astrocitos, incluso induciendo su transformación en astrocitos malignos. Esto podría causar conexiones neuronales deficientes y hasta el desarrollo de cáncer cerebral (**Brandebura et al., 2023**). Como señala **Walker et al., (2020)**, aún se necesitan más estudios para determinar la relación de p16<sup>Ink4</sup> en el progreso de enfermedades neurodegenerativas o en su ralentización.

Por otro lado, p14 ha sido asociado con la regulación de p53, implicado en el control de la proliferación celular, evitando el apareamiento de cáncer y metástasis (**Marei et al., 2021**). La regulación esta mediada por el gen MDM2, estudios en ratones han



evidenciado que una disfunción en p14 induce el desarrollo de tumores e incluso provoca la muerte en el primer año de vida (Marei et al., 2021; Suarez et al., 2020). A pesar de que p53 si tiene una relación con la formación de plaquetas  $A\beta$  y NFTs (Farmer et al., 2020). No se ha evidenciado que p14 influya directamente con el desarrollo del AD; sin embargo, debido a la complejidad de la enfermedad, existe la posibilidad de que las mutaciones o la desregularización de la proteína pueda inducir efectos deletéreos en el cerebro (Clark et al., 2022).

Con respecto a Rab1 (Rb), forma parte de la familia de Rab reguladores de GTPasas (Rab-GTPasas), el gen está relacionado con la regulación del transporte de vesículas entre el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi (Kuo et al., 2021). Pese a ello, se ha demostrado que otros tipos de Rab como Rab4, 5, 7 y 27 inducen la expresión del gen APOE, generando la neurotoxina APOE4, la cual evita la degradación de  $A\beta$  (Behl et al., 2022; Underwood et al., 2020). Además, la sobreexpresión de Rab4 aumenta la transcripción de PSEN1 (Kiral et al., 2018). Pese a que ciertos Rab-GTPasas están relacionados con el AD, no se ha demostrado que Rab1 tenga interacción directa con la enfermedad. Incluso se ha evidenciado que cuando Rb está sobre expresado permite la recuperación de neuronas dopaminérgicas a causa de la  $\alpha$ -sinucleína en modelos de ratones con Parkinson (Jordan et al., 2022).

La información presentada indicó que la inhibición del gen CDKN1B genera efectos adversos en el dinamismo neuronal, lo que conduce a una disfunción en la misma. Por otra parte, el rol de p16 en el desarrollo o prevención del AD aún sigue bajo investigación, mientras que, no hay evidencia que p14 presente relación con la enfermedad de interés. A pesar de que algunos genes Rab-GTPasas si están relacionados con el desarrollo del AD, pero específicamente Rab1 no presentó una interacción con está. La sobreexpresión o inhibición de los genes indican la presencia de mutaciones, lo que implicaría una heterogeneidad genética (Holmes & Patrick, 2018; Lawson et al., 2020). De acuerdo con Sun et al. (2019), la heterogeneidad genética es importante para poder identificar posibles biomarcadores o dianas terapéuticas para el desarrollo de un tratamiento. Si no se toma en cuenta este concepto,

se puede llegar a conclusiones erróneas con respecto a la integración de los genes con algunas enfermedades en específico (**Woodward et al., 2022**). Por esta razón, los genes CDKN2A, CDKN1B y Rab1, no se tomaron en cuenta para el análisis siguiente.

Con respecto al gen CD44 tiene una interacción directa con Doxorubicina (14-Hidroxi-daunorubicina) y se identificó una interacción semi directa con Tricostatina A por medio del gen CCND1. Este último también genera un complejo con CDK4 y CDK6 (CCND1/CDK4/6), reguladores de la proliferación celular a través de la transición de la fase G1 a la fase S (**Li et al., 2020**). **Pedraza et al., (2022)** menciona que CCND1 se relaciona con un desequilibrio de la señalización inhibitoria/excitatoria y con anomalías de las espinas dendríticas; contribuyendo a la disfunción sináptica y pérdida de la neuro plasticidad. De acuerdo con los resultados de **Dietrich et al. (2022)**, la producción del ácido 3-nitropropiónico (3-NP; neurotoxina involucrada en diversas enfermedades neuronales incluidas el AD) induce una sobre transcripción de CCND1 conduciendo a la neurodegeneración en ratones. Por esta razón, CCND1 fue seleccionado para la realización del acoplamiento molecular con los fármacos Tricostatina A y Estradiol.

Utilizando PDB se escogió las siguientes estructuras cristalinas para CD44, CDK6 y CCND1 respectivamente: 4PZ3 ( $R\text{-work} = 0.166$ ), 5L2I ( $R\text{-work} = 0.226$ ) y 2W96 ( $R\text{-work} = 0.203$ ). Con Pubchem se descargó las estructuras 3D de cada uno de los fármacos (Las estructuras 3D y 2D de los ligandos se muestra en el Anexo 8). Para determinar el mecanismo de acción de los fármacos en las dianas terapéuticas se realizó un acoplamiento molecular rígido en AutoDockVina X (ADVX) y HDock (HD) en los sitios de unión preestablecidos bibliográficamente. Los resultados del acoplamiento molecular se resumen en la **Tabla 6**, en el cual Doxorubicina (DOX) en ambos análisis es el único fármaco cuya energía libre de unión ( $\Delta G_{ADVX} = -6.33$  kcal/mol y  $\Delta G_{HD} = -162.14$  kcal/mol) es mayor que la  $\Delta G$  de referencia. De acuerdo con **Suravajhala et al. (2021)**, si la  $\Delta G$  del compuesto de interés es mayor que el  $\Delta G_{ref}$ , implica un menor potencial de inhibición de la proteína. No obstante,  $\Delta G$  se ve afectado por el número de enlaces de hidrógenos (HB, por sus siglas en inglés), la

distancia (2.5 a 3 Å siendo las distancias más comunes, aun valor menor implica una interacción fuerte) y los ángulos de unión de estos (**Malik & Guo, 2022**). Además, otros tipos de enlaces como los Pi-pi (PP), Pi-cación (PC), Pi-Anión, (PA) Pi-alkyl (PK), carbono-hidrogenó (CH), Alkyl (AK), Pi-sigma (PS) y Pi-Pi stacked (PPs) también contribuyen a la estabilidad del complejo proteína-ligando y en la  $\Delta G$  (**Brylinski, 2018; Ibrahim et al., 2021**).

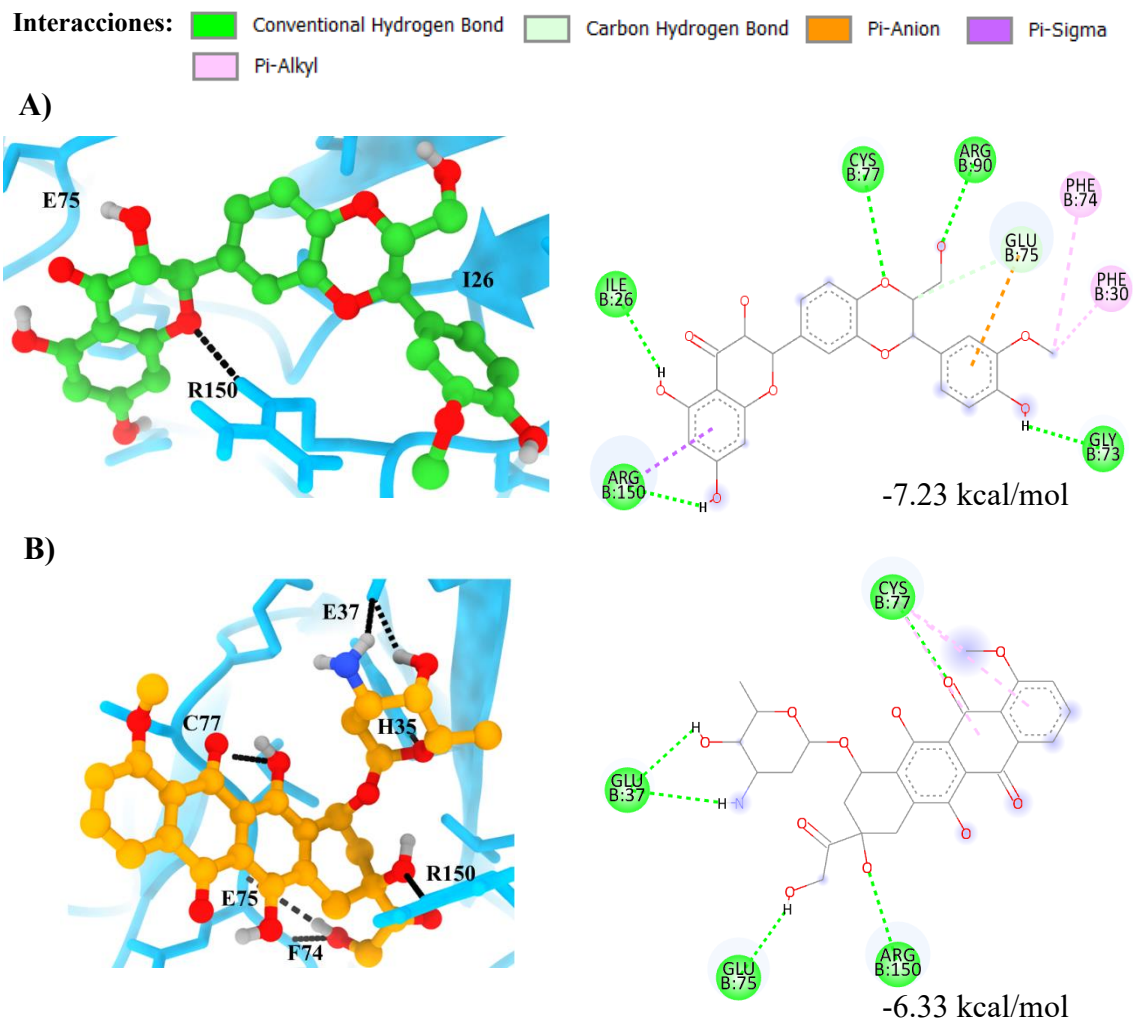
**Tabla 6.** Resultados de los acoplamientos moleculares en AutoDockVina X y HDOCK de las interacciones de los fármacos con las dianas terapéuticas.

Genes	Fármacos (ligandos)	$\Delta G$ [kcal/mol]	HB convencional	Interacciones no iónicas
			[Å]	
AutoDockVina X (ADVX)	CD44 (4PZ3)	Silibina*	I26 (1.97), C77 (2.70), R90 (2.05), R150 (2.06)	F30, F74, E75
		Doxorrubicina	E37 (2.28; 2.23; 2.13), E75 (2.00), C77 (2.38), R150 (1.93)	C77
	CDK6 (5L2I)	Palbociclib*	V101 (3.06), D163 (3.18; 1.96)	I19, V27, A41, V77, F98, E99, L152, A162
		Dorsomorfina	K43 (2.16), V101 (1.91)	I19, A41, L43, V77, F98, V101, D102, L152, A162, F164
	CCND1 (2W96)	Curcumina*	R87 (1.94; 2.45)	A39
		Tricostatina A	R87 (1.83), L149 (2.71), K149 (1.76; 2.45)	R87, S90, L91, L148
Estradiol		L148 (2.04)	R87, L91	

HDOCK (HD)	CD44 (4PZ3)	Silibina*	-168.53	E37 (2.45), E73 (2.46), E75 (3.38)	F74, V148	E75,	
		Doxorrubicina	-162.14	I26 (2.56), R90 (3.06), V148 (2.52)	C77, C97		
	CDK6 (5L2I)	Palbociclib*	-134.31	-		I19, V27, A41, V77, D104, L152, A162	
		Dorsomorfina	-135.76	-		K29, R38, F39, R78, H100, D102	
	CCND1 (2W96)	Curcumina*	-81.07	-		C47, L148, K149	
		Tricostatina A	-81.36	S90 (3.21)		C38, S41, S90, L148, K149	
Estradiol		-82.81	E87 (2.20)		R87, S90, L91, K149		

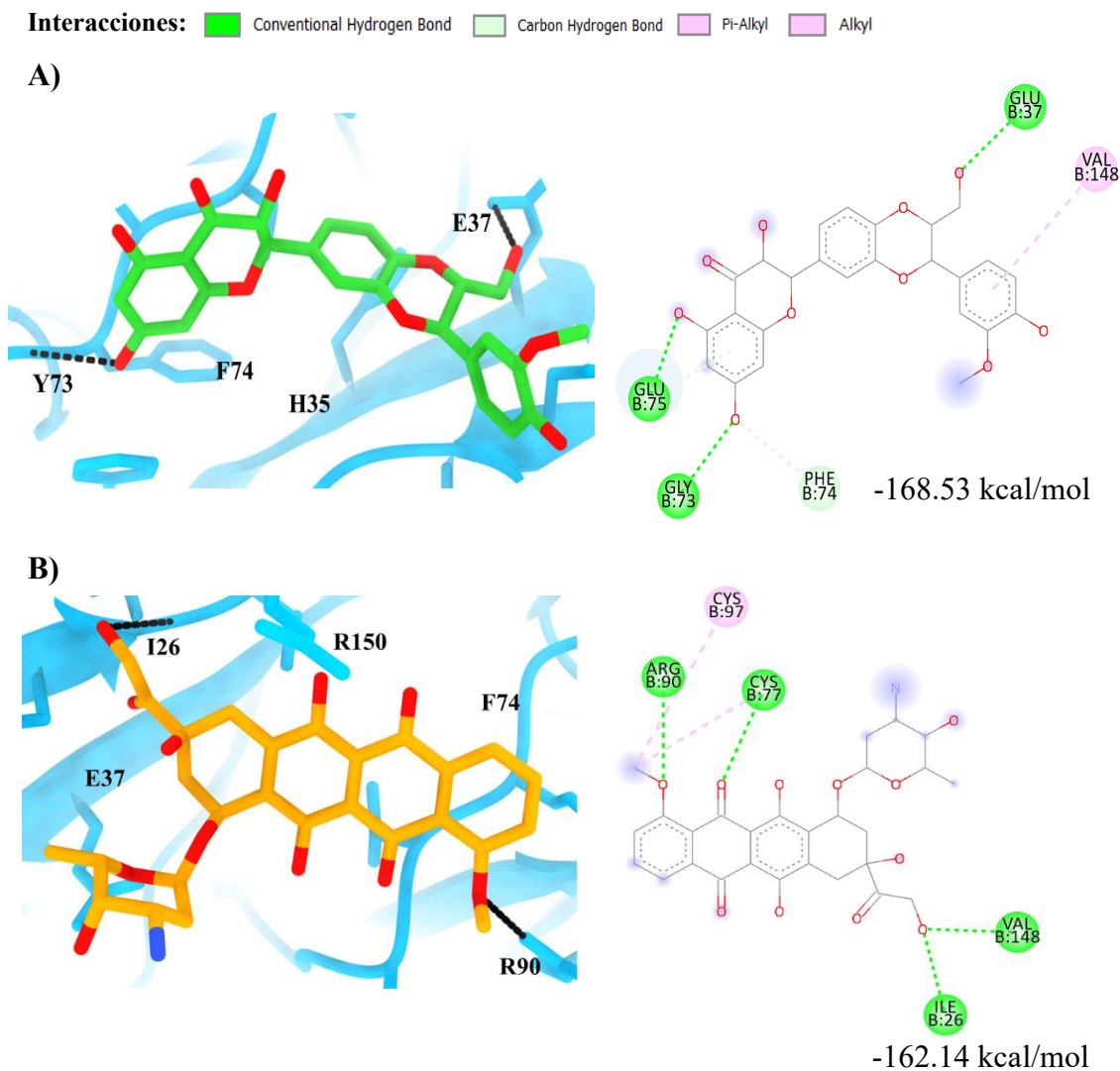
Los ligandos de referencia están marcados con (\*), la energía libre de unión se representa como  $\Delta G$  y para los enlaces de hidrogeno se empleó la siguiente abreviatura: HB. “-” no tiene ningún HB. Los aminoácidos se presentan en formato de una letra.

Los HB se formaron entre los aminoácidos (aa): I26, E75, C77, R90, V148, R150 de CD44 (**Figura 13B y 14B**). Sin embargo, solo C77 y R150 están presentes en las interacciones del ligando de referencia y DOX (**Figura 13A**). **Ruiz et al., (2021)** reportó que C77, R150, E34 y E75 son residuos esenciales en el sitio activo de CD44, posiblemente influyendo en la inhibición de esta proteína. Las interacciones Pi-alkyl (PK) se formaron entre C77 y C97. Pese a ello, ninguno de estos residuos coincide con los identificados en la Silibina (SIL) (F30, F74 y V148). Se observa que DOX solo presentó dos tipos de enlaces (HB y PK), mientras que SIL cuenta con enlaces CH, PA y PS. Como se mencionó antes, estos enlaces influyen en la  $\Delta G$ , la ausencia de este tipo de interacciones podría ser una de las razones por las cuales la  $\Delta G$  de DOX es mayor.



**Figura 13.** Acoplamiento molecular de la proteína CD44 con Silibina y Doxorubicina, realizado en AutoDockVina X.

Los enlaces de hidrogeno se muestran con líneas negras entrecortadas. En la parte derecha se observa la localización de los ligandos en el sitio de unión de la proteína, del lado izquierdo se muestra los enlaces generados. A) El acoplamiento molecular la Silibina (verde) fue de  $\Delta G = -7.23 \text{ kcal/mol}$ . B) Los resultados muestran la unión de la Doxorubicina (naranja) en sitio activo de CD44, con  $\Delta G = -6.33 \text{ kcal/mol}$ .

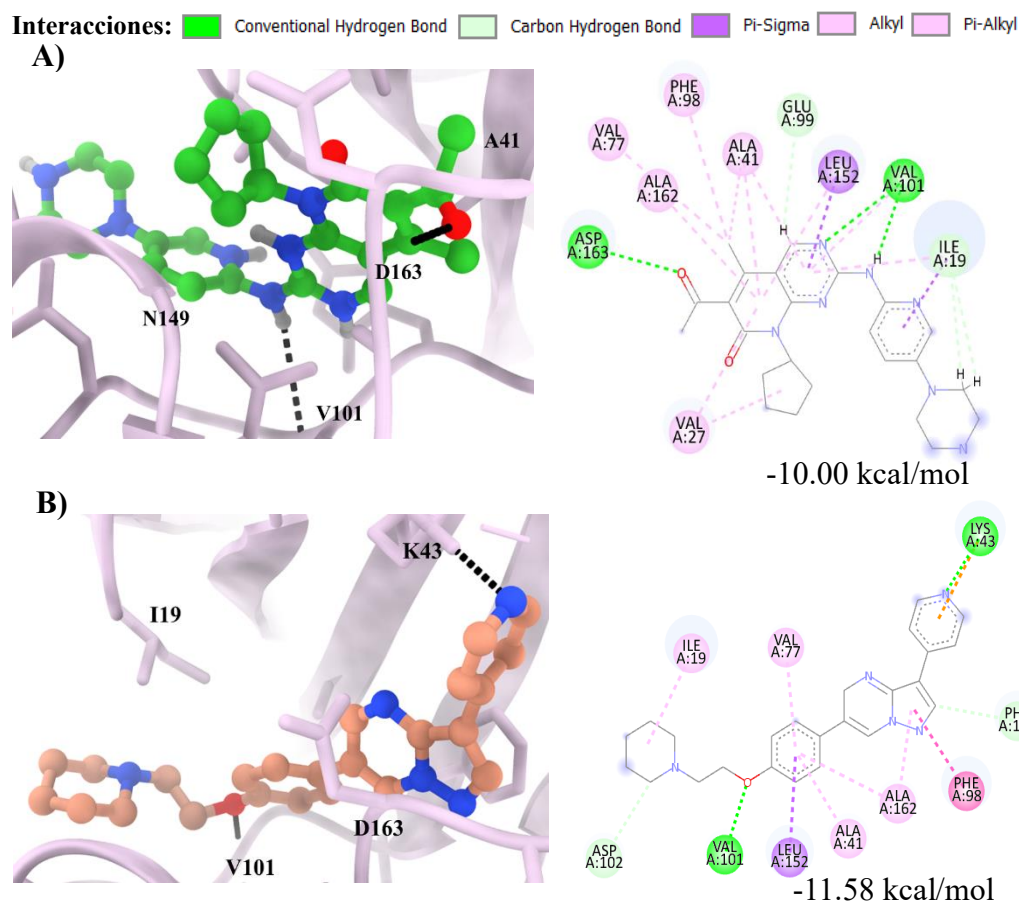


**Figura 14.** Acoplamiento molecular de la proteína CD44 con Silibina y Doxorubicina, realizado en HDOCK.

En la parte derecha se observa la localización de los ligandos en el sitio de unión de la proteína, del lado izquierdo se muestra los enlaces generados. A) El acoplamiento de la Silibina en el sitio activo de la proteína CD44, he indica una  $\Delta G = -168.53 \text{ kcal/mol}$ . B) La interacción de la Doxorubicina con CD44 muestra una  $\Delta G = -162.14 \text{ kcal/mol}$ .

Por otra parte, Dorsomorfin (DOR) presentó una menor  $\Delta G$  (-11.58 y -135.76 kcal/mol) con respecto a Palbociclib (PAL; -10.00 y -134.31 kcal/mol) en ambos análisis (ADVX y HD. De acuerdo con **Pantsar & Poso (2018)**, si la  $\Delta G$  es igual o menor que  $\Delta G_{ref}$  indicaría un mayor potencial de inhibición. Los residuos K43 y V101 formaron HB con DOR en el análisis realizado por ADVX (**Figura 15A y B**). Pero no

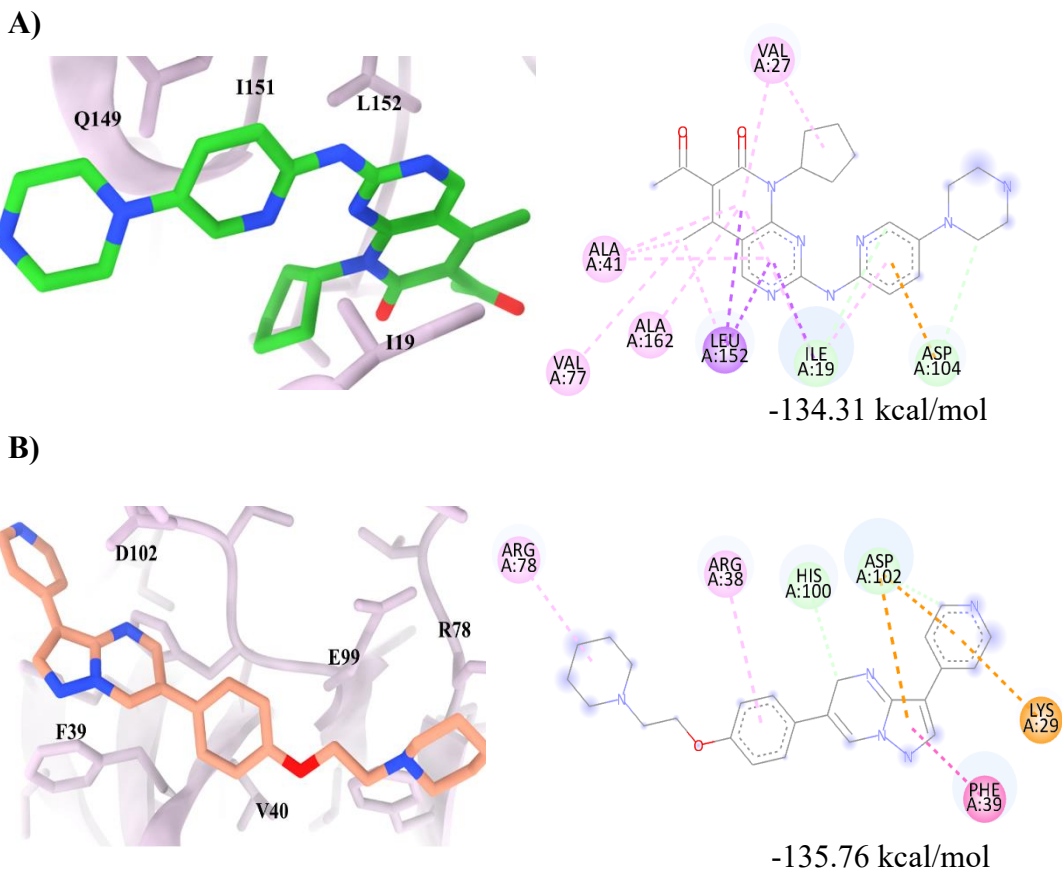
se detectó ningún aa que formara un HB en los resultados de HDock tanto para el ligando de referencia como el ligando de interés (**Figura 16A y B**). Comparando los HB formados en PAL y DOR se identificó que solo V101 interactúa con ambos ligandos. No obstante, el acoplamiento molecular realizado por **Susanti et al. (2021)** con 8 ligandos diferentes, indicó que K34 también juega un papel importante en el mecanismo de inhibición de CDK6 al igual que V101. Como se ve en la **Figura 15**, la mayoría de los enlaces formados en DOR y PAL son de tipo PK y Alkyl (AK), ambos ligando interactúan con los residuos I19, A41, V77, A162. Según **Baig et al. (2022)**, los aa mencionados y juntamente con F98, H100 y D102, fueron identificados con la capacidad de formar enlaces no iónicos de tipo PK, AK y PP, influyendo en el dinamismo del complejo ligando-proteína.



**Figura 15.** Acoplamiento molecular de la proteína CDK6 con Palbociclib y Dorsomorfina, realizado en ADVX.

A) Los resultados extraídos de ADVX muestran que Palbociclib (verde) tiene una  $\Delta G = -10.00 \text{ kcal/mol}$  y una formación de diferentes enlaces. B) La interacción de Dorsomorfina (salmón) reveló tener una  $\Delta G = -11.58 \text{ kcal/mol}$ , al acoplarse en el sitio activo de la proteína.

**Interacciones:** ■ Conventional Hydrogen Bond ■ Carbon Hydrogen Bond ■ Pi-Anion ■ Pi-Sigma  
■ Pi-Alkyl ■ Alkyl ■ Pi-Pi Stacked ■ Pi-Cation



**Figura 16.** Resultados del acoplamiento molecular realizado en HDOCK con Palbociclib y Dorsomorfina

En la parte derecha se observa la localización de los ligandos en el sitio de unión de la proteína, del lado izquierdo se muestra los enlaces formados. A) Los resultados muestran que Palbociclib (verde) tiene una  $\Delta G = -134.31 \text{ kcal/mol}$  y al igual que en el análisis de ADVX se forman una gran gama de interacciones entre el ligando y la proteína. B) La interacción de Dorsomorfina (salmón) reveló tener una  $\Delta G = -135.76 \text{ kcal/mol}$ , a diferencia de Palbociclib, no existe una gran cantidad de enlaces.

Sin embargo, los múltiples enlaces que se generan sobre una zona en especial del ligando pueden ser contra productivo, ya que si existe una gran cercanía entre los enlaces o superposición se genera un estado de “competencia” (Ranaudo et al., 2022). Indicando que ciertas interacciones serán dominantes sobre otras, afectando directamente la  $\Delta G$  (Fu et al., 2018). Por esta razón, es posible que la  $\Delta G$  de PAL es mayor a la de DOR, ya que tiene un gran número de enlaces PK y enlaces a una zona

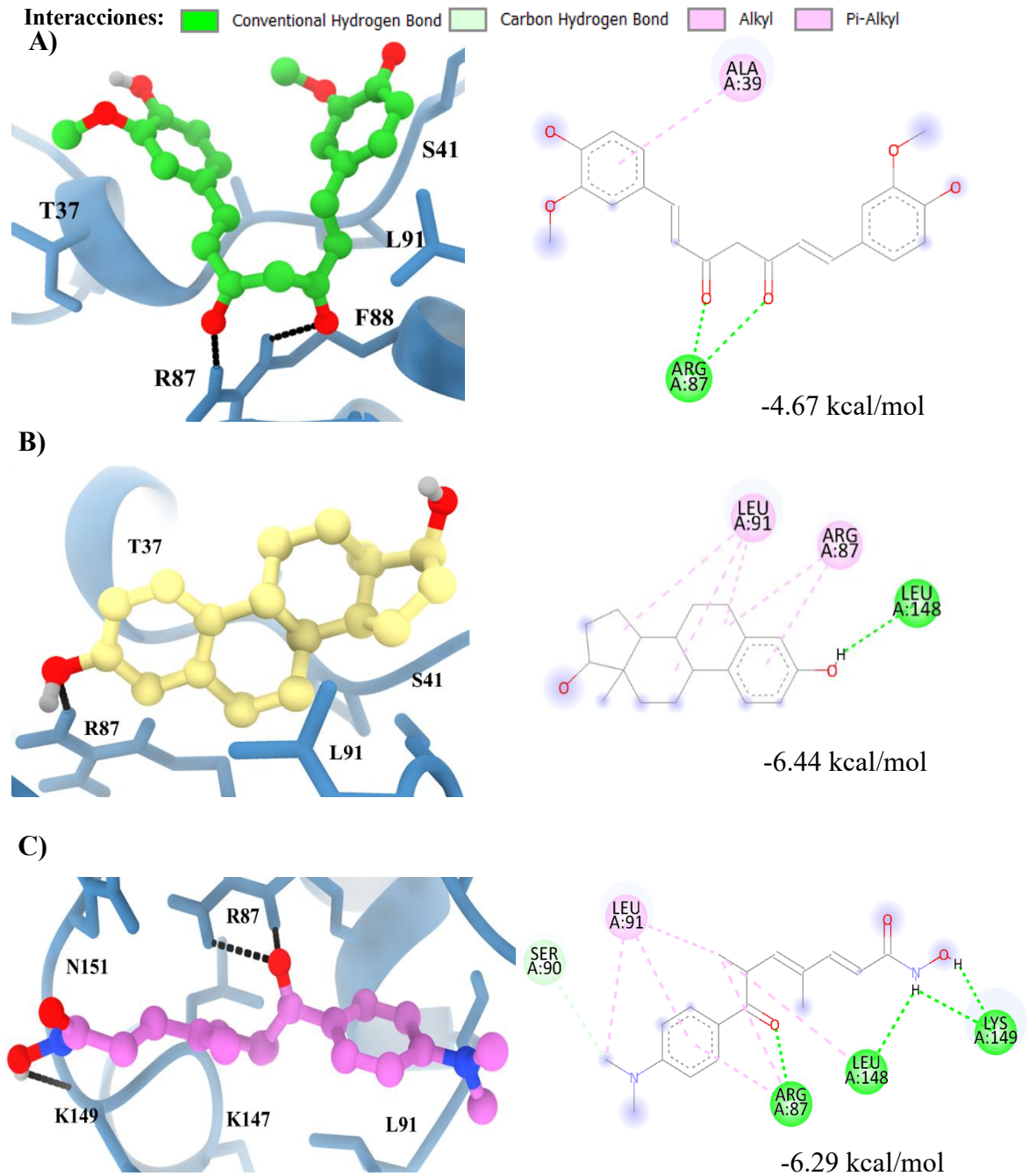


específica de PAL (**Figura 15A y 16A**). En la **Figura 15B y 16B**, se determinó que DOR genera enlaces Pi-Catión (PC) con los residuos K29 K43, D102 y un enlace Pi-Anión (PA) con D102, aunque los enlaces PC y PA también son no iónicos, solamente se ha reportado que D102 tiene una interacción PC en la proteína CDK6 (**Luo et al., 2022**).

En la **Figura 17**, se visualizó los resultados del acoplamiento molecular de Curcumina (CUR), Tricostatina A (TSA) y Estradiol (EST) con CCND1. En la **Tabla 6**, se contrastó que TCA y EST presentó una  $\Delta G$  menor (-6.44 y -6.29 kcal/mol) que CUR (-4.67 kcal/mol), como se había mencionado el número de interacciones ligando-proteína influye directamente en la  $\Delta G$ . TCA y EST contaron con un mayor número de interacciones HB que CUR con los residuos L149, K149, L148. No obstante, estos aa no se han reportado tener importancia en el mecanismo de inhibición de la proteína, los residuos I196 y N198 han sido identificados como aa esenciales en el sitio activo de CCND1 (produciendo una  $\Delta G=9.30$  kcal/mol) (**Mokgautsi et al., 2021**). Incluso los resultados obtenidos en HDOCK, corroboraron que estos residuos no están presentes en el análisis realizado (**Figura 18**). C38, R87, L91, L148 y L149 son interacciones no iónicas de tipo AK y PK, mientras que S41 y S90 de tipo CH (enlace carbono hidrógeno), como se explicó antes, este tipo de enlaces son importantes en el dinamismo ligando-proteína. Pese a ello, **Yang et al. (2023)** indicó que los residuos M82, A190, P157, P79, P40 y P199 tienen una interacción PK y únicamente a P200 una interacción CH. Cabe recalcar que, TCA cuenta con un enlace no favorable (UB, por sus siglas en inglés) con el residuo R87 (**Figura 18C**). De acuerdo con **Abdulhameed (2022)**, un UB podría significar la presencia de fuerzas de repulsión, conllevando a una inestabilidad del complejo ligando-proteína.

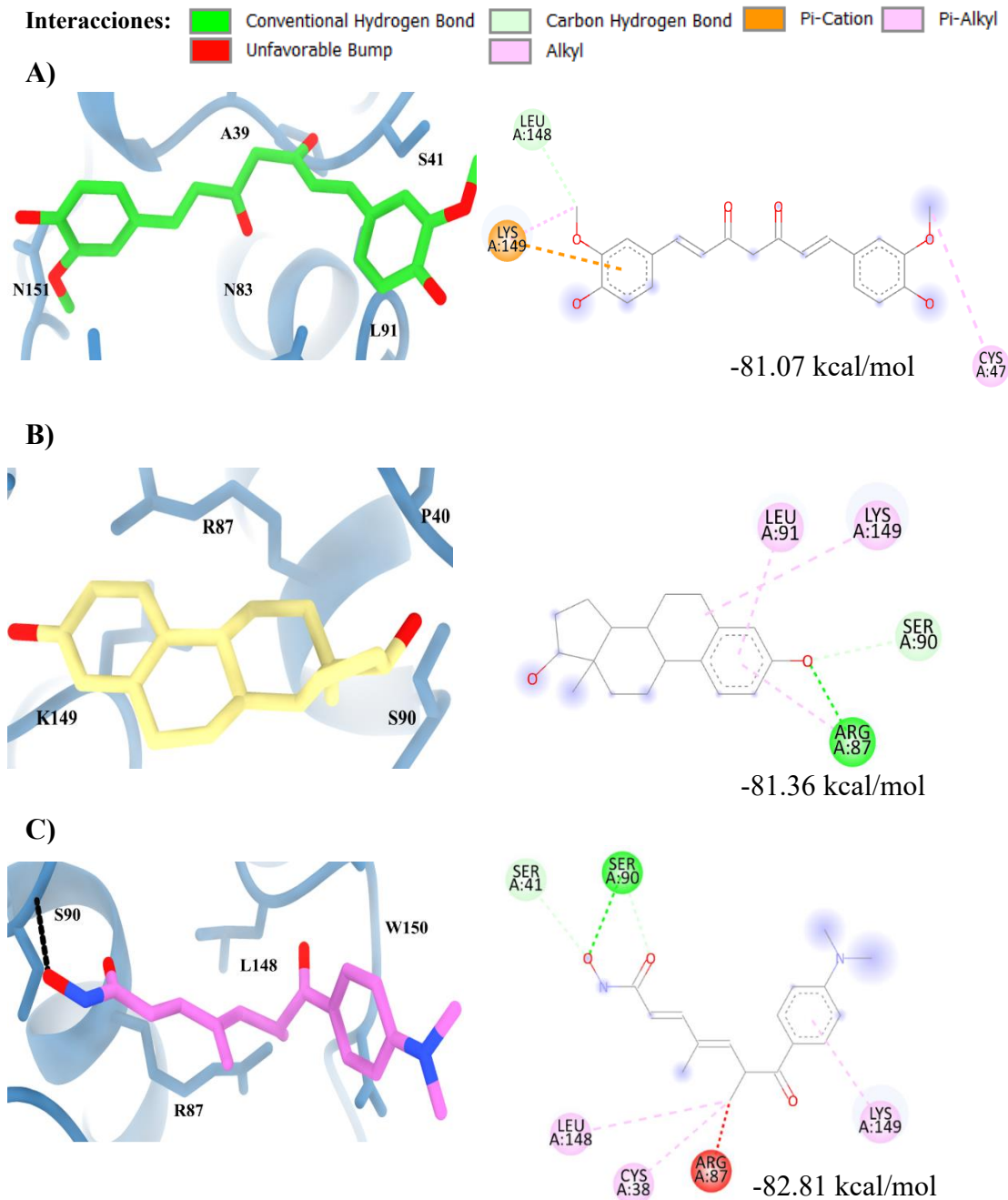
Aunque los residuos identificados en este estudio no coincidan con los reportados en otras investigaciones. Estos siguen teniendo una importancia en el mecanismo de acción del fármaco sobre la proteína, pero en menor grado (**Senior et al., 2020**). Las interacciones moleculares identificadas para DOX, DOR, TSA y EST pueden ser exploradas posteriormente para la síntesis de nuevas moléculas con la capacidad de

interactuar o inhibir la proteína de interés, con el fin de plantear tratamientos *in vivo* e *in vitro* (Owoloye et al., 2022).



**Figura 17.** Acoplamiento molecular de la proteína CCND1 con Curcumina, Estradiol y Tricostatina A.

A) El acoplamiento molecular la Curcumina indica una  $\Delta G = -4.67 \text{ kcal/mol}$ . B) Los resultados muestran la unión del Estradiol (amarillo) en sitio activo de CD44, con  $\Delta G = -6.44 \text{ kcal/mol}$ . C) Muestra las interacciones de la Tricostatina A (violeta) con el sitio de unión de la proteína con una  $\Delta G = -6.29 \text{ kcal/mol}$ .

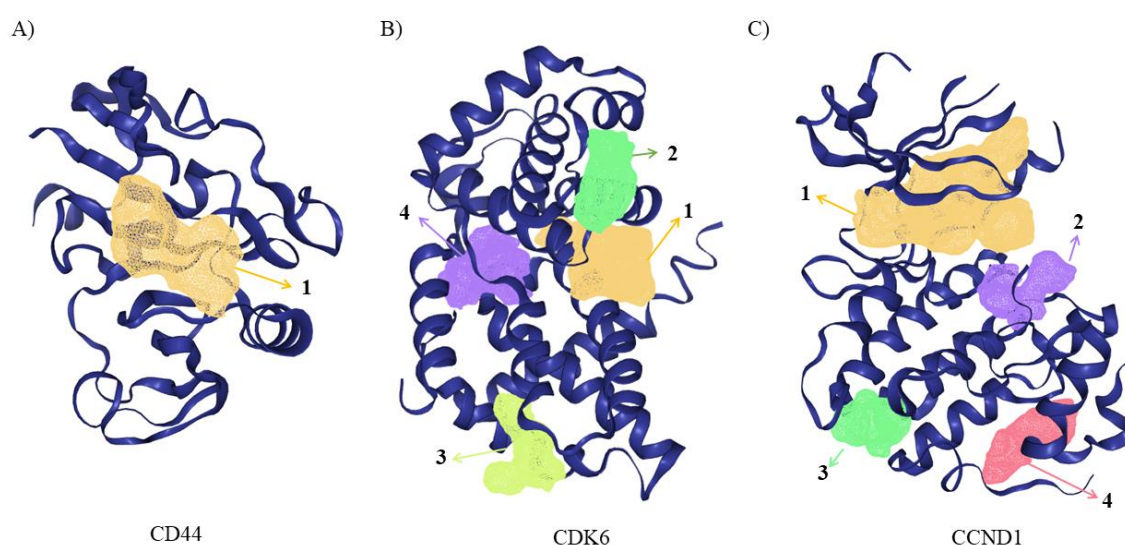


**Figura 18.** Acoplamiento molecular de la proteína CCND1 con Curcumina, Estradiol y Tricostatina A desarrollado en HDOCK

A) El acoplamiento molecular la Curcumina (verde) tuvo una  $\Delta G = -81.07 \text{ kcal/mol}$  en el sitio activo establecido. B) Los resultados muestran la unión del Estradiol (amarillo) en sitio activo de CCND1, con una  $\Delta G = -84.36 \text{ kcal/mol}$ . C) Se presenta las interacciones de Tricostatina A (violeta) con el sitio de activo de la proteína CCND1 con una  $\Delta G = -82.81 \text{ kcal/mol}$ .

### 3.1.4.1 Análisis de los sitios activos

El sitio activo o cavidad catalítica (CC) permite comprender el proceso biocatalítico de una proteína en presencia de un ligando en específico (Yabukarski et al., 2020). No obstante, los sitios activos distales a la CC de igual forma pueden tener un rol en el proceso catalítico (Wang et al., 2021). Por esta razón, se realizó una predicción de los sitios activos con “DogSiteScorer”. Como se observa en la **Figura 19**, se identificó 4 sitios activos tanto para CDK6 y CCND1, mientras que para CD44 solo se determinó un sitio activo. El acoplamiento molecular se realizó en cada uno de los sitios de unión determinados.



**Figura 19.** Identificación de los sitios activos para las proteínas CD44, CDK6 y CCND1

Sitios activos distales a la cavidad catalítica de la proteína. Cada uno de los sitios activos están señalados y enumerados. A) Solo un sitio activo identificado para CD44, “DrugScore” (DS) = 0.50. B) sitio activo 1 (DS= 0.82), 2 (DS=0.61), 3 (DS=0.5), 4 (DS=0.73). C) Sitio activo 1 (0.82), 2 (0.52), 3 (DS= 0.52), 4 (DS=0.60).

Los resultados del acoplamiento de los ligandos en los sitios drugables se resumen en la **Tabla 7**. Cabe recalcar que, los residuos del sitio activo (SA) 1 son similares a los aa reportados bibliográficamente (Anexo 9, se comparan los aa de los SAs mencionados). Pese a ello, la  $\Delta G$  de DOX siguió siendo mayor que la de referencia, indicando que no existe una gran significancia al aumentar el número de aa. Por otra

parte, la  $\Delta G$  de DOR en SA1, fue menor que la de referencia. No obstante, con respecto a SA2, SA3 y SA4 sus  $\Delta G$ s fueron mayor, siendo de -6.92, -5.91, -7.98 kcal/mol respectivamente. Esto indicaría que las interacciones intramoleculares de estos SAs no serían de interés biológico para la optimización del complejo proteína-ligando (Alcántara et al., 2022). En el caso del receptor CCND1, en todos los SAs las  $\Delta G$ s fueron entre 6.50 a 8.50 kcal/mol, siendo menores a la  $\Delta G_{ref}$ . Las interacciones moleculares de estos SAs pueden ser investigados para formular nuevas moléculas que pueden inhibir la actividad de la proteína receptora (Heitmeier et al., 2019).

**Tabla 7.** Resultados del acoplamiento molecular en cada uno de los SA identificados

Receptores	Fármacos	Sitio activo	$\Delta G$ [kcal/mol]
CD44	Silibina*	R	-7.23
	Doxorrubicina	1	-6.33
CDK6	Palbociclib*	R	-10.00
		1	-11.28
	Dorsomorfina	2	-6.92
		3	-5.91
		4	-7.98
CCND1	Curcumina*	R	-4.64
		1	-7.95
	Tricostatina A	2	-7.80
		3	-7.59
		4	-6.65
	Estradiol	1	-8.25
		2	-7.47
3		-7.55	
4		-7.02	

Los fármacos marcados con (\*) son usados como referencia. El símbolo "R" es la cavidad catalítica identificada como el sitio activo natural de la proteína.

### 3.1.5 Evaluación de las propiedades farmacocinéticas

Para la evaluación de las propiedades farmacocinéticas (Mutagenicidad, hepatotoxicidad y carcinogénesis) se realizó con el software VEGA, empleando los códigos SMILES (Anexo 10). Los resultados del análisis se resumen en la **Tabla 8**, se observó que DOR y DOX producen hepatotoxicidad y únicamente DOX genera mutagenicidad. De acuerdo con **Pan et al. (2019)**, DOR inhibe la vía metabólica de la proteína morfogénica ósea (BMP) generando una desregularización en la proliferación de hepatoblastomas (HP). Los HP se diferencian en hepatocitos y colangiocitos esenciales en el correcto funcionamiento del hígado y su regeneración (**Sahoo et al., 2022**). Los estudios en hígados animales tratados con DOX, señalan una formación de hiperplasia del conducto biliar, degeneración de cordones de hepatocitos, dilatación de sinusoides, entre otros (**Prasanna et al., 2020; Singh et al., 2023**). Según **Karim et al. (2023)**, un 30 y 40 % de los pacientes administrados con este fármaco, generan estrés oxidativo conduciendo a la hepatotoxicidad. DOX se puede unir a las guaninas del ADN, causando daño del mismo e inhibiendo la acción de la topoisomerasa II tanto en células cancerosas como células sanas (**van der Zanden et al., 2021**). De acuerdo con **Prasanna et al. (2020)**, la administración de este fármaco puede producir especies ROS (contribuyendo a daños en la membrana celular y el ADN), peroxidación lipídica y la activación de mecanismos apoptóticos en células sanas.

**Tabla 8.** Análisis de hepatotoxicidad, mutagenicidad y carcinogénicos de cada uno de los fármacos identificados.

Fármaco	Hepatotoxicidad	Mutagenicidad	Carcinogénico
DOR	Si	No	No
DOX	Si	Si	No
TSA	No	No	No
EST	No	No	Si

Se empleó las abreviaturas de estos fármacos como Dorsomorfina (DOR), Doxorubicina (DOX), Tricostatina A (TSA) y Estradiol (EST)

Con respecto a TSA, no presento ningún tipo de toxicidad, pero estos parámetros pueden cambiar dependiendo del tipo de matriz que se esté utilizando (**Bouyahya et al., 2022**). Se observó que EST únicamente presenta efectos carcinogénicos. Según **Pescatori et al. (2021)**, una exposición prolongada de EST induce a la formación de cáncer de mama, hígado y próstata. EST se une a las guaninas y adeninas del ADN, la eliminación de este complejo se da por un proceso denominado depuración, la cual causa sitios apurínicos en el ADN (**Cavalieri & Rogan, 2021**). La reparación de estos sitios genera alteraciones a nivel celular, resultando en la aparición de células malignas (**Thompson & Cortez, 2020**).

Las pruebas ADMET se realizaron por medio de pkCSM. La absorción de una molécula determina su bioviabilidad al ser administrado por vía oral o intravenosa (**Pradeep et al., 2021**). En la **Tabla 9**, se resume los resultados obtenidos del análisis de absorción de cada uno de los fármacos. De acuerdo con **Jankovic et al. (2019)**, los valores de solubilidad en agua se categorizan en: 0 a -1.50 como soluble, -1.50 a -3 (ligeramente soluble), -3 a -4 (muy poco soluble) y  $> -4$  son prácticamente insolubles. Como se observa en la tabla, DOR, TSA y EST son poco solubles, mientras que DOX es ligeramente soluble. La permeabilidad de Caco-2 indica la posibilidad de que la molécula pueda pasar por la barrera epitelial intestinal (IEB), indicando lo eficiente que es una molécula para ser administración por vial oral o intravenosa; los valores de  $\log P_{app} > 0.90$  indican una alta permeabilidad (**Ahmed et al., 2020**). Los valores de permeabilidad de Caco-2 para DOR, TSA y EST fueron superior a 1, indicando que posiblemente puedan ser usados para administración intravenosa u oral. Un porcentaje de absorción intestinal menor al 30 %, implica que el fármaco no es capaz de pasar por la IEB y ser absorbida en el torrente sanguíneo (**Huang et al., 2019**). No obstante, el porcentaje de cada uno de los fármacos es superior al 60 %, lo que señaló que los compuestos pueden pasar la IEB y ser absorbidos por el torrente sanguíneo para su distribución por todo el cuerpo.

**Tabla 9.** Análisis de absorción (A) de cada uno de los fármacos

Propiedades	Fármacos			
	DOX	DOR	TSA	EST
Solubilidad en agua [log mol/L]	-2.92	-3.88	-3.95	-3.80
Permeabilidad Caco-2 [log Papp]	0.457	1.105	1.02	1.77
Absorción intestinal [%]	62.37	98.03	94.36	93.90
Sustrato de la glicoproteína P [Si/No]	Si	Si	Si	Si
Inhibidor de la glicoproteína I [Si/No]	No	Si	Si	No
Inhibidor de la glicoproteína II [Si/No]	No	Si	No	No

Todos los fármacos pueden ser sustratos de la glicoproteína P, pero solo DOR y TSA son inhibidores de la glicoproteína I y únicamente DOR es un inhibidor de la glicoproteína II. Según **Seelig (2020)**, la glicoproteína P (P-gp) está involucrada en la eliminación de sustancias tóxicas de las células. Pese a ello, su presencia afecta la biodisponibilidad, distribución y eficiencia de un fármaco, actuando como una barrera protectora (**Waghray & Zhang, 2018**). Los inhibidores de P-gp pueden aumentar la biodisponibilidad y absorción del fármaco; pero, su inhibición también afecta la eliminación de otros fármacos nocivos y la integridad de la BBB (**Lai et al., 2020**).

Los análisis de la distribución de los fármacos se presentan en la **Tabla 10**. El volumen de distribución en estado estacionario (VD<sub>ss</sub>) indica la capacidad del fármaco de distribuirse en los tejidos y órganos (VD<sub>ss</sub> > 0.45) o solo a nivel de plasma (VD<sub>ss</sub> < 0.15) (**Holt et al., 2019**). Los valores de VD<sub>ss</sub> de DOX, DOR y EST es mayor a 0.45, indicando que estos tienen una gran afinidad para unirse a tejidos y órganos específicos como el cerebro. Por otra parte, TSA presentó un valor menor a 0.15, reflejando que tiene una capacidad limitada para ser distribuido a través de los tejidos. La fracción no unida representa la cantidad del fármaco en su estado libre, capaz de unirse a los sitios activos de las proteínas plasmáticas (**Watanabe et al., 2018**). Los análisis mostraron que solo el 11 % TSA y EST se encuentran en su estado libre, mientras que DOX y DOR se encuentran por encima del 20 %.



**Tabla 10.** Análisis de distribución (D) de los fármacos identificados

Propiedades	Fármacos			
	DOX	DOR	TSA	EST
VDss [log L/kg]	1.65	1.24	-0.27	0.55
Fracción no unida [%]	22	26	11	11
Permeabilidad BBB [log BB]	-1.38	0.62	-0.34	-0.07
Permeabilidad CNS [log PS]	-4.31	-2.22	-2.65	-1.33

BB (Brain-Blood; cerebro-sangre), CNS (sistema nervioso central), PS (Permeabilidad de superficie)

La permeabilidad de la BBB permite evaluar si el fármaco puede superar la BBB e inducir su efecto en el cerebro (Fu et al., 2021). Un valor de  $\log BB < -1$  indica que se distribuirá en bajas proporciones en el cerebro, mientras que un  $\log BB > 0.3$  implica una distribución eficiente (Krátký et al., 2021). Como se observa DOX tiene una distribución casi nula en el cerebro. Mientras que TSA y EST su distribución es moderada. Con respecto a DOR, su distribución puede ser eficiente a través de BBB De acuerdo con Ciura et al. (2020), los valores de  $\log BB > -1$  demuestran que el fármaco se distribuye favorablemente a través del CNS. La permeabilidad del CNS muestra el potencial de que un fármaco puede ingresar al CNS por medio de los lípidos de la BBB (Kadry et al., 2020). Un valor  $\log PS > -2$ , implica un ingreso eficiente del fármaco en el CNS, mientras que un  $\log PS < -3$ , representa que la molécula no puede ingresar al CNS (Kumar et al., 2022). DOR y TSA tienen un valor entre -2 y -3, indicando que tienen una capacidad limitada de ingresar al CNS. DOX, no puede pasar la BB hacia el CNS. Finalmente, EST fue el único fármaco con un valor mayor a -2.

El citocromo P450 es una enzima importante en la eliminación de toxinas dentro del organismo (Lu et al., 2021). Una gran variedad de fármacos puede disminuir o aumentar su eficiencia debido a las isoformas del citocromo P450 (Zhao et al., 2021). En la **Tabla 11**, se muestran los resultados del metabolismo de las enzimas citocromo P450. DOX y TSA presentaron resultados negativos con respecto a los análisis, esto indica que estos fármacos no tienen una interacción directa en el metabolismo del organismo. A su vez implica que DOX y TSA no afectan al metabolismo de otros

medicamentos, generando interacciones medicamentosas negativas (Sychev et al., 2018). Por otra parte, EST y DOR se identificaron como sustratos para CYP3A6, resultando en que su metabolismo sea acelerado o ralentizado dependiendo de la actividad de la enzima (Rowland & Yost, 2018). La inhibición de CYP1A2, CYP2C19 y CYP3A4 puede influir de forma negativa en el metabolismo de otros fármacos, causando una acumulación de estos en el organismo y por ende un aumento de efectos secundarios (Yim et al., 2020).

**Tabla 11.** Resultados de los análisis metabólicos (M) de los fármacos

Propiedades	Fármacos			
	DOX	DOR	TSA	EST
Sustrato de CYP2D6 [Si/No]	No	No	No	No
Sustrato de CYP3A4 [Si/No]	No	Si	No	Si
Inhibidor de CYP1A2 [Si/No]	No	Si	No	Si
Inhibidor de CYP2C19 [Si/No]	No	No	No	Si
Inhibidor de CYP2C9 [Si/No]	No	No	No	No
Inhibidor de CYP2D6 [Si/No]	No	No	No	No
Inhibidor de CYP3A4 [Si/No]	No	Si	No	No

CYP2D6, CYP3A4, CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, isoformas del citocromo P450

Las propiedades de excreción se presentan en la **Tabla 12**, donde se observó que el aclaramiento total de todos los fármacos es superior a 0.70. De acuerdo con **Iwata et al. (2022)**, valores de aclaramiento total mayores a 0.70, indican una eliminación rápida del organismo y que se necesita una dosificación constante para mantener las propiedades terapéuticas. Además, se evidenció que los fármacos no son sustratos renales OCT2. Este último es un transportador de moléculas en el cerebro, riñones e hígado (**Hao, 2019**). Al no ser sustratos, su eliminación no se realiza por los riñones, así que la dosificación debe ser controlada (**Van Ness & Kelly, 2018**).

**Tabla 12.** Análisis de excreción (E) por medio de la plataforma pKcsm

Propiedades	Fármacos			
	DOX	DOR	TSA	EST
Aclaramiento Total [log mL/min/kg]	0.99	0.72	0.73	0.78
Sustrato Renal OCT2 [Si/No]	No	No	No	No

Como último punto de las pruebas ADMET, están los análisis de toxicidad, los cuales se resumen en la **Tabla 13**. Se determinó que ninguno de los fármacos puede generar mutagenicidad (toxicidad AMES), sensibilidad cutánea y no son inhibidores de hERG I. Mientras que DOX, DOR y EST si son inhibidores de hERG II. Según **Garrido et al. (2020)**, la implicación clínica de los inhibidores hERG I y II depende de la dosificación, el dinamismo del fármaco y el tiempo de exposición, ya que pueden generar una arritmia ventricular aguda. DOX y DOR generan hepatotoxicidad, es decir que son deletéreos para el hígado. La toxicidad por *T. pyriformis* sirve para determinar la toxicidad de un compuesto; un valor mayor a -0.5, indica **toxicidad (Üstüntanır & Arslanyolu, 2021)**. En base a esto, se identificó que todos los fármacos pueden generar toxicidad. Sin embargo, los resultados presentados solo son predicciones del mecanismo de acción de los fármacos, estos pueden variar cuando ingresan al organismo (**Lee et al., 2019**).

**Tabla 13.** Resultados de los análisis de toxicidad (T)

Propiedades	Fármacos			
	DOX	DOR	TSA	EST
Toxicidad AMES [Si/No]	No	No	No	No
Dosis máxima tolerable [log mg/Kg/d]	0.08	-0.05	0.89	-0.68
Inhibidor de hERG I [Si/No]	No	No	No	No
Inhibidor de hERG II [Si/No]	Si	Si	No	Si
Hepatotoxicidad [Si/No]	Si	Si	No	No
Sensibilización cutánea [Si/No]	No	No	No	No
Toxicidad por <i>Tetrahymena pyriformis</i> [log µg/L]	0.29	0.29	1.91	1.16

Se realizó una búsqueda de los compuestos en Swisbioisoestere y Pharmit. Sin embargo, no se encontró estructuras homologas de los fármacos. Posiblemente se debería realizar un estudio exhaustivo de cada uno de los grupos funcionales que componen en sí al fármaco y de esa manera diseñar nuevas variantes estructurales de los mismo (**Batool et al., 2019**). Con la finalidad de construir una quimioteca de posibles compuestos para tratar la enfermedad.

Adicionalmente a la información presentada de los análisis ADMET. DOX es un fármaco anticancerígeno mayormente usado en quimioterapias contra el cáncer de mama (**Malky et al., 2019**). Aunque los estudios muestran que es un compuesto eficiente contra este tipo de cáncer, su uso es limitado debido a que induce cardiotoxicidad (**Argenziano et al., 2020**). Sumado a esto, se ha evidenciado que DOX puede generar disrupciones en la BBB y la elevación de citoquinas proinflamatorias (**Jeena et al., 2021**). **Ramalingayya et al. (2023)** reportó que DOX causaba alteraciones estructurales y el ingreso de factores inflamatorios a través de BBB (generando neuro inflamación) en el córtex cerebral de ratones. La neuro inflamación afecta directamente al mecanismo de defensa antioxidante del cerebro, su disfunción causa deterioro de la plasticidad sináptica, convergiendo en una disfunción cognitiva (**Chen et al., 2022**). DOR puede generar un daño en la memoria de largo plazo al inhibir la ruta metabólica de las MAPK (proteína cinasa activada por monofosfato de adenosina) (**Rashtiani et al., 2021**). Según lo reportado por **Jafaripour et al. (2022)**, los ratones administrados con DOR presentaron comportamientos de ansiedad y un deterioro en las habilidades cognitivas, debido una inhibición de MAPK en el hipocampo.

El estudio realizado en ratones demostró que TSA reduce la formación de plaquetas  $A\beta$  y solubiliza los oligómeros  $A\beta$  ( $oA\beta$ ) (**Su et al., 2021; Wu et al., 2018**). Los estudios en neuroblastomas tratados con TSA y TSA- $H_2O_2$  indicaron una reducción de la actividad autofágica, estrés oxidativo y daño celular inducida por  $A\beta$  (**Li et al., 2020**). Sin embargo, **Su et al. (2021)** menciona que los mecanismos implicados en el aclaramiento de  $A\beta$  por TSA aún siguen bajo investigación. EST es un estrógeno que

reduce la acumulación de factores proinflamatorios y la expresión del factor de necrosis alfa, disminuyendo la neurodegeneración en el hipocampo (**Farkas et al., 2022**). Se ha evidenciado que este tipo de estrógeno tiene efectos protectores para el sistema neurovascular (en caso de algún traumatismo), evitando la ruptura de la BBB (**Kurmann et al., 2021**). Según **Lejri et al. (2018)**, los estrógenos son esenciales en el metabolismo neuronal, debido a que regulan la transmisión sináptica y la neuroplasticidad. Además, la pérdida de estrógenos a nivel cerebral conlleva a la acumulación de plaquetas  $A\beta$  y formación de NFTs en ratones transgénicos (**Jett et al., 2022**). No obstante, se ha demostrado que la terapia a largo plazo con estrógenos tiene un efecto negativo en el cerebro, induciendo el desarrollo de AD en mujeres con postmenopausia (**Pourhadi et al., 2023**). Además, la exposición prolongada de estrógenos puede generar una desregulación celular, induciendo a la formación de células cancerígenas (contribuyendo al cáncer de mama) (**Mallick & Taylor, 2019**).

## CAPITULO IV

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 4.1 Conclusiones

- Se identificó 3 posibles dianas terapéuticas en el Alzheimer utilizando el pipeline bioinformático combinado. Los resultados obtenidos sugieren que, el análisis de expresión diferencial, enriquecimiento funcional, redes de interacción proteína-proteína, fármaco-proteína, acoplamiento molecular y evaluación de las propiedades farmacocinéticas, comprende un enfoque prometedor en la identificación de dianas terapéuticas y reutilización de fármacos candidatos para el tratamiento del Alzheimer.
- Se analizó un total de 507 y 478 genes que posiblemente estén involucrados con el Alzheimer a través del análisis de expresión diferencial. El análisis de enriquecimiento funcional indicó que la mayoría de los genes obtenidos están implicados en procesos que inducen neurodegeneración, desarrollo de plaquetas A $\beta$  y formación de NFTs.
- Se diseñó redes de interacción biológicas y se identificó a hsa-miR-34a-5p como un biomarcador para el diagnóstico temprano de Alzheimer. Utilizando las redes de interacción proteína-proteína se identificaron un total de 27 genes claves en el desarrollo de la enfermedad.
- Se seleccionó a CD44, CDK6 como posibles dianas terapéuticas de acuerdo con el análisis de supervivencia. Empleando el pipeline bioinformático se seleccionó de igual manera a CCND1 como otra posible diana terapéutica. Las redes de interacción fármaco-proteína identificó al Estradiol, Dorsomorfina, Doxorubicina y Tricostatina A como los fármacos que tiene una interacción directa con las dianas terapéuticas seleccionadas. El acoplamiento molecular demostró que Tricostatina A, Estradiol y Dorsomorfina pueden generar inhibición de las proteínas de interés.
- Se evaluó las propiedades farmacocinéticas de cada uno de los posibles ligandos, determinado que Doxorubicina y Dorsomorfina generan

hepatotoxicidad y posiblemente una disfunción cardíaca, además, pueden generar daño en la memoria de largo plazo. Por otra parte, Estradiol demostró generar efectos carcinogénicos y la evidencia apunta que su uso prolongado puede producir cáncer de mama. Finalmente, Tricostatina A no reveló ningún tipo de mutagenicidad, hepatotoxicidad o carcinogenicidad, por lo tanto, este fármaco puede ser usado como un posible tratamiento contra Alzheimer en humanos.

## 4.2 Recomendaciones

- Analizar un mayor número de datasets relacionados con la enfermedad para tener un mayor marco de estudio. Analizar datasets de diferentes años para conocer la progresión de la enfermedad con respecto al tiempo e identificar otras posibles dianas candidatas.
- Evaluar las redes de interacción proteína-proteína en String con diferentes coeficientes de red partiendo desde un nivel de confianza de 0.150 a 0.900, para poder comprender la cercanía biológica de cada gen.
- Validar los resultados de acoplamiento molecular utilizando puntuaciones de energía, desviaciones RMSD (Root Mean Square Desviation), capacidad de conformaciones cristalográficas, entre otras. Cabe recalcar que, para este tipo de análisis, el número de predicciones deben ser mayores a 1000.
- Verificar las propiedades farmacocinéticas de los fármacos utilizando otro tipo de software como SwissADMET o empleando modelos QSAR, con el objetivo de tener mayor evidencia para pasar a las pruebas in vitro.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, M., & El-Manzalawy, Y. (2020). Machine learning based refined differential gene expression analysis of pediatric sepsis. *BMC Medical Genomics*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/s12920-020-00771-4>
- Abdulhameed, H. (2022). Molecular docking analysis and dynamics simulation of salbutamol with the monoamine oxidase b (mao-b) enzyme. *Bioinformation*, 18(3), 304–309. <https://doi.org/10.6026/97320630018304>
- Ahmed, I., Leach, D. N., Wohlmuth, H., De Voss, J. J., & Blanchfield, J. T. (2020). Caco-2 cell permeability of flavonoids and saponins from gynostemma pentaphyllum: the immortal herb. *ACS Omega*, 5(34), 21561–21569. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c02180>
- Alcántara, R., Hernández, D. A., Medina, L. D. C., & García, J. A. (2022). G protein-coupled receptors as therapeutic target. *Gaceta Medica de Mexico*, 158(2), 101–107. <https://doi.org/10.24875/GMM.21000718>
- An, N., Bassil, K., Al Jowf, G. I., Steinbusch, H. W. M., Rothermel, M., de Nijs, L., & Rutten, B. P. F. (2021). Dual-specificity phosphatases in mental and neurological disorders. In *Progress in Neurobiology* (Vol. 198). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2020.101906>
- An, Y., Li, S., Huang, X., Chen, X., Shan, H., & Zhang, M. (2022). The role of copper homeostasis in brain disease. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 22). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms232213850>
- Argenziano, M., Gigliotti, C. L., Clemente, N., Boggio, E., Ferrara, B., Trotta, F., Pizzimenti, S., Barrera, G., Boldorini, R., Bessone, F., Dianzani, U., Cavalli, R., & Dianzani, C. (2020). Improvement in the anti-tumor efficacy of doxorubicin nanosponges in in vitro and in mice bearing breast tumor models. *Cancers*, 12(1). <https://doi.org/10.3390/cancers12010162>
- Athanasaki, A., Melanis, K., Tsantzali, I., Stefanou, M. I., Ntymenou, S., Paraskevas, S. G., Kalamatianos, T., Boutati, E., Lambadiari, V., Voumvourakis, K. I., Stranjalis, G., Giannopoulos, S., Tsvigoulis, G., & Paraskevas, G. P. (2022). Type 2 diabetes mellitus as a risk factor for alzheimer's disease: review and meta-analysis. In *Biomedicines* (Vol. 10, Issue 4). MDPI. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10040778>
- Baig, M. H., Yousuf, M., Khan, M. I., Khan, I., Ahmad, I., Alshahrani, M. Y., Hassan, M. I., & Dong, J. J. (2022). Investigating the mechanism of inhibition of cyclin-dependent kinase 6 inhibitory potential by selonsertib: newer insights into drug repurposing. *Frontiers in Oncology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.865454>
- Banerjee, P., Bhagavatula, S., Sood, A., Midha, V., Thelma, B. K., & Senapati, S. (2019). Association study identified biologically relevant receptor genes with



- synergistic functions in celiac disease. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50120-4>
- Batool, M., Ahmad, B., & Choi, S. (2019). A structure-based drug discovery paradigm. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 20, Issue 11). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms20112783>
- Behl, T., Kaur, D., Sehgal, A., Singh, S., Makeen, H. A., Albratty, M., Abdellatif, A. A. H., Dachani, S. R., & Bungau, S. (2022). Exploring the potential role of rab5 protein in endo-lysosomal impairment in alzheimer's disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 148, 112773. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.112773>
- Bellenguez, C., Küçükali, F., Jansen, I. E., Kleindam, L., Moreno-Grau, S., Amin, N., Naj, A. C., Campos-Martin, R., Grenier-Boley, B., Andrade, V., Holmans, P. A., Boland, A., Damotte, V., van der Lee, S. J., Costa, M. R., Kuulasmaa, T., Yang, Q., de Rojas, I., Bis, J. C., ... Lambert, J.-C. (2022). New insights into the genetic etiology of alzheimer's disease and related dementias. *Nature Genetics*, 54(4), 412–436. <https://doi.org/10.1038/s41588-022-01024-z>
- Bertheloot, D., Latz, E., & Franklin, B. S. (2021). Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death. In *Cellular and Molecular Immunology* (Vol. 18, Issue 5, pp. 1106–1121). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-00630-3>
- Biessels, G. J. (2022). Alzheimer's disease, cerebrovascular disease and dementia: lump, split or integrate? In *Brain* (Vol. 145, Issue 8, pp. 2632–2634). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/brain/awac228>
- Bittrich, S., Bhikadiya, C., Bi, C., Chao, H., Duarte, J. M., Dutta, S., Fayazi, M., Henry, J., Khokhriakov, I., Lowe, R., Piehl, D. W., Segura, J., Vallat, B., Voigt, M., Westbrook, J. D., Burley, S. K., & Rose, Y. (2023). RCSB protein data bank: efficient searching and simultaneous access to one million computed structure models alongside the pdb structures enabled by architectural advances. *Journal of Molecular Biology*, 435(14), 167994. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jmb.2023.167994>
- Bouyahya, A., El Omari, N., Bakha, M., Aanniz, T., El Menyiy, N., El Hachlafi, N., El Baaboua, A., El-Shazly, M., Alshahrani, M. M., Al Awadh, A. A., Lee, L.-H., Benali, T., & Mubarak, M. S. (2022). Pharmacological properties of trichostatin a, focusing on the anticancer potential: a comprehensive review. *Pharmaceuticals*, 15(10). <https://doi.org/10.3390/ph15101235>
- Brandebura, A. N., Paumier, A., Onur, T. S., & Allen, N. J. (2023). Astrocyte contribution to dysfunction, risk and progression in neurodegenerative disorders. *Nature Reviews Neuroscience*, 24(1), 23–39. <https://doi.org/10.1038/s41583-022-00641-1>

- Brockmann, M. M., Döngi, M., Einsfelder, U., Körber, N., Refojo, D., & Stein, V. (2019). Neddylation regulates excitatory synaptic transmission and plasticity. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54182-2>
- Brotzakis, Z. F., Lindstedt, P. R., Taylor, R. J., Rinauro, D. J., Gallagher, N. C. T., Bernardes, G. J. L., & Vendruscolo, M. (2021). A structural ensemble of a tau-microtubule complex reveals regulatory tau phosphorylation and acetylation mechanisms. *ACS Central Science*, 7(12), 1986–1995. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.1c00585>
- Brylinski, M. (2018). Aromatic interactions at the ligand–protein interface: implications for the development of docking scoring functions. *Chemical Biology and Drug Design*, 91(2), 380–390. <https://doi.org/10.1111/cbdd.13084>
- Bystrykh, L. (2021). Python for gene expression. *F1000Research*, 10. <https://doi.org/10.12688/f1000research.53842.1>
- Campos, V., Pichardo, P., Sánchez, T., Ortíz, E., Rodríguez, C. E., Montes, P., Ramos, G., Silva, D., Valencia, R., Cerna, J. F., & Toral, D. (2022). Amyloid  $\beta$ , lipid metabolism, basal cholinergic system, and therapeutics in alzheimer's disease. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 20). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms232012092>
- Canavan, M., & O'Donnell, M. J. (2022). Hypertension and cognitive impairment: a review of mechanisms and key concepts. *Frontiers in Neurology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fneur.2022.821135>
- Castilla-Guerra, L. (2022). Late-life hypertension as a risk factor for cognitive decline and dementia. In *Hypertension Research* (Vol. 45, Issue 10, pp. 1670–1671). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41440-022-00988-z>
- Cavalieri, E., & Rogan, E. (2021). The 3,4-quinones of estrone and estradiol are the initiators of cancer whereas resveratrol and n-acetylcysteine are the preventers. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 15). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms22158238>
- Chan, S. H., Chiang, J., & Ngeow, J. (2021). CDKN2A germline alterations and the relevance of genotype-phenotype associations in cancer predisposition. In *Hereditary Cancer in Clinical Practice* (Vol. 19, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13053-021-00178-x>
- Chatterjee, S., & Mudher, A. (2018a). Alzheimer's disease and type 2 diabetes: a critical assessment of the shared pathological traits. In *Frontiers in Neuroscience* (Vol. 12, Issue JUN). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00383>
- Chatterjee, S., & Mudher, A. (2018b). Alzheimer's disease and type 2 diabetes: a critical assessment of the shared pathological traits. In *Frontiers in Neuroscience* (Vol. 12, Issue JUN). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00383>

- Chen, B., Qin, G., Xiao, J., Deng, X., Lin, A., & Liu, H. (2022). Transient neuroinflammation following surgery contributes to long-lasting cognitive decline in elderly rats via dysfunction of synaptic nmda receptor. *Journal of Neuroinflammation*, *19*(1). <https://doi.org/10.1186/s12974-022-02528-5>
- Chen, C., Zhao, S., Karnad, A., & Freeman, J. W. (2018). The biology and role of cd44 in cancer progression: therapeutic implications. In *Journal of Hematology and Oncology* (Vol. 11, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13045-018-0605-5>
- Chen, P., Lee, N. V., Hu, W., Xu, M., Ferre, R. A., Lam, H., Bergqvist, S., Solowiej, J., Diehl, W., He, Y. A., Yu, X., Nagata, A., Vanarsdale, T., & Murray, B. W. (2016). Spectrum and degree of cdk drug interactions predicts clinical performance. *Molecular Cancer Therapeutics*, *15*(10), 2273–2281. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-16-0300>
- Chen, Z. R., Huang, J. B., Yang, S. L., & Hong, F. F. (2022). Role of cholinergic signaling in alzheimer's disease. In *Molecules* (Vol. 27, Issue 6). MDPI. <https://doi.org/10.3390/molecules27061816>
- Ciura, K., Ulenberg, S., Kapica, H., Kawczak, P., Belka, M., & Bączek, T. (2020). Assessment of blood–brain barrier permeability using micellar electrokinetic chromatography and p<sub>vsa</sub>-like descriptors. *Microchemical Journal*, *158*, 105236. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105236>
- Clark, J. S., Kayed, R., Abate, G., Uberti, D., Kinnon, P., & Piccirella, S. (2022). Post-translational modifications of the p53 protein and the impact in alzheimer's disease: a review of the literature. In *Frontiers in Aging Neuroscience* (Vol. 14). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.835288>
- Clark, K., Leung, Y. Y., Lee, W. P., Voight, B., & Wang, L. S. (2022). Polygenic risk scores in alzheimer's disease genetics: methodology, applications, inclusion, and diversity. In *Journal of Alzheimer's Disease* (Vol. 89, Issue 1, pp. 1–12). IOS Press BV. <https://doi.org/10.3233/JAD-220025>
- Colangelo, C., Shichkova, P., Keller, D., Markram, H., & Ramaswamy, S. (2019). Cellular, synaptic and network effects of acetylcholine in the neocortex. In *Frontiers in Neural Circuits* (Vol. 13). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fncir.2019.00024>
- Confettura, A. D., Cuboni, E., Ammar, M. R., Jia, S., Gomes, G. M., Yuanxiang, P. A., Raman, R., Li, T., Grochowska, K. M., Ahrends, R., Karpova, A., Dityatev, A., & Kreutz, M. R. (2022). Neddylation-dependent protein degradation is a nexus between synaptic insulin resistance, neuroinflammation and alzheimer's disease. *Translational Neurodegeneration*, *11*(1). <https://doi.org/10.1186/s40035-021-00277-8>
- Coupé, P., Manjón, J. V., Lanuza, E., & Catheline, G. (2019). Lifespan changes of the human brain in alzheimer's disease. *Scientific Reports*, *9*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39809-8>

- Cummings, J. L., Tong, G., & Ballard, C. (2019). Treatment combinations for alzheimer's disease: current and future pharmacotherapy options. In *Journal of Alzheimer's Disease* (Vol. 67, Issue 3, pp. 779–794). IOS Press. <https://doi.org/10.3233/JAD-180766>
- Cuozzo, A., Daina, A., Perez, M. A. S., Michielin, O., & Zoete, V. (2022). SwissBioisostere 2021: updated structural, bioactivity and physicochemical data delivered by a reshaped web interface. *Nucleic Acids Research*, *50*(D1), D1382–D1390. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1047>
- Desta, I. T., Porter, K. A., Xia, B., Kozakov, D., & Vajda, S. (2020). Performance and its limits in rigid body protein-protein docking. *Structure*, *28*(9), 1071–1081.e3. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.str.2020.06.006>
- Dhasmana, A., Uniyal, S., Anukriti, Kashyap, V. K., Somvanshi, P., Gupta, M., Bhardwaj, U., Jaggi, M., Yallapu, M. M., Haque, S., & Chauhan, S. C. (2020). Topological and system-level protein interaction network (pin) analyses to deduce molecular mechanism of curcumin. *Scientific Reports*, *10*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69011-0>
- Dietrich, P., Alli, S., Mulligan, M. K., Cox, R., Ashbrook, D. G., Williams, R. W., & Dragatsis, I. (2022). Identification of cyclin d1 as a major modulator of 3-nitropropionic acid-induced striatal neurodegeneration. *Neurobiology of Disease*, *162*, 105581. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.nbd.2021.105581>
- Dnyandev, K. M., Babasaheb, G. V., Chandrashekhar, K. V., Chandrakant, M. A., & Vasant, O. K. (2021). A review on molecular docking. *International Research Journal of Pure and Applied Chemistry*, *60*–68. <https://doi.org/10.9734/irjpac/2021/v22i330396>
- Doncheva, N. T., Morris, J. H., Gorodkin, J., & Jensen, L. J. (2019). Cytoscape stringapp: network analysis and visualization of proteomics data. *Journal of Proteome Research*, *18*(2), 623–632. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.8b00702>
- Dong, J., Wang, N. N., Yao, Z. J., Zhang, L., Cheng, Y., Ouyang, D., Lu, A. P., & Cao, D. S. (2018). Admetlab: a platform for systematic admet evaluation based on a comprehensively collected admet database. *Journal of Cheminformatics*, *10*(1). <https://doi.org/10.1186/s13321-018-0283-x>
- Dorigatti, A. O., Riordan, R., Yu, Z., Ross, G., Wang, R., Reynolds-Lallement, N., Magnusson, K., Galvan, V., & Perez, V. I. (2022). Brain cellular senescence in mouse models of alzheimer's disease. *GeroScience*, *44*(2), 1157–1168. <https://doi.org/10.1007/s11357-022-00531-5>
- Doroszkiewicz, J., Groblewska, M., & Mroczko, B. (2022). Molecular biomarkers and their implications for the early diagnosis of selected neurodegenerative diseases. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 9). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms23094610>

- Du, S., & Zheng, H. (2021). Role of foxo transcription factors in aging and age-related metabolic and neurodegenerative diseases. In *Cell and Bioscience* (Vol. 11, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13578-021-00700-7>
- Eberhardt, J., Santos-Martins, D., Tillack, A. F., & Forli, S. (2021). AutoDock vina 1.2.0: new docking methods, expanded force field, and python bindings. *Journal of Chemical Information and Modeling*, *61*(8), 3891–3898. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.1c00203>
- Eglit, G. M. L., Weigand, A. J., Nation, D. A., Bondi, M. W., & Bangen, K. J. (2020). Hypertension and alzheimer’s disease: indirect effects through circle of willis atherosclerosis. *Brain Communications*, *2*(2). <https://doi.org/10.1093/braincomms/fcaa114>
- Fan, L., Meng, H., Guo, X., Li, X., & Meng, F. (2018). Differential gene expression profiles in peripheral blood in northeast chinese han people with acute myocardial infarction. *Genetics and Molecular Biology*, *41*(1), 59–66. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2017-0075>
- Farkas, S., Szabó, A., Hegyi, A. E., Török, B., Fazekas, C. L., Ernszt, D., Kovács, T., & Zelena, D. (2022). Estradiol and estrogen-like alternative therapies in use: the importance of the selective and non-classical actions. In *Biomedicines* (Vol. 10, Issue 4). MDPI. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10040861>
- Farmer, K. M., Ghag, G., Puangmalai, N., Montalbano, M., Bhatt, N., & Kayed, R. (2020). P53 aggregation, interactions with tau, and impaired dna damage response in alzheimer’s disease. *Acta Neuropathologica Communications*, *8*(1). <https://doi.org/10.1186/s40478-020-01012-6>
- Ferrante, C., Chiavaroli, A., Angelini, P., Venanzoni, R., Flores, G. A., Brunetti, L., Petrucci, M., Politi, M., Menghini, L., Leone, S., Recinella, L., Zengin, G., Ak, G., Di Mascio, M., Bacchin, F., & Orlando, G. (2020). Phenolic content and antimicrobial and anti-inflammatory effects of solidago virga-aurea, phyllanthus niruri, epilobium angustifolium, peumus boldus, and ononis spinosa extracts. *Antibiotics*, *9*(11), 1–21. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9110783>
- Ferrer, I., Andrés-Benito, P., Ausín, K., Pamplona, R., del Rio, J. A., Fernández-Irigoyen, J., & Santamaría, E. (2021). Dysregulated protein phosphorylation: a determining condition in the continuum of brain aging and alzheimer’s disease. *Brain Pathology*, *31*(6). <https://doi.org/10.1111/bpa.12996>
- Findley, C. A., Bartke, A., Hascup, K. N., & Hascup, E. R. (2019). Amyloid beta-related alterations to glutamate signaling dynamics during alzheimer’s disease progression. *ASN Neuro*, *11*, 1759091419855541. <https://doi.org/10.1177/1759091419855541>
- Fionda, V. (2019). Networks in biology. In S. Ranganathan, M. Gribskov, K. Nakai, & C. Schönbach (Eds.), *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology* (pp. 915–921). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20420-2>

- Folch, J., Busquets, O., Ettcheto, M., Sánchez-López, E., Castro-Torres, R. D., Verdaguer, E., Garcia, M. L., Olloquequi, J., Casadesús, G., Beas-Zarate, C., Pelegri, C., Vilaplana, J., Auladell, C., & Camins, A. (2018). Memantine for the treatment of dementia: a review on its current and future applications. In *Journal of Alzheimer's Disease* (Vol. 62, Issue 3, pp. 1223–1240). IOS Press. <https://doi.org/10.3233/JAD-170672>
- Fu, B. M., Zhao, Z., & Zhu, D. (2021). Blood-brain barrier (bbb) permeability and transport measurement in vitro and in vivo. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 2367, pp. 105–122). Humana Press Inc. [https://doi.org/10.1007/7651\\_2020\\_308](https://doi.org/10.1007/7651_2020_308)
- Fu, Y., Zhao, J., & Chen, Z. (2018). Insights into the molecular mechanisms of protein-ligand interactions by molecular docking and molecular dynamics simulation: a case of oligopeptide binding protein. *Computational and Mathematical Methods in Medicine, 2018*. <https://doi.org/10.1155/2018/3502514>
- Gabin, J. M., Tambs, K., Saltvedt, I., Sund, E., & Holmen, J. (2017). Association between blood pressure and alzheimer disease measured up to 27 years prior to diagnosis: the hunt study. *Alzheimer's Research and Therapy, 9*(1). <https://doi.org/10.1186/s13195-017-0262-x>
- Galletti, C., Bota, P. M., Oliva, B., & Fernandez-Fuentes, N. (2021). Mining drug-target and drug-adverse drug reaction databases to identify target-adverse drug reaction relationships. *Database, 2021*. <https://doi.org/10.1093/database/baab068>
- García, A., Dong, J., Moreno-Aliaga, M. J., & Ramirez, M. J. (2022). P27, the cell cycle and alzheimer's disease. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 3). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms23031211>
- Garrido, A., Lepailleur, A., Mignani, S. M., Dallemagne, P., & Rochais, C. (2020). *hERG toxicity assessment: useful guidelines for drug design*.
- Gauthier, S., Alam, J., Fillit, H., Iwatsubo, T., Liu-Seifert, H., Sabbagh, M., Salloway, S., Sampaio, C., Sims, J. R., Sperling, B., Sperling, R., Welsh-Bohmer, K. A., Touchon, J., Vellas, B., & Aisen, P. (2019). Combination therapy for alzheimer's disease: perspectives of the eu/us ctad task force. *The Journal of Prevention of Alzheimer's Disease, 6*(3), 164–168. <https://doi.org/10.14283/jpad.2019.12>
- Ge, B. K., Hu, G. M., Chen, R., & Chen, C. M. (2022). MSclustering: a cytoscape tool for multi-level clustering of biological networks. *International Journal of Molecular Sciences, 23*(22). <https://doi.org/10.3390/ijms232214240>
- Ge, X., Chen, Y. E., Song, D., McDermott, M. L., Woysner, K., Manousopoulou, A., Wang, N., Li, W., Wang, L. D., & Li, J. J. (2021). Clipper: p-value-free fdr control on high-throughput data from two conditions. *Genome Biology, 22*(1). <https://doi.org/10.1186/s13059-021-02506-9>
- Giurgiu, M., Reinhard, J., Brauner, B., Dunger-Kaltenbach, I., Fobo, G., Frishman, G., Montrone, C., & Ruepp, A. (2019). CORUM: the comprehensive resource of

- mammalian protein complexes - 2019. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D559–D563. <https://doi.org/10.1093/nar/gky973>
- Gong, M. T., Li, W. X., Zhang, Q., Lv, W. W., He, Z. H., Zhou, S. L., Zhang, H., Wang, J., & He, K. (2018). Comprehensive analysis of gene expression profiles associated with proliferative diabetic retinopathy. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 16(4), 3539–3545. <https://doi.org/10.3892/etm.2018.6635>
- Govindarajulu, M., Ramesh, S., Shankar, T., Kora, M. K., Moore, T., & Dhanasekaran, M. (2022). Role of neddylation in neurodegenerative diseases. *NeuroSci*, 3(4), 533–545. <https://doi.org/10.3390/neurosci3040038>
- Grimm, M. O. W., Blümel, T., Lauer, A. A., Janitschke, D., Stahlmann, C., Mett, J., Hauptenthal, V. J., Miederer, A. M., Niemeyer, B. A., Grimm, H. S., & Hartmann, T. (2020). The impact of capsaicinoids on app processing in alzheimer’s disease in sh-sy5y cells. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66009-6>
- Guevara, L. (2022). *Estudios bioinformáticos para la identificación de posibles dianas terapéuticas en la enfermedad de la Diabetes Mellitus tipo 2 (T2DM)*. Universidad Técnica de Ambato.
- Gui, T., Yao, C., Jia, B., & Shen, K. (2021). Identification and analysis of genes associated with epithelial ovarian cancer by integrated bioinformatics methods. *PLoS ONE*, 16(6 June). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0253136>
- Guo, J., Wang, Z., Liu, R., Huang, Y., Zhang, N., & Zhang, R. (2020). Memantine, donepezil, or combination therapy—what is the best therapy for alzheimer’s disease? a network meta-analysis. In *Brain and Behavior* (Vol. 10, Issue 11). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/brb3.1831>
- Guo, T., Zhang, D., Zeng, Y., Huang, T. Y., Xu, H., & Zhao, Y. (2020). Molecular and cellular mechanisms underlying the pathogenesis of alzheimer’s disease. In *Molecular Neurodegeneration* (Vol. 15, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13024-020-00391-7>
- Gupta, P., Narayanan, S., & Yang, D.-H. (2019). CDK inhibitors as sensitizing agents for cancer chemotherapy. In *Protein Kinase Inhibitors as Sensitizing Agents for Chemotherapy* (pp. 125–149). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-816435-8.00009-2>
- Hampel, H., Hardy, J., Blennow, K., Chen, C., Perry, G., Kim, S. H., Villemagne, V. L., Aisen, P., Vendruscolo, M., Iwatsubo, T., Masters, C. L., Cho, M., Lannfelt, L., Cummings, J. L., & Vergallo, A. (2021). The amyloid- $\beta$  pathway in alzheimer’s disease. In *Molecular Psychiatry* (Vol. 26, Issue 10, pp. 5481–5503). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41380-021-01249-0>
- Hao, D.-C. (2019). Chapter 4 - drug metabolism and pharmacokinetic diversity of ranunculaceae medicinal compounds. In D.-C. Hao (Ed.), *Ranunculales*

*Medicinal Plants* (pp. 125–173). Academic Press.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814232-5.00004-6>

- Hassan, H., & Chen, R. (2021). Hypoxia in alzheimer's disease: effects of hypoxia inducible factors. In *Neural Regeneration Research* (Vol. 16, Issue 2, pp. 310–311). Wolters Kluwer Medknow Publications. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.290898>
- Hassin, O., & Oren, M. (2023). Drugging p53 in cancer: one protein, many targets. In *Nature Reviews Drug Discovery* (Vol. 22, Issue 2, pp. 127–144). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41573-022-00571-8>
- Haure-Mirande, J. V., Audrain, M., Ehrlich, M. E., & Gandy, S. (2022). Microglial tyrobp/dap12 in alzheimer's disease: transduction of physiological and pathological signals across trem2. In *Molecular Neurodegeneration* (Vol. 17, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13024-022-00552-w>
- He, X., Zhu, A., Feng, J., & Wang, X. (2022). Role of neddylation in neurological development and diseases. In *Biotechnology and Applied Biochemistry* (Vol. 69, Issue 1, pp. 330–341). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/bab.2112>
- He, X.-Y., Wu, B.-S., Kuo, K., Zhang, W., Ma, Q., Xiang, S.-T., Li, Y.-Z., Wang, Z., Dong, Q., Feng, J.-F., Cheng, W., & Yu, J.-T. (2023). Association between polygenic risk for alzheimer's disease and brain structure in children and adults. *Alzheimer's Research & Therapy*, 15(1), 109. <https://doi.org/10.1186/s13195-023-01256-z>
- He, Z., Ferguson, S. A., Patterson, T. A., & Paule, M. G. (2018). Chapter 3 - neurite development and neurotoxicity. In W. Slikker, M. G. Paule, & C. Wang (Eds.), *Handbook of Developmental Neurotoxicology (Second Edition)* (pp. 23–32). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809405-1.00003-1>
- Heitmeier, M. R., Hresko, R. C., Edwards, R. L., Prinsen, M. J., Ilagan, M. X. G., Odom John, A. R., & Hruz, P. W. (2019). Identification of druggable small molecule antagonists of the plasmodium falciparum hexose transporter pfht and assessment of ligand access to the glucose permeation pathway via flag-mediated protein engineering. *PLOS ONE*, 14(5), e0216457. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216457>
- Hoffman, G. E., & Roussos, P. (2021). Dream: powerful differential expression analysis for repeated measures designs. *Bioinformatics*, 37(2), 192–201. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btaa687>
- Holmes, A. J., & Patrick, L. M. (2018). The myth of optimality in clinical neuroscience. In *Trends in Cognitive Sciences* (Vol. 22, Issue 3, pp. 241–257). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2017.12.006>



- Holt, K., Nagar, S., & Korzekwa, K. (2019). Methods to predict volume of distribution. In *Current Pharmacology Reports* (Vol. 5, Issue 5, pp. 391–399). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/s40495-019-00186-5>
- Huang, S., Sun, C., Hou, Y., Tang, Y., Zhu, Z., Zhang, Z., Zhang, Y., Wang, L., Zhao, Q., Chen, M. G., Guo, Z., Wang, D., Ju, W., Zhou, Q., Wu, L., & He, X. (2018). A comprehensive bioinformatics analysis on multiple gene expression omnibus datasets of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25658-4>
- Huang, Y., Deng, S., Luo, X., Liu, Y., Xu, W., Pan, J., Wang, M., & Xia, Z. (2019). Evaluation of intestinal absorption mechanism and pharmacokinetics of curcumin-loaded galactosylated albumin nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 14, 9721–9730. <https://doi.org/10.2147/IJN.S229992>
- Huang, Y., Li, X., Luo, G., Wang, J., Li, R., Zhou, C., Wan, T., & Yang, F. (2022). Pyroptosis as a candidate therapeutic target for alzheimer's disease. In *Frontiers in Aging Neuroscience* (Vol. 14). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.996646>
- Hunt, G. P., Grassi, L., Henkin, R., Smeraldi, F., Spargo, T. P., Kabiljo, R., Koks, S., Ibrahim, Z., Dobson, R. J. B., Al-Chalabi, A., Barnes, M. R., & Iacoangeli, A. (2022). GEOexplorer: a webserver for gene expression analysis and visualisation. *Nucleic Acids Research*, 50(W1), W367–W374. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac364>
- Ibrahim, M. T., Uzairu, A., Shallangwa, G. A., & Uba, S. (2021). MOLECULAR docking investigation and pharmacokinetic properties prediction of some anilinopyrimidines analogues as egfr t790m tyrosine kinase inhibitors. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*, 8(1), 203–213. <https://doi.org/10.1080/2314808X.2021.1946650>
- Iourov, I. Y., Yurov, Y. B., Vorsanova, S. G., & Kutsev, S. I. (2021). Chromosome instability, aging and brain diseases. *Cells*, 10(5). <https://doi.org/10.3390/cells10051256>
- Iqbal, N., & Kumar, P. (2022). Integrated covid-19 predictor: differential expression analysis to reveal potential biomarkers and prediction of coronavirus using rna-seq profile data. *Computers in Biology and Medicine*, 147. <https://doi.org/10.1016/j.combiomed.2022.105684>
- Iwata, H., Matsuo, T., Mamada, H., Motomura, T., Matsushita, M., Fujiwara, T., Maeda, K., & Handa, K. (2022). Predicting total drug clearance and volumes of distribution using the machine learning-mediated multimodal method through the imputation of various nonclinical data. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 62(17), 4057–4065. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.2c00318>
- Jafaripour, L., Esmailpour, K., Maneshian, M., Bashiri, H., Rajizadeh, M. A., Ahmadvand, H., & Asadi-Shekaari, M. (2022). The effect of gallic acid on memory and anxiety-like behaviors in rats with bile duct ligation-induced hepatic

encephalopathy: role of ampk pathway. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 12(4), 425–438. <https://doi.org/10.22038/AJP.2022.19720>

- Jankovic, S., Tsakiridou, G., Ditzinger, F., Koehl, N. J., Price, D. J., Ilie, A. R., Kalantzi, L., Kimpe, K., Holm, R., Nair, A., Griffin, B., Saal, C., & Kuentz, M. (2019). Application of the solubility parameter concept to assist with oral delivery of poorly water-soluble drugs – a pearll review. In *Journal of Pharmacy and Pharmacology* (Vol. 71, Issue 4, pp. 441–463). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/jphp.12948>
- Jash, K., Gondaliya, P., Kirave, P., Kulkarni, B., Sunkaria, A., & Kalia, K. (2020). Cognitive dysfunction: a growing link between diabetes and alzheimer’s disease. In *Drug Development Research* (Vol. 81, Issue 2, pp. 144–164). Wiley-Liss Inc. <https://doi.org/10.1002/ddr.21579>
- Jeena, J., Manas, K., Mudgal, J., Viswanatha, G. L., & Nandakumar, K. (2021). Animal models of chemotherapy-induced cognitive decline in preclinical drug development. In *Psychopharmacology* (Vol. 238, Issue 11, pp. 3025–3053). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s00213-021-05977-7>
- Jett, S., Malviya, N., Schelbaum, E., Jang, G., Jahan, E., Clancy, K., Hristov, H., Pahlajani, S., Niotis, K., Loeb-Zeitlin, S., Havryliuk, Y., Isaacson, R., Brinton, R. D., & Mosconi, L. (2022). Endogenous and exogenous estrogen exposures: how women’s reproductive health can drive brain aging and inform alzheimer’s prevention. In *Frontiers in Aging Neuroscience* (Vol. 14). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.831807>
- Johnson, R. J., Gomez-Pinilla, F., Nagel, M., Nakagawa, T., Rodriguez-Iturbe, B., Sanchez-Lozada, L. G., Tolan, D. R., & Lanaspa, M. A. (2020). Cerebral fructose metabolism as a potential mechanism driving alzheimer’s disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 12. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2020.560865>
- Jordan, K. L., Koss, D. J., Outeiro, T. F., & Giorgini, F. (2022). Therapeutic targeting of rab gtpases: relevance for alzheimer’s disease. In *Biomedicines* (Vol. 10, Issue 5). MDPI. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10051141>
- Kadry, H., Noorani, B., & Cucullo, L. (2020). A blood–brain barrier overview on structure, function, impairment, and biomarkers of integrity. *Fluids and Barriers of the CNS*, 17(1), 69. <https://doi.org/10.1186/s12987-020-00230-3>
- Kakati, T., Bhattacharyya, D. K., Barah, P., & Kalita, J. K. (2019). Comparison of methods for differential co-expression analysis for disease biomarker prediction. *Computers in Biology and Medicine*, 113, 103380. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.compbio.2019.103380>
- Kanehisa, M., Furumichi, M., Tanabe, M., Sato, Y., & Morishima, K. (2017). KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic Acids Research*, 45(D1), D353–D361. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1092>

- Karim, S., Al-Maghrabi, J. A., Farsi, H. M. A., Al-Sayyad, A. J., Schulten, H. J., Buhmeida, A., Mirza, Z., Al-boogmi, A. A., Ashgan, F. T., Shabaad, M. M., NourEldin, H. F., Al-Ghamdi, K. B. M., Abuzenadah, A., Chaudhary, A. G. A., & Al-Qahtani, M. H. (2016). Cyclin d1 as a therapeutic target of renal cell carcinoma- a combined transcriptomics, tissue microarray and molecular docking study from the kingdom of saudi arabia. *BMC Cancer*, *16*. <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2775-2>
- Karim, S., Madani, B., Burzangi, A. S., Alsieni, M., Bazuhair, M. A., Jamal, M., Daghistani, H., Barasheed, M. O., Alkreathy, H., Khan, M. A., & Khan, L. M. (2023). Urolithin a's antioxidative, anti-inflammatory, and antiapoptotic activities mitigate doxorubicin-induced liver injury in wistar rats. *Biomedicines*, *11*(4). <https://doi.org/10.3390/biomedicines11041125>
- Kfoury, N., Sun, T., Yu, K., Rockwell, N., Tinkum, K. L., Qi, Z., Warrington, N. M., McDonald, P., Roy, A., Weir, S. J., Mohila, C. A., Deneen, B., & Rubin, J. B. (2018). Cooperative p16 and p21 action protects female astrocytes from transformation. *Acta Neuropathologica Communications*, *6*(1), 12. <https://doi.org/10.1186/s40478-018-0513-5>
- Khan, M. M., Mohsen, M. T., Malik, M. Z., Bagabir, S. A., Alkhanani, M. F., Haque, S., Serajuddin, M., & Bharadwaj, M. (2022). Identification of potential key genes in prostate cancer with gene expression, pivotal pathways and regulatory networks analysis using integrated bioinformatics methods. *Genes*, *13*(4). <https://doi.org/10.3390/genes13040655>
- Kim, S., Kwon, M., Hwang, Y., Yoon, J., Park, S., & Kang, H. C. (2021). Stress-induced neddylation promotes cytosolic protein aggregation through hdac6 in a p62-dependent manner. *IScience*, *24*(3). <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102146>
- Kiral, F. R., Kohrs, F. E., Jin, E. J., & Hiesinger, P. R. (2018). Rab gtpases and membrane trafficking in neurodegeneration. In *Current Biology* (Vol. 28, Issue 8, pp. R471–R486). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.02.010>
- Klimaschewski, L., & Claus, P. (2021). Fibroblast growth factor signalling in the diseased nervous system. *Molecular Neurobiology*, *58*(8), 3884–3902. <https://doi.org/10.1007/s12035-021-02367-0>
- Klyucherev, T. O., Olszewski, P., Shalimova, A. A., Chubarev, V. N., Tarasov, V. V., Attwood, M. M., Syvänen, S., & Schiöth, H. B. (2022). Advances in the development of new biomarkers for alzheimer's disease. In *Translational Neurodegeneration* (Vol. 11, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s40035-022-00296-z>
- Kozlova, I., Sah, S., Keable, R., Leshchyn'ska, I., Janitz, M., & Sytnyk, V. (2020). Cell adhesion molecules and protein synthesis regulation in neurons. In *Frontiers in Molecular Neuroscience* (Vol. 13). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2020.592126>

- Krátký, M., Svrčková, K., Vu, Q. A., Štěpánková, Š., & Vinšová, J. (2021). Hydrazones of 4-(trifluoromethyl)benzohydrazide as new inhibitors of acetyl- and butyrylcholinesterase. *Molecules*, 26(4). <https://doi.org/10.3390/molecules26040989>
- Kumar, R., & Haider, S. (2022). Protein network analysis to prioritize key genes in amyotrophic lateral sclerosis. *IBRO Neuroscience Reports*, 12, 25–44. <https://doi.org/10.1016/j.ibneur.2021.12.002>
- Kumar, R., Sharma, A., Alexiou, A., Bilgrami, A. L., Kamal, M. A., & Ashraf, G. M. (2022). DeePred-bbb: a blood brain barrier permeability prediction model with improved accuracy. *Frontiers in Neuroscience*, 16. <https://doi.org/10.3389/fnins.2022.858126>
- Kuo, C. C., Chiang, A. W. T., Baghdassarian, H. M., & Lewis, N. E. (2021). Dysregulation of the secretory pathway connects alzheimer's disease genetics to aggregate formation. *Cell Systems*, 12(9), 873-884.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2021.06.001>
- Kurmann, L., Okoniewski, M., & Dubey, R. K. (2021). Estradiol inhibits human brain vascular pericyte migration activity: a functional and transcriptomic analysis. *Cells*, 10(9). <https://doi.org/10.3390/cells10092314>
- Lagua, C. (2022). *Búsqueda de posibles dianas terapéuticas para el cáncer papilar de tiroideas (PTC)*. Universidad Técnica de Ambato .
- Lai, J. I., Tseng, Y. J., Chen, M. H., Huang, C. Y. F., & Chang, P. M. H. (2020). Clinical perspective of fda approved drugs with p-glycoprotein inhibition activities for potential cancer therapeutics. In *Frontiers in Oncology* (Vol. 10). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.561936>
- Lamarre, S., Frasse, P., Zouine, M., Labourdette, D., Sainderichin, E., Hu, G., Le Berre-Anton, V., Bouzayen, M., & Maza, E. (2018). Optimization of an rna-seq differential gene expression analysis depending on biological replicate number and library size. *Frontiers in Plant Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00108>
- Lao, P. J., Gutierrez, J., Keator, D., Rizvi, B., Banerjee, A., Igwe, K. C., Laing, K. K., Sathishkumar, M., Moni, F., Andrews, H., Krinsky-McHale, S., Head, E., Lee, J. H., Lai, F., Yassa, M. A., Rosas, H. D., Silverman, W., Lott, I. T., Schupf, N., & Brickman, A. M. (2020). Alzheimer-related cerebrovascular disease in down syndrome. *Annals of Neurology*, 88(6), 1165–1177. <https://doi.org/10.1002/ana.25905>
- Lawson, A. R. J., Abascal, F., Coorens, T. H. H., Hooks, Y., O'Neill, L., Latimer, C., Raine, K., Sanders, M. A., Warren, A. Y., Mahbubani, K. T. A., Bareham, B., Butler, T. M., Harvey, L. M. R., Cagan, A., Menzies, A., Moore, L., Colquhoun, A. J., Turner, W., Thomas, B., ... Martincorena, I. (2020). Extensive heterogeneity in somatic mutation and selection in the human bladder. *Science*, 370(6512), 75–82. <https://doi.org/10.1126/science.aba8347>

- Lee, K. S. S., Yang, J., Niu, J., Ng, C. J., Wagner, K. M., Dong, H., Kodani, S. D., Wan, D., Morisseau, C., & Hammock, B. D. (2019). Drug-target residence time affects in vivo target occupancy through multiple pathways. *ACS Central Science*, 5(9), 1614–1624. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.9b00770>
- Lehrer, S., & Rheinstein, P. (2019). Alzheimer's disease susceptibility genes in low-grade glioma. *Glioma*, 2(2), 116. [https://doi.org/10.4103/glioma.glioma\\_9\\_19](https://doi.org/10.4103/glioma.glioma_9_19)
- Lejri, I., Grimm, A., & Eckert, A. (2018). Mitochondria, estrogen and female brain aging. In *Frontiers in Aging Neuroscience* (Vol. 10, Issue APR). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00124>
- Li, C. Y., Cai, J. H., Tsai, J. J. P., & Wang, C. C. N. (2020). Identification of hub genes associated with development of head and neck squamous cell carcinoma by integrated bioinformatics analysis. *Frontiers in Oncology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00681>
- Li, D., Zhang, Y. H., Zhang, W., & Zhao, P. (2019). Meta-analysis of randomized controlled trials on the efficacy and safety of donepezil, galantamine, rivastigmine, and memantine for the treatment of alzheimer's disease. *Frontiers in Neuroscience*, 13(MAY). <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00472>
- Li, H., Huang, E., Zhang, Y., Huang, S.-Y., & Xiao, Y. (2022). HDOCK update for modeling protein-rna/dna complex structures. *Protein Science*, 31(11), e4441. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/pro.4441>
- Li, L. H., Peng, W. N., Deng, Y., Li, J. J., & Tian, X. R. (2020). Action of trichostatin a on alzheimer's disease-like pathological changes in sh-sy5y neuroblastoma cells. *Neural Regeneration Research*, 15(2), 293–301. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.265564>
- Li, Y., Ge, X., Peng, F., Li, W., & Li, J. J. (2022). Exaggerated false positives by popular differential expression methods when analyzing human population samples. *Genome Biology*, 23(1). <https://doi.org/10.1186/s13059-022-02648-4>
- Li, Z., Zou, W., Zhang, J., Zhang, Y., Xu, Q., Li, S., & Chen, C. (2020). Mechanisms of cdk4/6 inhibitor resistance in luminal breast cancer. In *Frontiers in Pharmacology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.580251>
- Licursi, V., Conte, F., Fiscon, G., & Paci, P. (2019). MIENTURNET: an interactive web tool for microrna-target enrichment and network-based analysis. *BMC Bioinformatics*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12859-019-3105-x>
- Linnartz-Gerlach, B., Bodea, L. G., Klaus, C., Ginolhac, A., Halder, R., Sinkkonen, L., Walter, J., Colonna, M., & Neumann, H. (2019). TREM2 triggers microglial density and age-related neuronal loss. *GLIA*, 67(3), 539–550. <https://doi.org/10.1002/glia.23563>

- Liu, F., Zhang, Z., Zhang, L., Meng, R. N., Gao, J., Jin, M., Li, M., & Wang, X. P. (2022). Effect of metal ions on alzheimer's disease. In *Brain and Behavior* (Vol. 12, Issue 3). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/brb3.2527>
- Liu, J. L., Fan, Y. G., Yang, Z. S., Wang, Z. Y., & Guo, C. (2018). Iron and alzheimer's disease: from pathogenesis to therapeutic implications. In *Frontiers in Neuroscience* (Vol. 12, Issue SEP). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00632>
- Liu, R. M. (2022). Aging, cellular senescence, and alzheimer's disease. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 4). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms23041989>
- López, I. (2021). : *Estudios bioinformáticos para la identificación de posibles dianas terapéuticas en la enfermedad de Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA)*. Universidad Técnica de Ambato.
- Lu, C. H., Wei, S. T., Liu, J. J., Chang, Y. J., Lin, Y. F., Yu, C. S., & Chang, S. L. Y. (2022). Recognition of a novel gene signature for human glioblastoma. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(8). <https://doi.org/10.3390/ijms23084157>
- Lu, K., Song, Y., & Zeng, R. (2021). The role of cytochrome p450-mediated detoxification in insect adaptation to xenobiotics. *Current Opinion in Insect Science*, 43, 103–107. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cois.2020.11.004>
- Lu, L., Townsend, K. A., & Daigle, B. J. (2021). GEOlimma: differential expression analysis and feature selection using pre-existing microarray data. *BMC Bioinformatics*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/s12859-020-03932-5>
- Luo, L., Wang, Q., & Liao, Y. (2022). The inhibitors of cdk4/6 from a library of marine compound database: a pharmacophore, admet, molecular docking and molecular dynamics study. *Marine Drugs*, 20(5). <https://doi.org/10.3390/md20050319>
- Ma, H., He, Z., Chen, J., Zhang, X., & Song, P. (2021). Identifying of biomarkers associated with gastric cancer based on 11 topological analysis methods of cytohubba. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79235-9>
- Ma, M., Liao, Y., Huang, X., Zou, C., Chen, L., Liang, L., Meng, Y., Wu, Y., & Zou, D. (2022). Identification of alzheimer's disease molecular subtypes based on parallel large-scale sequencing. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 14. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.770136>
- Maghsoudi, Z., Nguyen, H., Tavakkoli, A., & Nguyen, T. (2022). A comprehensive survey of the approaches for pathway analysis using multi-omics data integration. In *Briefings in bioinformatics* (Vol. 23, Issue 6). NLM (Medline). <https://doi.org/10.1093/bib/bbac435>
- Malik, F. K., & Guo, J. tao. (2022). Insights into protein–dna interactions from hydrogen bond energy-based comparative protein–ligand analyses. *Proteins*:

*Structure, Function and Bioinformatics*, 90(6), 1303–1314.  
<https://doi.org/10.1002/prot.26313>

- Malky, H. S., Osman, A. M. M., Damanhoury, Z. A., Alkreathy, H. M., Al Aama, J. Y., Ramadan, W. S., Al Qahtani, A. A., & Al Mahdi, H. B. (2019). Modulation of doxorubicin-induced expression of the multidrug resistance gene in breast cancer cells by diltiazem and protection against cardiotoxicity in experimental animals. *Cancer Cell International*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12935-019-0912-0>
- Mallick, A., & Taylor, S. (2019). Therapeutic potential of estradiol in treating breast cancer. *Breast Cancer Management*, 8(2), BMT27. <https://doi.org/10.2217/bmt-2019-0013>
- Marei, H. E., Althani, A., Afifi, N., Hasan, A., Caceci, T., Pozzoli, G., Morrione, A., Giordano, A., & Cenciarelli, C. (2021). P53 signaling in cancer progression and therapy. In *Cancer Cell International* (Vol. 21, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12935-021-02396-8>
- Martínez-Hernández, J., Parato, J., Sharma, A., Soleilhac, J. M., Qu, X., Tein, E., Sproul, A., Andrieux, A., Goldberg, Y., Moutin, M. J., Bartolini, F., & Peris, L. (2022). Crosstalk between acetylation and the tyrosination/detyrosination cycle of  $\alpha$ -tubulin in alzheimer's disease. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.926914>
- Marwa, A., Yasser, O., Mohamed, S., & Mabrouk, M. S. (2022). Discovering epistasis interactions in alzheimer's disease using deep learning model. *Gene Reports*, 29, 101673. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.genrep.2022.101673>
- Meng, J. X., Zhang, Y., Saman, D., Haider, A. M., De, S., Sang, J. C., Brown, K., Jiang, K., Humphrey, J., Julian, L., Hidari, E., Lee, S. F., Balmus, G., Floto, R. A., Bryant, C. E., Benesch, J. L. P., Ye, Y., & Klenerman, D. (2022). Hyperphosphorylated tau self-assembles into amorphous aggregates eliciting tlr4-dependent responses. *Nature Communications*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-022-30461-x>
- Miao, J., Shi, R., Li, L., Chen, F., Zhou, Y., Tung, Y. C., Hu, W., Gong, C. X., Iqbal, K., & Liu, F. (2019). Pathological tau from alzheimer's brain induces site-specific hyperphosphorylation and sds- and reducing agent-resistant aggregation of tau in vivo. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 11. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2019.00034>
- Michel, M., Visnes, T., Homan, E. J., Seashore-Ludlow, B., Hedenström, M., Wiita, E., Vallin, K., Paulin, C. B. J., Zhang, J., Wallner, O., Scobie, M., Schmidt, A., Jenmalm-Jensen, A., Warpman Berglund, U., & Helleday, T. (2019). Computational and experimental druggability assessment of human dna glycosylases. *ACS Omega*, 4(7), 11642–11656. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b00162>
- Modarres, P., Mohamadi Farsani, F., Nekouie, A. A., & Vallian, S. (2021). Meta-analysis of gene signatures and key pathways indicates suppression of jnk

- pathway as a regulator of chemo-resistance in aml. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91864-2>
- Mokgautsi, N., Wang, Y. C., Lawal, B., Khedkar, H., Sumitra, M. R., Wu, A. T. H., & Huang, H. S. (2021). Network pharmacological analysis through a bioinformatics approach of novel nsc765600 and nsc765691 compounds as potential inhibitors of ccnd1/cdk4/plk1/cd44 in cancer types. *Cancers*, 13(11). <https://doi.org/10.3390/cancers13112523>
- Morelli, G., Even, A., Gladwyn-Ng, I., Le Bail, R., Shilian, M., Godin, J. D., Peyre, E., Hassan, B. A., Besson, A., Rigo, J. M., Weil, M., Brône, B., & Nguyen, L. (2018). P27Kip1 modulates axonal transport by regulating  $\alpha$ -tubulin acetyltransferase 1 stability. *Cell Reports*, 23(8), 2429–2442. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.04.083>
- Moreno, M., Perez, S. E., Nadeem, M., Malek-Ahmadi, M., & Mufson, E. J. (2020). Frontal cortex chitinase and pentraxin neuroinflammatory alterations during the progression of alzheimer's disease. *Journal of Neuroinflammation*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12974-020-1723-x>
- Moreno-Gonzalez, I., Morales, R., Baglietto-Vargas, D., & Sanchez-Varo, R. (2020). Editorial: risk factors for alzheimer's disease. In *Frontiers in Aging Neuroscience* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2020.00124>
- Muddapu, V. R., Dharshini, S. A. P., Chakravarthy, V. S., & Gromiha, M. M. (2020). Neurodegenerative diseases – is metabolic deficiency the root cause? In *Frontiers in Neuroscience* (Vol. 14). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00213>
- Mullan, K. A., Bramberger, L. M., Munday, P. R., Goncalves, G., Revote, J., Mifsud, N. A., Illing, P. T., Anderson, A., Kwan, P., Purcell, A. W., & Li, C. (2021). GgVolcanoR: a shiny app for customizable visualization of differential expression datasets. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 19, 5735–5740. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.10.020>
- Nagar, S. D., Pemu, P., Qian, J., Boerwinkle, E., Cicek, M., Clark, C. R., Cohn, E., Gebo, K., Loperena, R., Mayo, K., Mockrin, S., Ohno-Machado, L., Ramirez, A. H., Schully, S., Able, A., Green, A., Zuchner, S., Pemu, P. E., Quarshie, A., ... Meller, R. (2022). Investigation of hypertension and type 2 diabetes as risk factors for dementia in the all of us cohort. *Scientific Reports*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-23353-z>
- Ngoc, T., Pham, H., Nguyen, T. H., Tam, N. M., Vu, T. Y., Pham, N. T., Huy, N. T., Mai, B. K., Tung, N. T., Pham, M. Q., Vu, V. V., Ngo, S. T., Pham, T. N. H., Vu, T. Y., Huy, N. T., Tam, N. T., Pham, N. T., Mai, B. K., & Vu, V. V. (2021). *Improving Ligand-Ranking of AutoDock Vina by Changing the Empirical Parameters* (Vol. 11355). <https://github.com/sontungngo/mvina>.
- Nichols, E., Steinmetz, J. D., Vollset, S. E., Fukutaki, K., Chalek, J., Abd-Allah, F., Abdoli, A., Abualhasan, A., Abu-Gharbieh, E., Akram, T. T., Al Hamad, H.,



- Alahdab, F., Alanezi, F. M., Alipour, V., Almustanyir, S., Amu, H., Ansari, I., Arabloo, J., Ashraf, T., ... Vos, T. (2022). Estimation of the global prevalence of dementia in 2019 and forecasted prevalence in 2050: an analysis for the global burden of disease study 2019. *The Lancet Public Health*, 7(2), e105–e125. [https://doi.org/10.1016/S2468-2667\(21\)00249-8](https://doi.org/10.1016/S2468-2667(21)00249-8)
- Nielsen, H., & Wennström. (2012). Cell adhesion molecules in alzheimer's disease. *Degenerative Neurological and Neuromuscular Disease*, 65. <https://doi.org/10.2147/dnnd.s19829>
- Novikova, G., Kapoor, M., Tcw, J., Abud, E. M., Efthymiou, A. G., Chen, S. X., Cheng, H., Fullard, J. F., Bendl, J., Liu, Y., Roussos, P., Björkegren, J. L., Liu, Y., Poon, W. W., Hao, K., Marcora, E., & Goate, A. M. (2021). Integration of alzheimer's disease genetics and myeloid genomics identifies disease risk regulatory elements and genes. *Nature Communications*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21823-y>
- Nudin, A., Ellmi, A., Petalcorin, M. I. R., Lu, Z. H., & Shafqat, N. (2018). Comparative proteomic analysis. In *Reference Module in Life Sciences*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809633-8.20449-4>
- Owoloye, A. J., Ligali, F. C., Enejoh, O. A., Musa, A. Z., Aina, O., Idowu, E. T., & Oyebola, K. M. (2022). Molecular docking, simulation and binding free energy analysis of small molecules as pf ht1 inhibitors. *PLoS ONE*, 17(8 July). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0268269>
- Pan, T., Chen, Y., Zhuang, Y., Yang, F., Xu, Y., Tao, J., You, K., Wang, N., Wu, Y., Lin, X., Wu, F., Liu, Y., Li, Y., Wang, G., & Li, Y. xiong. (2019). Synergistic modulation of signaling pathways to expand and maintain the bipotency of human hepatoblasts. *Stem Cell Research and Therapy*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1463-y>
- Panitch, R., Hu, J., Xia, W., Bennett, D. A., Stein, T. D., Farrer, L. A., & Jun, G. R. (2022). Blood and brain transcriptome analysis reveals apoe genotype-mediated and immune-related pathways involved in alzheimer disease. *Alzheimer's Research and Therapy*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s13195-022-00975-z>
- Pantsar, T., & Poso, A. (2018). Binding affinity via docking: fact and fiction. In *Molecules* (Vol. 23, Issue 8, p. 1DUMMY). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules23081899>
- Patel, S., Waghela, B., Shah, K., Vaidya, F., Mirza, S., Patel, S., Pathak, C., & Rawal, R. (2018). Silibinin, a natural blend in polytherapy formulation for targeting cd44v6 expressing colon cancer stem cells. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35069-0>
- Pedraza, N., Monserrat, M. V., Ferrezuelo, F., Torres-Rosell, J., Colomina, N., Soto, D., Miguez-Cabello, F., Esteban, J. A., Egea, J., & Gar\`i, E. (2022). Cyclin d1·cdk4 regulates neuronal activity through phosphorylation of gabaa receptors. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2022.06.30.498219>

- Pedretti, A., Mazzolari, A., Gervasoni, S., Fumagalli, L., & Vistoli, G. (2021). The vega suite of programs: an versatile platform for cheminformatics and drug design projects. *Bioinformatics*, 37(8), 1174–1175. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btaa774>
- Pellegrini, M. (2019). Community detection in biological networks. In S. Ranganathan, M. Gribskov, K. Nakai, & C. Schönbach (Eds.), *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology* (pp. 978–987). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20428-7>
- Perveen, A., Nephew, B., & Liu, Y. (2022). *Global, regional, and national burden of Alzheimer's disease and other dementias, 1990–2019*. <http://ghdx>.
- Pescatori, S., Berardinelli, F., Albanesi, J., Ascenzi, P., Marino, M., Antoccia, A., Di Masi, A., & Acconcia, F. (2021). A tale of ice and fire: the dual role for 17 $\beta$ -estradiol in balancing dna damage and genome integrity. *Cancers*, 13(7). <https://doi.org/10.3390/cancers13071583>
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Meng, E. C., Couch, G. S., Croll, T. I., Morris, J. H., & Ferrin, T. E. (2021). UCSF chimeraX: structure visualization for researchers, educators, and developers. *Protein Science*, 30(1), 70–82. <https://doi.org/10.1002/pro.3943>
- Pfrieger, F. W. (2021). Neurodegenerative diseases and cholesterol: seeing the field through the players. In *Frontiers in Aging Neuroscience* (Vol. 13). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.766587>
- Piccirella, S., Van Neste, L., Fowler, C., Masters, C. L., Fripp, J., Doecke, J. D., Xiong, C., Uberti, D., & Kinnon, P. (2022). A conformational variant of p53 (u-p53az) as blood-based biomarker for the prediction of the onset of symptomatic alzheimer's disease. *Journal of Prevention of Alzheimer's Disease*, 9(3), 469–479. <https://doi.org/10.14283/jpad.2022.52>
- Pistis, G., Vázquez-Bourgon, J., Fournier, M., Jenni, R., Cleusix, M., Papiol, S., Smart, S. E., Pardiñas, A. F., Walters, J. T. R., MacCabe, J. H., Kutalik, Z., Conus, P., Crespo-Facorro, B., & Q Do, K. (2022). Gene set enrichment analysis of pathophysiological pathways highlights oxidative stress in psychosis. *Molecular Psychiatry*, 27(12), 5135–5143. <https://doi.org/10.1038/s41380-022-01779-1>
- Porter, T. M., & Hajibabaei, M. (2022). MetaWorks: a flexible, scalable bioinformatic pipeline for high-throughput multi-marker biodiversity assessments. *PLoS ONE*, 17(9 September). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0274260>
- Pourhadi, N., Mørch, L. S., Holm, E. A., Torp-Pedersen, C., & Meaidi, A. (2023). Menopausal hormone therapy and dementia: nationwide, nested case-control study. *BMJ*, e072770. <https://doi.org/10.1136/bmj-2022-072770>
- Pradeep, S., Jain, A. S., Dharmashekara, C., Prasad, S. K., Akshatha, N., Pruthvish, R., Amachawadi, R. G., Srinivasa, C., Syed, A., Elgorban, A. M., Al Kheraif, A. A., Ortega-Castro, J., Frau, J., Flores-Holguín, N., Shivamallu, C., Kollur, S. P., &

- Glossman-Mitnik, D. (2021). Synthesis, computational pharmacokinetics report, conceptual dft-based calculations and anti-acetylcholinesterase activity of hydroxyapatite nanoparticles derived from acorus calamus plant extract. *Frontiers in Chemistry*, 9. <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.741037>
- Prasanna, P. L., Renu, K., & Valsala Gopalakrishnan, A. (2020). New molecular and biochemical insights of doxorubicin-induced hepatotoxicity. In *Life Sciences* (Vol. 250). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117599>
- Puls, K., Olivé-Marti, A. L., Pach, S., Pinter, B., Erli, F., Wolber, G., & Spetea, M. (2022). In vitro, in vivo and in silico characterization of a novel kappa-opioid receptor antagonist. *Pharmaceuticals*, 15(6). <https://doi.org/10.3390/ph15060680>
- Rahimi, H., Hosseini, S., Chamani, J., Sinichi, M., Mohammad Bonakdar, A., Azad, Z., Ahangari, N., & Reza Rahimi, H. (2019). The effect of nanomicelle curcumin, sorafenib, and combination of the two on the cyclin d1 gene expression of the hepatocellular carcinoma cell line (huh7). In *Iran J Basic Med Sci* (Vol. 22).
- Rahman, M. A., Rahman, M. S., Rahman, M. H., Rasheduzzaman, M., Mamun-Or-rashid, A. N. M., Uddin, M. J., Rahman, M. R., Hwang, H., Pang, M. G., & Rhim, H. (2021). Modulatory effects of autophagy on app processing as a potential treatment target for alzheimer's disease. In *Biomedicines* (Vol. 9, Issue 1, pp. 1–20). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9010005>
- Ramalingayya, G. V., John, J., Gourishetti, K., Nayak, P. G., Rao, C. M., Kishore, A., Alnasser, S. M., Hussain, S. M., & Krishnadas, N. (2023). Amelioration of doxorubicin-induced cognitive impairment by quercetin in a rat model of breast cancer. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 33(1), 153–163. <https://doi.org/10.1007/s43450-022-00341-y>
- Ramy, A., Mrad, Y., Hammoud, H., Saker, Z., Fares, Y., Estephan, E., Bahmad, H. F., Harati, H., & Nabha, S. (2022). New insights into the role of fibroblast growth factors in alzheimer's disease. *Molecular Biology Reports*, 49(2), 1413–1427. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06890-0>
- Ranaudo, A., Cosentino, U., Greco, C., Moro, G., Bonardi, A., Maiocchi, A., & Moroni, E. (2022). Evaluation of docking procedures reliability in affitins-partners interactions. *Frontiers in Chemistry*, 10. <https://doi.org/10.3389/fchem.2022.1074249>
- Rashtiani, S., Goudarzi, I., Jafari, A., & Rohampour, K. (2021). Adenosine monophosphate activated protein kinase (ampk) is essential for the memory improving effect of adiponectin. *Neuroscience Letters*, 749, 135721. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.neulet.2021.135721>
- Ren, Y., Ay, A., & Kahveci, T. (2018). Shortest path counting in probabilistic biological networks. *BMC Bioinformatics*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12859-018-2480-z>

- Rivera, F., Pinney, J. J., Owlett, L., Ahmed, H., Thakar, J., Olschowka, J. A., Elliott, M. R., & O'Banion, M. K. (2019). IL-1 $\beta$ -driven amyloid plaque clearance is associated with an expansion of transcriptionally reprogrammed microglia. *Journal of Neuroinflammation*, *16*(1). <https://doi.org/10.1186/s12974-019-1645-7>
- Rowland, A. M., & Yost, G. S. (2018). Selected pneumotoxic agents. In C. A. McQueen (Ed.), *Comprehensive Toxicology (Third Edition)* (pp. 194–227). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.64193-4>
- Roy, S., Coldren, C., Karunamurthy, A., Kip, N. S., Klee, E. W., Lincoln, S. E., Leon, A., Pullambhatla, M., Temple-Smolkin, R. L., Voelkerding, K. V, Wang, C., & Carter, A. B. (2018). Standards and guidelines for validating next-generation sequencing bioinformatics pipelines: a joint recommendation of the association for molecular pathology and the college of american pathologists. *The Journal of Molecular Diagnostics*, *20*(1), 4–27. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2017.11.003>
- Ruiz, A. J., Reyes Atilio, Dömling, A., & Velasco-Velázquez, M. A. (2021). In silico design and selection of new tetrahydroisoquinoline-based cd44 antagonist candidates. *Molecules*, *26*(7). <https://doi.org/10.3390/molecules26071877>
- Saez-Atienzar, S., & Masliah, E. (2020). Cellular senescence and alzheimer disease: the egg and the chicken scenario. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 21, Issue 8, pp. 433–444). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41583-020-0325-z>
- Safwan-Zaiter, H., Wagner, N., & Wagner, K. D. (2022). P16INK4A—more than a senescence marker. In *Life* (Vol. 12, Issue 9). MDPI. <https://doi.org/10.3390/life12091332>
- Sagulkoo, P., Chuntakaruk, H., Rungrotmongkol, T., Suratane, A., & Plaimas, K. (2022). Multi-level biological network analysis and drug repurposing based on leukocyte transcriptomics in severe covid-19: in silico systems biology to precision medicine. *Journal of Personalized Medicine*, *12*(7). <https://doi.org/10.3390/jpm12071030>
- Sahoo, B. M., Ravi Kumar, B. V. V., Sruti, J., Mahapatra, M. K., Banik, B. K., & Borah, P. (2021). Drug repurposing strategy (drs): emerging approach to identify potential therapeutics for treatment of novel coronavirus infection. In *Frontiers in Molecular Biosciences* (Vol. 8). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.628144>
- Sahoo, S., Mishra, A., Diehl, A. M., & Jolly, M. K. (2022). Dynamics of hepatocyte-cholangiocyte cell-fate decisions during liver development and regeneration. *IScience*, *25*(9). <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.104955>
- Sáiz-Vazquez, O., Puente-Martínez, A., Ubillos-Landa, S., Pacheco-Bonrostro, J., & Santabárbara, J. (2020). Cholesterol and alzheimer's disease risk: a meta-meta-analysis. In *Brain Sciences* (Vol. 10, Issue 6, pp. 1–13). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/brainsci10060386>

- Salmaso, V., & Moro, S. (2018). Bridging molecular docking to molecular dynamics in exploring ligand-protein recognition process: an overview. In *Frontiers in Pharmacology* (Vol. 9, Issue AUG). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00923>
- Santo, E. E., & Paik, J. (2018). FOXO in neural cells and diseases of the nervous system. In *Current Topics in Developmental Biology* (Vol. 127, pp. 105–118). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2017.10.002>
- Sastre, A. A., Montoro, M. L., Gálvez-Martín, P., Lacerda, H. M., Lucia, A., Llaveró, F., & Zugaza, J. L. (2020). Small gtpases of the ras and rho families switch on/off signaling pathways in neurodegenerative diseases. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 17, pp. 1–23). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms21176312>
- Schöning-Stierand, K., Diedrich, K., Fährrolfes, R., Flachsenberg, F., Meyder, A., Nittinger, E., Steinegger, R., & Rarey, M. (2020). ProteinsPlus: interactive analysis of protein–ligand binding interfaces. *Nucleic Acids Research*, 48(W1), W48–W53. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAA235>
- Sedzikowska, A., Szablewski, L., Rostagno, A. A., Baranowska-Bik, A., & Orzechowski, A. (2021). Molecular sciences insulin and insulin resistance in alzheimer’s disease. *Int. J. Mol. Sci*, 22, 9987. <https://doi.org/10.3390/ijms>
- Seelig, A. (2020). P-glycoprotein: one mechanism, many tasks and the consequences for pharmacotherapy of cancers. In *Frontiers in Oncology* (Vol. 10). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.576559>
- Senior, T., Botha, M. J., Kennedy, A. R., & Calvo-Castro, J. (2020). Understanding the contribution of individual amino acid residues in the binding of psychoactive substances to monoamine transporters. *ACS Omega*, 5(28), 17223–17231. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c01370>
- Shao, C., Bittrich, S., Wang, S., & Burley, S. K. (2022). Assessing pdb macromolecular crystal structure confidence at the individual amino acid residue level. *Structure*, 30(10), 1385-1394.e3. <https://doi.org/10.1016/j.str.2022.08.004>
- Sharma, V. K., Singh, T. G., Singh, S., Garg, N., & Dhiman, S. (2021). Apoptotic pathways and alzheimer’s disease: probing therapeutic potential. In *Neurochemical Research* (Vol. 46, Issue 12, pp. 3103–3122). Springer. <https://doi.org/10.1007/s11064-021-03418-7>
- Shi, F., He, Y., Chen, Y., Yin, X., Sha, X., & Wang, Y. (2021). Comparative analysis of multiple neurodegenerative diseases based on advanced epigenetic aging brain. *Frontiers in Genetics*, 12. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.657636>
- Shi, M., Chai, Y., Zhang, J., & Chen, X. (2022). Endoplasmic reticulum stress-associated neuronal death and innate immune response in neurological diseases. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.794580>

- Shina, K., & Efrati, S. (2022). Ischemia as a common trigger for alzheimer's disease. *Frontiers in Aging Neuroscience, 14*. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.1012779>
- Siddappaji, K. K., & Gopal, S. (2021). Molecular mechanisms in alzheimer's disease and the impact of physical exercise with advancements in therapeutic approaches. *AIMS Neuroscience, 8*(3), 357–389. <https://doi.org/10.3934/Neuroscience.2021020>
- Singh, M., Kadhim, M. M., Turki Jalil, A., Oudah, S. K., Aminov, Z., Alsaikhan, F., Jawhar, Z. H., Ramírez-Coronel, A. A., & Farhood, B. (2023). A systematic review of the protective effects of silymarin/silibinin against doxorubicin-induced cardiotoxicity. In *Cancer Cell International* (Vol. 23, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12935-023-02936-4>
- Singla, A., Fedoseienko, A., Giridharan, S. S. P., Overlee, B. L., Lopez, A., Jia, D., Song, J., Huff-Hardy, K., Weisman, L., Burstein, E., & Billadeau, D. D. (2019). Endosomal pi(3)p regulation by the commd/ccdc22/ccdc93 (ccc) complex controls membrane protein recycling. *Nature Communications, 10*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12221-6>
- Sola, M., Magrin, C., Pedrioli, G., Pinton, S., Salvadè, A., Papin, S., & Paganetti, P. (2020). Tau affects p53 function and cell fate during the dna damage response. *Communications Biology, 3*(1). <https://doi.org/10.1038/s42003-020-0975-4>
- Squitti, R., Ventriglia, M., Simonelli, I., Bonvicini, C., Costa, A., Perini, G., Binetti, G., Benussi, L., Ghidoni, R., Koch, G., Borroni, B., Albanese, A., Sensi, S. L., & Rongioletti, M. (2021). Copper imbalance in alzheimer's disease: meta-analysis of serum, plasma, and brain specimens, and replication study evaluating atp7b gene variants. *Biomolecules, 11*(7). <https://doi.org/10.3390/biom11070960>
- Stanzione, F., Giangreco, I., & Cole, J. C. (2021). Chapter four - use of molecular docking computational tools in drug discovery. In D. R. Witty & B. Cox (Eds.), *Progress in Medicinal Chemistry* (Vol. 60, pp. 273–343). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/bs.pmch.2021.01.004>
- Stupnikov, A., McInerney, C. E., Savage, K. I., McIntosh, S. A., Emmert-Streib, F., Kennedy, R., Salto-Tellez, M., Prise, K. M., & McArt, D. G. (2021a). Robustness of differential gene expression analysis of rna-seq. *Computational and Structural Biotechnology Journal, 19*, 3470–3481. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.05.040>
- Stupnikov, A., McInerney, C. E., Savage, K. I., McIntosh, S. A., Emmert-Streib, F., Kennedy, R., Salto-Tellez, M., Prise, K. M., & McArt, D. G. (2021b). Robustness of differential gene expression analysis of rna-seq. *Computational and Structural Biotechnology Journal, 19*, 3470–3481. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.05.040>
- Su, Q., Li, T., He, P.-F., Lu, X.-C., Yu, Q., Gao, Q.-C., Wang, Z.-J., Wu, M.-N., Yang, D., & Qi, J.-S. (2021). Trichostatin ameliorates alzheimer's disease-related pathology and cognitive deficits by increasing albumin expression and a $\beta$

- clearance in app/ps1 mice. *Alzheimer's Research & Therapy*, 13(1), 7. <https://doi.org/10.1186/s13195-020-00746-8>
- Suarez, O. J., Vega, C. J., Sanchez, E. N., González-Santiago, A. E., Rodríguez-Jorge, O., Alanis, A. Y., Chen, G., & Hernandez-Vargas, E. A. (2020). Pinning control for the p53-mdm2 network dynamics regulated by p14arf. *Frontiers in Physiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00976>
- Sun, D., Gao, W., Hu, H., & Zhou, S. (2022). Why 90% of clinical drug development fails and how to improve it? In *Acta Pharmaceutica Sinica B* (Vol. 12, Issue 7, pp. 3049–3062). Chinese Academy of Medical Sciences. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2022.02.002>
- Sun, D., Ren, X., Ari, E., Korcsmaros, T., Csermely, P., & Wu, L. Y. (2019). Discovering cooperative biomarkers for heterogeneous complex disease diagnoses. *Briefings in Bioinformatics*, 20(1), 89–101. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx090>
- Suravajhala, R., Parashar, A., Choudhir, G., Kumar, A., Malik, B., Nagaraj, V. A., Padmanaban, G., Polavarapu, R., Suravajhala, P., & Kishor, P. B. K. (2021). Molecular docking and dynamics studies of curcumin with covid-19 proteins. *Network Modeling Analysis in Health Informatics and Bioinformatics*, 10(1). <https://doi.org/10.1007/s13721-021-00312-8>
- Susanti, N. M. P., Damayanti, S., Kartasasmita, R. E., & Tjahjono, D. H. (2021). A search for cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitors by pharmacophore-based virtual screening, molecular docking, and molecular dynamic simulations. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(24). <https://doi.org/10.3390/ijms222413423>
- Sychev, D. A., Ashraf, G. M., Svistunov, A. A., Maksimov, M. L., Tarasov, V. V., Chubarev, V. N., Otdelenov, V. A., Denisenko, N. P., Barreto, G. E., & Aliev, G. (2018). The cytochrome p450 isoenzyme and some new opportunities for the prediction of negative drug interaction in vivo. In *Drug Design, Development and Therapy* (Vol. 12, pp. 1147–1156). Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S149069>
- Talma, N., Gerrits, E., Wang, B., Eggen, B. J. L., & Demaria, M. (2021). Identification of distinct and age-dependent p16high microglia subtypes. *Aging Cell*, 20(10). <https://doi.org/10.1111/accel.13450>
- Tang, S., Chen, R., Lin, M., Lin, Q., Zhu, Y., Ding, J., Hu, H., Ling, M., & Wu, J. (2022). Accelerating autodock vina with gpus. *Molecules*, 27(9). <https://doi.org/10.3390/molecules27093041>
- Tang, Z., Kang, B., Li, C., Chen, T., & Zhang, Z. (2019). GEPIA2: an enhanced web server for large-scale expression profiling and interactive analysis. *Nucleic Acids Research*, 47(W1), W556–W560. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz430>

- Tappia, P. S., & Ramjiawan, B. (2023). Biomarkers for early detection of cancer: molecular aspects. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(6), 5272. <https://doi.org/10.3390/ijms24065272>
- Thompson, P. S., & Cortez, D. (2020). New insights into abasic site repair and tolerance. *DNA Repair*, 90. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2020.102866>
- Tiwari, D., Mittal, N., & Jha, H. C. (2022). Unraveling the links between neurodegeneration and epstein-barr virus-mediated cell cycle dysregulation. *Current Research in Neurobiology*, 3, 100046. <https://doi.org/10.1016/j.crneur.2022.100046>
- Tong, B. C.-K., Wu, A. J., Li, M., & Cheung, K.-H. (2018). Calcium signaling in alzheimer's disease & therapies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1865(11, Part B), 1745–1760. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.07.018>
- Tunyasuvunakool, K., Adler, J., Wu, Z., Green, T., Zielinski, M., Židek, A., Bridgland, A., Cowie, A., Meyer, C., Laydon, A., Velankar, S., Kleywegt, G. J., Bateman, A., Evans, R., Pritzel, A., Figurnov, M., Ronneberger, O., Bates, R., Kohl, S. A. A., ... Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction for the human proteome. *Nature*, 596(7873), 590–596. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03828-1>
- Tutone, M., & Almerico, A. M. (2021). Computational approaches: drug discovery and design in medicinal chemistry and bioinformatics. In *Molecules* (Vol. 26, Issue 24). MDPI. <https://doi.org/10.3390/molecules26247500>
- Ukrainitseva, S., Arbeev, K., Duan, H., Akushevich, I., Feitosa, M., Christensen, K., Stallard, E., & Yashin, A. (2020). Interactions between genes from aging pathways significantly influence risk of alzheimer's disease. *Innovation in Aging*, 4(Supplement\_1), 142–143. <https://doi.org/10.1093/geroni/igaa057.467>
- Underwood, R., Wang, B., Carico, C., Whitaker, R. H., Placzek, W. J., & Yacoubian, T. A. (2020). The gtpase rab27b regulates the release, autophagic clearance, and toxicity of alpha-synuclein. *Journal of Biological Chemistry*, 295(23), 8005–8016. <https://doi.org/10.1074/JBC.RA120.013337>
- Üstüntanır Dede, A. F., & Arslanyolu, M. (2021). The in vivo tetrahymena thermophila extracellular glucose drop assay for characterization of mammalian insulin activity. *European Journal of Protistology*, 79, 125803. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejop.2021.125803>
- Valappil, D. K., Mini, N. J., Dilna, A., & Nath, S. (2022). Membrane interaction to intercellular spread of pathology in alzheimer's disease. In *Frontiers in Neuroscience* (Vol. 16). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnins.2022.936897>
- van der Zanden, S. Y., Qiao, X., & Neeffjes, J. (2021). New insights into the activities and toxicities of the old anticancer drug doxorubicin. In *FEBS Journal* (Vol. 288,



- Issue 21, pp. 6095–6111). John Wiley and Sons Inc.  
<https://doi.org/10.1111/febs.15583>
- Van Ness, K. P., & Kelly, E. J. (2018). Excretory processes in toxicology: drug transporters in drug development. In C. A. McQueen (Ed.), *Comprehensive Toxicology (Third Edition)* (pp. 143–164). Elsevier.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.64206-X>
- Van Goethem, A., Deleu, J., Yigit, N., Everaert, C., Moreno-Smith, M., Vasudevan, S. A., Zeka, F., Demuynck, F., Barbieri, E., Speleman, F., Mestdagh, P., Shohet, J., Vandesompele, J., & Van Maerken, T. (2023). Longitudinal evaluation of serum micrnas as biomarkers for neuroblastoma burden and therapeutic p53 reactivation. *NAR Cancer*, 5(1). <https://doi.org/10.1093/narcan/zcad002>
- Verdelho, A., Biessels, G. J., Chabriat, H., Charidimou, A., Duering, M., Godefroy, O., Pantoni, L., Pavlovic, A., & Wardlaw, J. (2021). Cerebrovascular disease in patients with cognitive impairment: a white paper from the eso dementia committee – a practical point of view with suggestions for the management of cerebrovascular diseases in memory clinics. In *European Stroke Journal* (Vol. 6, Issue 2, pp. 111–119). SAGE Publications Ltd.  
<https://doi.org/10.1177/2396987321994294>
- Vidal, A., Aguilar-Toalá, J. E., & Liceaga, A. M. (2022). Integration of molecular docking analysis and molecular dynamics simulations for studying food proteins and bioactive peptides. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (Vol. 70, Issue 4, pp. 934–943). American Chemical Society.  
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c06110>
- Waghray, D., & Zhang, Q. (2018). Inhibit or evade multidrug resistance p-glycoprotein in cancer treatment. In *Journal of Medicinal Chemistry* (Vol. 61, Issue 12, pp. 5108–5121). American Chemical Society.  
<https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b01457>
- Walker, L. C. (2020). Aβ plaques. In *Free Neuropathology* (Vol. 1). University of Muenster. <https://doi.org/10.17879/freeneuropathology-2020-3025>
- Walker, L., Jacobs, E., McAleese, K. E., Johnson, M., & Attems, J. (2020). Do senescent cells play a role in alzheimer’s disease? *Alzheimer’s & Dementia*, 16(S2). <https://doi.org/10.1002/alz.043820>
- Wang, F., Wang, J., Shen, Y., Li, H., Rausch, W. D., & Huang, X. (2022). Iron dyshomeostasis and ferroptosis: a new alzheimer’s disease hypothesis? In *Frontiers in Aging Neuroscience* (Vol. 14). Frontiers Media S.A.  
<https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.830569>
- Wang, M., Luciani, L. L., Noh, H., Mochan, E., & Shoemaker, J. E. (2020). TREAP: a new topological approach to drug target inference. *Biophysical Journal*, 119(11), 2290–2298. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bpj.2020.10.021>

- Wang, M., Zhang, H., Liang, J., Huang, J., & Chen, N. (2023). Exercise suppresses neuroinflammation for alleviating alzheimer's disease. *Journal of Neuroinflammation*, 20(1), 76. <https://doi.org/10.1186/s12974-023-02753-6>
- Wang, Q., Chen, S., Wang, H., Chen, L., Sun, Y., & Yan, G. (2021). Predicting brain regions related to alzheimer's disease based on global feature. *Frontiers in Computational Neuroscience*, 15. <https://doi.org/10.3389/fncom.2021.659838>
- Wang, X., Ma, Q., Shen, J., Wang, B., Gao, X., & Zhao, L. (2021). Application fields, positions, and bioinformatic mining of non-active sites: a mini-review. In *Frontiers in Chemistry* (Vol. 9). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.661008>
- Wang, Z., Shen, L., Wang, Y., & Huang, S. (2020). Integrated analysis of mirna and mrna expression in the blood of patients with alzheimer's disease. *Molecular Medicine Reports*, 22(2), 1053–1062. <https://doi.org/10.3892/mmr.2020.11162>
- Watanabe, R., Esaki, T., Kawashima, H., Natsume-Kitatani, Y., Nagao, C., Ohashi, R., & Mizuguchi, K. (2018). Predicting fraction unbound in human plasma from chemical structure: improved accuracy in the low value ranges. *Molecular Pharmaceutics*, 15(11), 5302–5311. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.8b00785>
- Wei, T., Liang, Y., Anderson, C., Zhang, M., Zhu, N., & Xie, J. (2022). Identification of candidate hub genes correlated with the pathogenesis, diagnosis, and prognosis of prostate cancer by integrated bioinformatics analysis. *Translational Cancer Research*, 11(10), 3548–3571. <https://doi.org/10.21037/tcr-22-703>
- Westwood, J. T. (2018). Chapter 12 - using transcriptomics to study behavior. In R. T. Gerlai (Ed.), *Molecular-Genetic and Statistical Techniques for Behavioral and Neural Research* (pp. 267–288). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804078-2.00012-X>
- Wijeratne, T., Andrade-Guerrero, J., Santiago-Balmaseda, A., Jeronimo-Aguilar, P., Vargas-Rodríguez, I., Ruth Cadena-Suárez, A., Sánchez-Garibay, C., Pozo-Molina, G., Fabiola Méndez-Catalá, C., Cardenas-Aguayo, M.-C., Diaz-Cintra, S., Pacheco-Herrero, M., Luna-Muñoz, J., & Soto-Rojas, L. O. (2023). Citation: alzheimer's disease: an updated overview of its genetics. *Int. J. Mol. Sci*, 2023, 3754. <https://doi.org/10.3390/ijms>
- Wijesooriya, K., Jadaan, S. A., Perera, K. L., Kaur, T., & Ziemann, M. (2022). Urgent need for consistent standards in functional enrichment analysis. *PLoS Computational Biology*, 18(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1009935>
- Williams, J. R., Yang, R., Clifford, J. L., Watson, D., Campbell, R., Getnet, D., Kumar, R., Hammamieh, R., & Jett, M. (2019). Functional heatmap: an automated and interactive pattern recognition tool to integrate time with multi-omics assays. *BMC Bioinformatics*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12859-019-2657-0>

- Woodward, A. A., Urbanowicz, R. J., Naj, A. C., & Moore, J. H. (2022). Genetic heterogeneity: challenges, impacts, and methods through an associative lens. In *Genetic Epidemiology*. John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/gepi.22497>
- Wu, N., Zhu, Y., Xu, X., Zhu, Y., Song, Y., Pang, L., & Chen, Z. (2018). The anti-tumor effects of dual pi3k/mtor inhibitor bez235 and histone deacetylase inhibitor trichostatin a on inducing autophagy in esophageal squamous cell carcinoma. *Journal of Cancer*, *9*(6), 987–997. <https://doi.org/10.7150/jca.22861>
- Xiao, X., Jiao, B., Liao, X., Zhang, W., Yuan, Z., Guo, L., Wang, X., Zhou, L., Liu, X., Yan, X., Tang, B., & Shen, L. (2020). Association of genes involved in the metabolic pathways of amyloid- $\beta$  and tau proteins with sporadic late-onset alzheimer's disease in the southern han chinese population. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2020.584801>
- Xiao, X., Liu, H., Liu, X., Zhang, W., Zhang, S., & Jiao, B. (2021). APP, psen1, and psen2 variants in alzheimer's disease: systematic re-evaluation according to acmg guidelines. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *13*. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.695808>
- Xie, R., Wen, F., & Qin, Y. (2020). The dysregulation and prognostic analysis of stripak complex across cancers. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *8*. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00625>
- Xu, J., & Yang, Y. (2021). Integrated gene expression profiling analysis reveals potential molecular mechanisms and candidate biomarkers for early risk stratification and prediction of stemi and post-stemi heart failure patients. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, *8*. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2021.736497>
- Xu, J., Zhou, H., & Xiang, G. (2022). Identification of key biomarkers and pathways for maintaining cognitively normal brain aging based on integrated bioinformatics analysis. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *14*. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.833402>
- Xu, W., Fang, F., Ding, J., & Wu, C. (2018). Dysregulation of rab5-mediated endocytic pathways in alzheimer's disease. In *Traffic* (Vol. 19, Issue 4, pp. 253–262). Blackwell Munksgaard. <https://doi.org/10.1111/tra.12547>
- Xu, W., Zhang, H., Zhang, Y., Shen, P., Li, X., Li, R., & Yang, L. (2022). A paired-end whole-genome sequencing approach enables comprehensive characterization of transgene integration in rice. *Communications Biology*, *5*(1). <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03608-1>
- Yabukarski, F., Biel, J. T., Pinney, M. M., Doukov, T., Powers, A. S., Fraser, J. S., & Herschlag, D. (2020). Assessment of enzyme active site positioning and tests of catalytic mechanisms through x-ray-derived conformational ensembles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *117*(52), 33204–33215. <https://doi.org/10.1073/pnas.2011350117>

- Yan, Y., Tao, H., He, J., & Huang, S.-Y. (2020). The hdock server for integrated protein–protein docking. *Nature Protocols*, *15*(5), 1829–1852. <https://doi.org/10.1038/s41596-020-0312-x>
- Yang, J., Gu, J., Shen, Y., Cao, L., Zhou, H., & Zhu, W. (2023). Effect of shan zha (hawthorn or crataegus) on gastrointestinal cancer: a network pharmacology and molecular docking study. *Cancer Pathogenesis and Therapy*. <https://doi.org/10.1016/j.cpt.2023.02.001>
- Yang, L. C., & Hong, X. (2020). Scaling relationships and volcano plots of homogeneous transition metal catalysis. *Dalton Transactions*, *49*(12), 3652–3657. <https://doi.org/10.1039/d0dt00187b>
- Yim, S. K., Kim, K., Chun, S., Oh, T., Jung, W., Jung, K., & Yun, C. H. (2020). Screening of human cyp1a2 and cyp3a4 inhibitors from seaweed in silico and in vitro. *Marine Drugs*, *18*(12). <https://doi.org/10.3390/MD18120603>
- Yoon, J. H., Hwang, J. H., Son, S. U., Choi, J., You, S. W., Park, H., Cha, S. Y., & Maeng, S. (2023). How can insulin resistance cause alzheimer’s disease? In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 24, Issue 4). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms24043506>
- Yu, W., Yu, W., Yang, Y., & Lü, Y. (2021a). Exploring the key genes and identification of potential diagnosis biomarkers in alzheimer’s disease using bioinformatics analysis. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *13*. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.602781>
- Yu, W., Yu, W., Yang, Y., & Lü, Y. (2021b). Exploring the key genes and identification of potential diagnosis biomarkers in alzheimer’s disease using bioinformatics analysis. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *13*. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.602781>
- Yuen, S. C., Zhu, H., & Leung, S. W. (2020). A systematic bioinformatics workflow with meta-analytics identified potential pathogenic factors of alzheimer’s disease. *Frontiers in Neuroscience*, *14*. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00209>
- Yurov, Y. B., Vorsanova, S. G., & Iourov, I. Y. (2019). Chromosome instability in the neurodegenerating brain. *Frontiers in Genetics*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00892>
- Zanini, S., Šečić, E., Jelonek, L., & Kogel, K. H. (2018). A bioinformatics pipeline for the analysis and target prediction of rna effectors in bidirectional communication during plant–microbe interactions. *Frontiers in Plant Science*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01212>
- Zhang, H., Jiang, X., Ma, L., Wei, W., Li, Z., Chang, S., Wen, J., Sun, J., & Li, H. (2022). Role of a $\beta$  in alzheimer’s-related synaptic dysfunction. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 10). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.964075>

- Zhang, J., Li, X., Xiao, J., Xiang, Y., & Ye, F. (2023). Analysis of gene expression profiles in alzheimer's disease patients with different lifespan: a bioinformatics study focusing on the disease heterogeneity. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *15*. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2023.1072184>
- Zhang, N., Zuo, Y., Jiang, L., Peng, Y., Huang, X., & Zuo, L. (2022). Epstein-barr virus and neurological diseases. In *Frontiers in Molecular Biosciences* (Vol. 8). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.816098>
- Zhang, Y. F., Meng, L. B., Hao, M. L., Yang, J. F., & Zou, T. (2020). Identification of co-expressed genes between atrial fibrillation and stroke. *Frontiers in Neurology*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.00184>
- Zhao, J., Liu, X., Xia, W., Zhang, Y., & Wang, C. (2020). Targeting amyloidogenic processing of app in alzheimer's disease. In *Frontiers in Molecular Neuroscience* (Vol. 13). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2020.00137>
- Zhao, M., Ma, J., Li, M., Zhang, Y., Jiang, B., Zhao, X., Huai, C., Shen, L., Zhang, N., He, L., & Qin, S. (2021). Cytochrome p450 enzymes and drug metabolism in humans. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 23). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms222312808>
- Zhao, Y., Zhang, Y., Zhang, L., Dong, Y., Ji, H., & Shen, L. (2019). The potential markers of circulating micrnas and long non-coding rnas in alzheimer's disease. In *Aging and Disease* (Vol. 10, Issue 6, pp. 1293–1301). International Society on Aging and Disease. <https://doi.org/10.14336/AD.2018.1105>
- Zhou, J., Qiu, J., Song, Y., Liang, T., Liu, S., Ren, C., Song, X., Cui, L., & Sun, Y. (2023). Pyroptosis and degenerative diseases of the elderly. In *Cell Death and Disease* (Vol. 14, Issue 2). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41419-023-05634-1>
- Zhou, J., Xiong, W., Wang, Y., & Guan, J. (2021). Protein function prediction based on ppi networks: network reconstruction vs edge enrichment. *Frontiers in Genetics*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.758131>
- Zhou, Y., Zhou, B., Pache, L., Chang, M., Khodabakhshi, A. H., Tanaseichuk, O., Benner, C., & Chanda, S. K. (2019a). Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets. *Nature Communications*, *10*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09234-6>
- Zhou, Y., Zhou, B., Pache, L., Chang, M., Khodabakhshi, A. H., Tanaseichuk, O., Benner, C., & Chanda, S. K. (2019b). Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets. *Nature Communications*, *10*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09234-6>
- Zhou, Y., Zhu, J., Tong, T., Wang, J., Lin, B., & Zhang, J. (2019). A statistical normalization method and differential expression analysis for rna-seq data between different species. *BMC Bioinformatics*, *20*(1). <https://doi.org/10.1186/s12859-019-2745-1>

## ANEXOS

En el enlace a continuación, se presenta la información correspondiente al Anexo 1, 4, 5 y 6: <https://doi.org/10.5281/zenodo.8172937>

**Anexo 1.** Código empleado para la realización del análisis de expresión diferencial.

El archivo está nombrado como: “Anexo 1\_Código\_DEG”

**Anexo 2.** Aminoácidos implicados en la cavidad catalítica de las proteínas CD44, CDK6 y CCND1 reportados bibliográficamente.

<b>Receptor</b>	<b>Aminoácidos</b>	<b>Referencia</b>
CD44	I26, T27, E37, G40, Y42, E75, C77, R98, R150, F34, V132, E127	<b>(Patel et al., 2018)</b>
CDK6	T107, D104, V77, F98, E99, A41, A162, L152, V101, I19, V27, D163	<b>(Chen et al., 2016)</b>
CCND1	L91, K149, N151, S90, L91, L148, N146, E92, T37, A39, C38, F88, F86	<b>(Karim et al., 2016)</b>

Los aminoácidos se presentan en el formato de una letra.

**Anexo 3.** Coordenadas de los sitios activos para establecer el “Grid Box” en AutoDockVina X.

Receptor	SA	NPD			Centro del Grid Box			Offset		
		x	y	z	x	y	z	x	y	z
CD44	<b>Ref</b>	64	58	62	-0.642	11.143	19.061	-2.361	4.472	-6.194
	1	74	68	58	1.191	9.823	18.378	2.806	8.444	-17.306
CDK6	<b>Ref</b>	52	60	58	16.619	28.145	7.650	-1.167	-8.556	-7.278
	1	96	80	104	16.675	24.370	-1.756	16.694	24.389	-1.750
	2	58	46	70	11.094	38.096	-4.309	11.083	38.083	-4.306
	3	74	50	60	23.375	49.714	11.156	23.361	49.694	1.111
	4	52	52	70	19.491	55.795	-7.418	19.472	55.778	-7.417
CCND1	<b>Ref</b>	54	74	52	45.542	22.679	42.048	13.086	5.389	5.889
	1	86	86	70	17.885	4.181	36.536	4.861	-4.639	-6.667
	2	62	64	56	14.005	12.126	48.715	1.000	3.278	5.500
	3	50	72	66	-4.280	21.547	38.244	-23.278	8.361	11.389
	4	66	48	60	15.757	-8.111	40.769	-1.139	-9.000	9.694

**Anexo 4.** Resumen del análisis de expresión diferencial realizado al dataset: GSE28146.

PROBE_ID	logFC	AveExpr	t	P,value	Symbol	Regulación
224588_at	5,505	5,505	5,505	5,505	XIST	Up
213831_at	-3,619	7,401	-2,149	0,041	HLA-DQA1	Down
209660_at	3,152	7,388	2,386	0,024	TTR	Up
226020_s_at	3,107	6,740	3,156	0,004	DAB1	Up
213817_at	3,044	6,361	4,381	0,000	IRAK3	Up
231592_at	2,946	9,793	1,902	0,068	TSIX	Up
205000_at	-2,932	7,031	-2,207	0,036	DDX3Y	Down
221944_at	2,805	5,818	3,829	0,001	FLJ42627	Up
214983_at	-2,672	6,793	-2,870	0,008	TTY15	Down

206700_s_at	-2,567	7,099	-1,325	0,196	KDM5D	Down
227313_at	2,563	6,834	3,364	0,002	CNPY4	Up

El alta (Up) y baja (Down) expresión de los genes se presenta en la columna “Regulación”. La información completa del análisis de expresión diferencial se encuentra en el enlace antes mencionado con el nombre “Anexo 4\_Resultados\_DEGs”.

**Anexo 5.** Análisis completo de las propiedades topológicas globales de la red generada a partir del dataset GSE28146.

El enlace contiene un archivo “.csv” con el nombre “Anexo 5\_Topología\_global\_de\_la\_red”, donde se recopila toda la información obtenida por medio de Cytoscape.

**Anexo 6.** Análisis de supervivencia de los 23 genes restantes.

El archivo se encuentra en PDF con el nombre de “Anexo 6\_Análisis de supervivencia”.

**Anexo 7.** Identificación de fármacos usando bases de datos, para los genes LEF1, FGFR1, CD44 y CDK6.

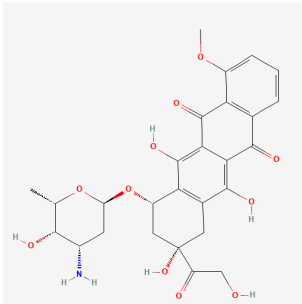
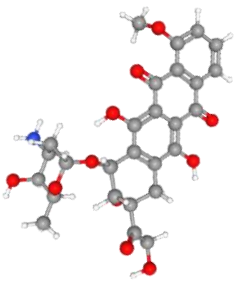
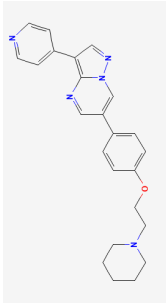
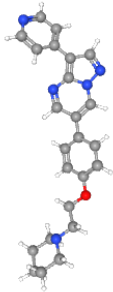
<b>Proteína</b>	<b>Fármacos</b>	<b>Base de datos</b>
LEF1	Estradiol	CTD
	Tricostatina A	CTD
	Azoximetano	CTD
	Sulfato de dextrano	CTD
	Ftalato de dibutilo	TTD
	Etilhexil metoxicrileno	DrugBank
FGFR1	Triyodotironina	CTD
	Regorafenib	CTD
	Clemastina	CTD
	Pazopanib	CTD
	Infigratinib	DrugBank

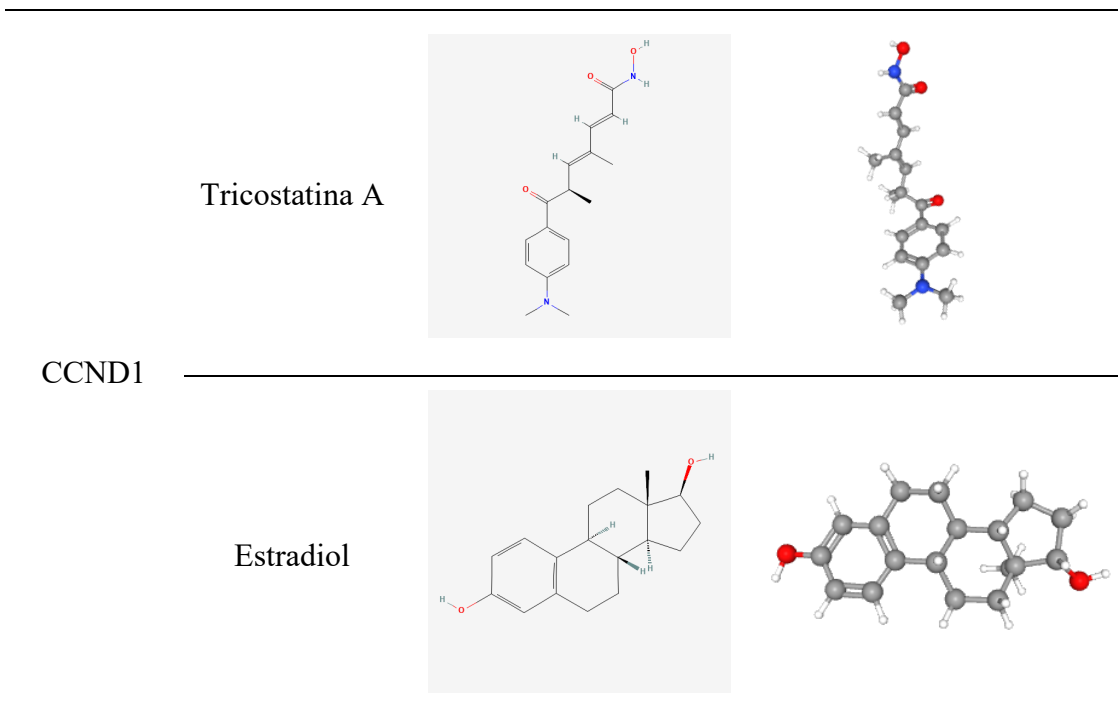


	Resveratrol	CTD
	Tretinoína	DrugBank
CD44	Estradiol	CTD
	Dextrometorfano	TTD
	Bleomicina	CTD
	Doxorrubicina	CTD
	Palbociclib	DrugBank
CDK6	Dorsomorfina	CTD
	Abemaciclib	TTD
	Clocortolona	CTD
	Lovastatina	CTD
	Tricostatina A	CTD

CTD es la abreviatura utilizada para hacer referencia a “Comparative Toxicogenomics Databases”, mientras que TTD es la abreviatura para “Therapeutic Target Database”.

**Anexo 8.** Estructuras 3D y 2D de los ligandos empleados para el acoplamiento molecular.

Receptores	Ligandos	Estructura 2D	Estructura 3D
CD44	Doxorrubicina		
CDK6	Dorsomorfina		



**Anexo 9.** Comparación de residuos involucrados en la cavidad catalítica reportados bibliográficamente y el sitio activo 1 predicho por “DogSiteScorer”.

Receptor	Residuos	
	Cavidad catalítica	Sitio activo 1
CD44 (4PZ3)	I26, T27, E37,	I19, G20, Y24, V27, A41, L42, Y43, R44, V45,
	G40, Y42, E75, N25, I26, T27, C28, F30, H35, E37, G73, F74, C77, R98, R150, E75, T76, U127, V147, N149, R150 F34, V132, E127	T58, I59, R60, E61, V62, V64, L65, R66, L68, F98, E99, A41, E69, F71, E72, H73, V76, R78, L79, V78, L79, A162, L152, V101, V82, L94, L96, F98, E99, H100, V101, D104, I19, V27, D163 F135, L136, V141, R144, D145, Y147, Q149, N150, L152, A162, D163, F164, G165, L166

---

L91, K149, N151, P54, S55, R57, Y58, T62, L65, C68, E69, Y72, CCND1 S90, L91, L148, Y73, E74, E75, F78, P79, H158, Q183, T184, (2W96) N146, E92, T37, V186, A187, L188, T191, D192, V193, I196, A39. C38, F88, F86 L254, S257, S258, Q261
---

---

**Anexo 10.** Códigos SMILES de los fármacos empleados para el análisis de las propiedades farmacocinéticas.

<b>Fármaco</b>	<b>Código SMILES</b>
Doxorrubicina	<chem>CC1C(C(CC(O1)OC2CC(CC3=C2C(=C4C(=C3O)C(=O)C5=C(C4=O)C(=CC=C5)OC)O)(C(=O)CO)O)N)O</chem>
Dorsomorfinina	<chem>C1CCN(CC1)CCOC2=CC=C(C=C2)C3=CN4C(=C(C=N4)C5=CC=NC=C5)N=C3</chem>
Tricostatina A	<chem>CC(C=C(C)C=CC(=O)NO)C(=O)C1=CC=C(C=C1)N(C)C</chem>
Estradiol	<chem>CC12CCC3C(C1CCC2O)CCC4=C3C=CC(=C4)O</chem>

---