



FACULTAD EN INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

ELUCIDACIÓN COMPUTACIONAL DEL POSIBLE MECANISMO DE
ACCIÓN ANTIOXIDANTE DE COMPUESTOS BIOACTIVOS DE LA MIEL

AUTORA

María Fernanda Quelal Mejía

AÑO

2018



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

ELUCIDACIÓN COMPUTACIONAL DEL POSIBLE MECANISMO DE ACCIÓN
ANTIOXIDANTE DE COMPUESTOS BIOACTIVOS DE LA MIEL.

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos
establecidos para optar por el título de Ingeniera en Biotecnología

Profesora Guía

Ph.D. Eduardo Tejera Puente

Autora

María Fernanda Quelal Mejía

Año

2018

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

"Declaro haber dirigido este trabajo, Elucidación computacional del posible mecanismo de acción antioxidante de compuestos bioactivos de la miel, a través de reuniones periódicas con la estudiante María Fernanda Quelal Mejía, en el semestre 2018-2, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".

Eduardo Tejera Puente

Doctor en Ciencias Farmacéuticas-Especialidad Bioquímica

CI: 1756501977

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

“Declaro haber revisado este trabajo, Elucidación computacional del posible mecanismo de acción antioxidante de compuestos bioactivos de la miel, del estudiante María Fernanda Quelal Mejía, en el semestre 2018-2, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”

Yunierkis Pérez Castillo

Doctor en ciencias por la Vrije Universiteit Brussel

CI: 1756959035

DECLARACIÓN DEL ESTUDIANTE

"Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes".

María Fernanda Quelal Mejía

C. I.1723683650

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres y mi hermano por todo el apoyo a lo largo de mi vida y mi carrera, por siempre confiar en mí y permitirme alcanzar esta tan anhelada meta. A Paúl por todo su apoyo incondicional en el desarrollo de este proyecto y los últimos años de carrera.

Al Doctor Eduardo Tejera por todos los conocimientos brindados y el excelente apoyo incondicional en la elaboración y guía de este proyecto.

A la Dirección general de investigación de la Universidad de las Américas. Al grupo de Bio-quimioinformática y el apoyo de todos los profesores que conforman dicha área, en especial Yunierkis Pérez y Vinicio Armijos.

DEDICATORIA

A mis papis, Oscar y Cristina por siempre guiarme y ser mi mejor ejemplo de seguir, y siempre enseñarme y ayudarme a conseguir la fuerza y perseverancia para alcanzar todas mis metas. A mi hermano David por su apoyo y consejos, a mini por ser la compañera fiel durante muchas noches de desvelo. A Kari, por ser una amiga incondicional y compartir risas y consejos en toda nuestra carrera.

A todos mis amigos, y familiares que han estado presentes en este camino.

RESUMEN

El descubrimiento de medicamentos es uno de los campos que más demanda de tiempo y dinero requieren, es por esta razón que se ha visto una necesidad y esfuerzo en tratar de disminuir el tiempo de generación de un medicamento, y la prevención de interacciones no deseadas. Así, se han desarrollado métodos bioinformáticos que permitan acelerar este proceso brindándonos un conocimiento previo de reacciones químicas mediante elucidaciones y simulaciones computacionales.

La miel es un compuesto natural que ha sido utilizada desde hace mucho tiempo como fuente medicinal por sus diversas propiedades que le permiten actuar como antiinflamatorio, antioxidante, angiogénico, antimicrobiano, entre otras.

Una causa frecuente de enfermedades se debe al estrés oxidativo y llega a afectar a lípidos, proteínas y el ADN. Así, se ha visto que la miel ejerce un papel antioxidante por la cantidad de compuestos bioactivos que posee como polifenoles y flavonoides. Sin embargo, aunque existe evidencia de sus beneficios aún no ha sido posible determinar cuál es el mecanismo de acción.

El objetivo de esta investigación fue esclarecer el mecanismo de acción que siguen los compuestos bioactivos de la miel para producir su efecto antioxidante. Para esto utilizamos varias herramientas computacionales como *Target fishing* logrando predecir 514 posibles dianas. Una vez obtenidos estos datos se realizó un análisis de enriquecimiento para conocer los procesos biológicos y rutas metabólicas en donde las proteínas predichas se encontraban presentes. También se analizaron los principales procesos biológicos entre ellos los de desmontaje de la membrana, envejecimiento y fosforilación de proteínas. Para el análisis de las rutas metabólicas se utilizó la herramienta *RSpider*. De esta manera se determinó que para llegar a ejercer un efecto antioxidante los compuestos pueden seguir varias rutas como la del metabolismo del ácido araquidónico, metabolismo del nitrógeno, entre otras.

ABSTRACT

The discovery of new drugs is one of the fields that more demand of time and money requires, therefore we need more tools to reduce the time of generation of a new drug as well as preventing the presence of unwanted interactions. For this reason, bioinformatics methods have been developed to accelerate this process by providing us computational knowledge to elucidate and simulate new drug development mechanism. Honey bee is a natural compound that has been used for a long time as a medicinal source. It has several properties such as anti-inflammatory, antioxidant, angiogenic, antimicrobial, among others.

One of the most frequent causes of diseases are the formation of free radicals, which accumulation leads to oxidative stress that is generated by the energy imbalance of cells affecting lipids, proteins and DNA. Thus, it has been observed that honey acts as antioxidant due to the number of bioactive compounds that it contains such as polyphenols and flavonoids. However, despite the existing evidence of its benefits, it has not yet been possible to determine the mechanism of action. The objective of this investigation was to clarify the mechanism of action that the bioactive compounds of honey follow to produce their antioxidant effect. Computational tools such as Target Fishing were used. The prediction of 514 targets was achieved. An enrichment analysis was performed with this data to study the biological processes and metabolic pathways. The main biological processes identified for the compounds were the response to drugs, membrane disassembly, aging and protein phosphorylation. For the analyses of metabolic pathways, the RSpider server was used, which condenses the list of genes into an integrative network and associates them with different metabolic pathways. In this way, it was determined that to decide an antioxidant effect, the compounds follow several routes in which the metabolism of arachidonic acid, nitrogen metabolism, among others, are involved. The main conclusion of our study is that there is not only one antioxidant mechanism for the studied compounds.

ÍNDICE

1. Capítulo I. Introducción	1
1.1 Antecedentes.....	1
1.2 Planteamiento del problema	3
1.3 Objetivos.....	4
1.4 Justificación de la investigación	5
2. Capítulo II. Marco Teórico	6
2.1 Características y propiedades de la miel.....	6
2.2 Herramientas computacionales.....	8
2.2.1 Target Fishing	8
2.2.2 Análisis de enriquecimiento bioinformático	14
3. Capítulo III. Diseño experimental.....	17
4. Capítulo IV. Procedimientos	19
4.1 Determinación de compuestos bioactivos de la miel.....	19
4.2 Target Fishing	21
4.2.1 Similarity ensemble approach (SEA)	21
4.2.2 MolTarPred.....	22
4.2.3 Prediction Charite	23
4.3 Redes de Interacción metabólica	23
4.3.1 RSpider	23
4.4 Análisis de enriquecimiento	24
4.4.1 David Bioinformatic resources.....	24
5. Capítulo V. Resultados y discusión	25
6. Conclusiones y recomendaciones.....	40

6.1 Conclusiones	40
6.2 Recomendaciones.....	41
REFERENCIAS	42
ANEXOS	50

1. Capítulo I. Introducción

1.1 Antecedentes

El descubrimiento de fármacos es uno de los procesos más costosos y que mayor demanda de tiempo requiere (Blass, n.d.; Groves, 2006). Comúnmente, se ha visto la generación de interacciones no deseadas, debido a reacciones inespecíficas con dianas no previstas. (Álvarez-Suarez, 2016-Sliwoski, Kothiwale, Meiler, & Lowe, 2014), lo que genera una reacción adversa provocando problemas en quienes se emplee el fármaco. Por este motivo es que algunos fármacos solo llegan a la fase preclínica de su descubrimiento (Wilson & Neumann, 2012). A pesar de que las interacciones con dianas alternativas no son correctas, estas pueden ser utilizadas para nuevos descubrimientos como en la poli farmacología, el reposicionamiento de fármacos y como información adicional para proyectos de investigación (Liu et al., 2014).

Por otro lado, con el paso del tiempo y la aparición de nuevas necesidades, se han venido desarrollando varios métodos computacionales que permitan la identificación de posibles dianas. Para esto se emplean grandes bases de datos de compuestos químicos y proteínas que se han ido descubriendo (Real Academia Nacional de Farmacia (Spain) et al., 2002). El uso de métodos computacionales, construido usualmente en equipos multidisciplinarios contribuye de forma más eficiente al análisis de grandes cantidades de datos (Lim et al., 2016). Así se ha aportado al filtrado de datos para poder seleccionar moléculas candidatas que puedan ser utilizadas en evaluaciones experimentales que tengan como fin la generación de una hipótesis para comprender los posibles mecanismos de acción de determinados compuestos (Liao, Sun, Guo, & Li, n.d.)Liu et al., 2014). De esta

manera es factible conseguir procesos experimentales con menor demanda de tiempo y dinero permitiendo un descubrimiento más eficiente de fármacos (Sliwoski et al., 2014).

El impulso constante para el descubrimiento de nuevos fármacos conlleva a la búsqueda de compuestos con distintas características. Un ejemplo de estos son los antioxidantes introducidos o naturalmente presentes en diversos alimentos que promueven un efecto adicional (Zhang & Tsao, 2016). Uno de estos alimentos es la miel de abejas, que tiene un largo recorrido en la historia al ser utilizada desde la antigüedad como fuente medicinal (Niaz, Maqbool, Bahadar, & Abdollahi, 2017).

Hay una amplia cantidad de evidencia que demuestra que la miel posee propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y angiogénicas sobre las células, al contener varios compuestos bioactivos como lipofenoles, ácidos fenólicos, flavonoides y proteínas (Zhang & Tsao, 2016). Por esta razón, es considerada una buena fuente natural para la obtención de compuestos candidatos para futuro uso terapéutico. La miel en especial contiene varios compuestos que juegan un papel importante en la activación de la vía de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) y la proteína reguladora de genes involucrados en la producción de enzimas antioxidantes, (Nrf2) MPK/Nrf2 y especies reactivas de oxígeno (ROS) que es la principal vía responsable ante la respuesta antioxidante, la cascada relacionada con las defensas antioxidantes y la funcionalidad mitocondrial (Álvarez-Suarez et al., 2016). Además, la cascada de AMPK es uno de los principales sistemas que ayudan a mantener la homeostasis energética en las células, y está involucrada en la respuesta al daño por estrés oxidativo que es inducido por ROS a través del aumento de los niveles de expresión del factor nuclear 2 (Nrf2) (Kovac et al., 2015).

1.2 Planteamiento del problema

A pesar de la evidencia existente sobre los beneficios de la miel de abejas, aún se desconoce el mecanismo de acción específico de sus componentes para inhibir vías como la del estrés oxidativo (Alvarez-Suarez, 2016). Uno de los mecanismos más empleados en la explicación del efecto antioxidante de compuestos naturales es el relacionado con la prevención de la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS). Estas son subproductos del metabolismo aeróbico que provocan reactividad con distintos compuestos biológicos induciendo en patologías ya que dañan lípidos, proteínas y al DNA (Aliyu et al., 2013; Choudhury, Rivero, Blumwald, & Mittler, 2017).

Se han desarrollado varias investigaciones con respecto a las propiedades de la miel para controlar el estrés oxidativo, en donde se han llegado a proponer algunos mecanismos de acción para determinar de qué manera la miel puede inhibir vías relacionadas con el estrés oxidativo. Una de las teorías se basa en el secuestro de radicales libres como superóxido e hidroxilo para controlar la generación de especies reactivas de oxígeno (Osorio & Fernie, 2013).

De igual manera, se ha visto que las ROS se encuentran involucradas en el envejecimiento. Con el paso de los años el ser humano empieza a perder funciones sensoriales e inmunológicas las cuales tienden a afectar a órganos y tejidos dando lugar a graves infecciones y enfermedades. Estas enfermedades incluyen trastornos neurodegenerativos, inflamación, patologías autoinmunes, infecciones virales, trastornos del sistema digestivo, inflamaciones gastrointestinales, entre otras (Klaunig & Kamendulis, 2004).

A pesar de todos los esfuerzos realizados, hasta el momento no se conoce con seguridad el posible mecanismo de acción de los compuestos bioactivos de la miel. Se han caracterizado varios compuestos bioactivos involucrados lo cuales pueden realizar una sinergia entre ellos para producir un efecto beneficioso o bien trabajar de manera individual. (Alvarez-Suarez, 2016). La investigación experimental con cada uno de los compuestos demandaría un presupuesto innecesario si no se conoce claramente cuáles de ellos pueden actuar en conjunto, o cuales sería los mejores candidatos. De esta manera, el conocimiento de un posible mecanismo de acción específico con herramientas bioinformáticas es de suma importancia para futuras investigaciones experimentales y el desarrollo de nuevas terapias frente a varias enfermedades (Farman et al., 2014).

1.3 Objetivos

General

- Elucidar de forma computacional posibles mecanismos de acción antioxidante de compuestos naturales obtenidos de la miel de abeja.

Específicos

- Identificar posibles dianas mediante herramientas de *target fishing*.
- Analizar las redes metabólicas formadas por estas dianas, así como sus posibles vínculos con las rutas metabólicas de estrés oxidativo.
- Determinar *in silico* los posibles mecanismos de acción antioxidantes mediante modelación computacional.

1.3 Justificación de la investigación

Como se ha mencionado antes, existe un alto interés en el estudio de compuestos naturales con fines farmacológicos. Dentro de estos se encuentran aquellos derivados de la miel de abeja, de la cual se ha evidenciado propiedades antibacterianas y habilidades para la cicatrización heridas físicas (Alvarez-Suarez et al., 2016). La investigación con compuestos naturales frente al estrés oxidativo es de suma importancia para posibles tratamientos frente a un gran número de patologías especialmente si el foco de la investigación es basado en la formación de ROS ya que estos se ha visto relacionado con algunas enfermedades (Gechev et al., 2014).

Tomando en cuenta que las investigaciones requieren ser específicas, no ha sido posible que todos los compuestos sean investigados. Por esta razón la bioinformática se ha encargado de la investigación *in silico* de posibles dianas terapéuticas para abordar de mejor manera el diseño experimental, generando investigaciones más específicas y con menor demanda de tiempo. Al igual que con el conocimiento de compuestos naturales beneficiosos, estos puedan servir como modelo para el desarrollo de nuevos compuestos para uso farmacológico.

2. Capítulo II. Marco Teórico

2.1 Características y propiedades de la miel.

La miel es un alimento que se caracteriza por contener una amplia cantidad de nutrientes por lo que desde hace mucho tiempo se utiliza como fuente terapéutica al contar con actividades beneficiosas para la salud. Se ha determinado que la miel contiene aproximadamente 181 sustancias en su composición y debido a sus características ha sido considerada como una fuente natural para la medicina tradicional. Su acción farmacológica se ha comprobado en varias enfermedades como: trastornos gastrointestinales, agente microbiano, cicatrización de heridas y protección frente a varios padecimientos crónicos y agudos (Mobarok Ali, n.d.). Los principales componentes de la miel son azúcares, sin embargo, contiene otros componentes como minerales, proteínas y compuestos fenólicos. Los compuestos fenólicos se ha visto que contribuyen principalmente a producir su efecto beneficioso en como antioxidantes (Moniruzzaman, Sulaiman, Khalil, & Gan, 2013).

En la naturaleza es posible encontrar varios antioxidantes naturales que son ricos en flavonoides. Estos presentan una gama de efectos biológicos como antibacteriano, antialérgico, antitrombóticos, antiinflamatorio, vasodilatador, entre otros. En la actualidad, se ha identificado que los causantes de la oxidación en las células son los radicales libres que causan daño a nivel de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos por la formación de especies reactivas del oxígeno. Además provocan daño por estrés oxidativo que pueden desembocar en algunas complicaciones biológicas como mutagénesis, carcinogénesis, aterosclerosis y envejecimiento (Giampieri et al., 2017).

Uno de los mecanismos de acción que puede surgir por las especies reactivas de oxígeno, es en la producción de ácidos grasos poliinsaturados donde las cadenas laterales de la membrana podrían oxidarse por la exposición a ROS. Como resultado la peroxidación de lípidos actúa directamente sobre la permeabilidad de la membrana, por lo que se pueden producir compuestos tóxicos para el ser humano como el acetaldehído, malonaldehído que producen efectos negativos a nivel de ADN y ARN (Halliwell & Gutteridge, n.d.). Al acumularse radicales libres, se genera el estrés oxidativo por lo que se han desarrollado algunos antioxidantes para combatirlo. Estas son sustancias que presentan un sustrato oxidable y previene o retrasa la oxidación de otro sustrato. Los compuestos antioxidantes pueden ser compuestos fenólicos, de nitrógeno, aminoácidos, carotenoides, entre otros. (Sánchez-Valle & Méndez-Sánchez, 2018).

Debido a sus estructuras moleculares en donde se incluye un anillo aromático conformado de grupos hidróxido en donde están presentes hidrógenos móviles, los fenoles son transportadores eficientes de radicales libres. La acción de un compuesto fenólico puede relacionarse directamente con su capacidad para reducir o quelar un ion férrico en la catálisis de la peroxidación lipídica. (Al-Mamary, Al-Meer, & Al-Habori, 2002).

A pesar de conocer todos los beneficios que se puede obtener de la miel, aún no se ha logrado determinar el mecanismo que sus componentes siguen para producir dicho efecto. Sin embargo, uno de los posibles mecanismos que han surgido es aquel que está relacionado en procesos de inflamación, estrés oxidativo y procesos de difusión mitocondrial. En dichos procesos se encuentra la vía de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK), que actúa como un sensor

energético bien conservado que se desempeña como clave para la regulación del metabolismo de lípidos y proteínas jugando un papel importante en la regulación del metabolismo celular (Kim & He, 2013).

2.2 Herramientas computacionales

Varios de los medicamentos de uso clínico han sido el resultado de un largo proceso de descubrimiento, por lo que es necesario el uso de varias disciplinas para lograr un descubrimiento con mínimos efectos secundarios y más efectos beneficiosos. A pesar de este conocimiento, se vienen desarrollando métodos experimentales los cuales toman varios años en desarrollarse. Sin embargo, con el uso de métodos computacionales es posible acelerar dicho proceso gracias a que permiten identificar y codificar modelos teóricos con precisión y se puede agrupar una gran cantidad de datos. Además, la aplicación de los modelos computacionales contribuye al conocimiento y entendimiento de mecanismos de acción que toman los principios activos de varios medicamentos con lo que es posible mejorar sus propiedades, en especial con compuestos químicos de fuentes naturales (Saldívar-González, Prieto-Martínez, & Medina-Franco, 2017).

2.2.1 Target Fishing

En la búsqueda de datos que permitan identificar posibles compuestos que puedan interactuar con una diana específica, se han desarrollado herramientas como el de *Target fishing*. El objetivo del mismo es identificar de manera computacional las dianas que más probabilidad tengan de interactuar o unirse a una molécula de consulta, permitiendo establecer una predicción de la bioactividad

con respecto a la molécula de consulta (Koutsoukas et al., 2011). Además, con esta herramienta es posible detectar posibles efectos adversos que puedan ser utilizados para el descubrimiento de fármacos como en la poli farmacología (Figura 1), que se define como la capacidad que poseen pequeñas moléculas para interactuar con múltiples proteínas. Este conocimiento brinda una valiosa información para el desarrollo de medicamentos más efectivos y menos tóxicos, al igual que para el desarrollo de medicamentos más específicos (Rodrigues et al., 2014).

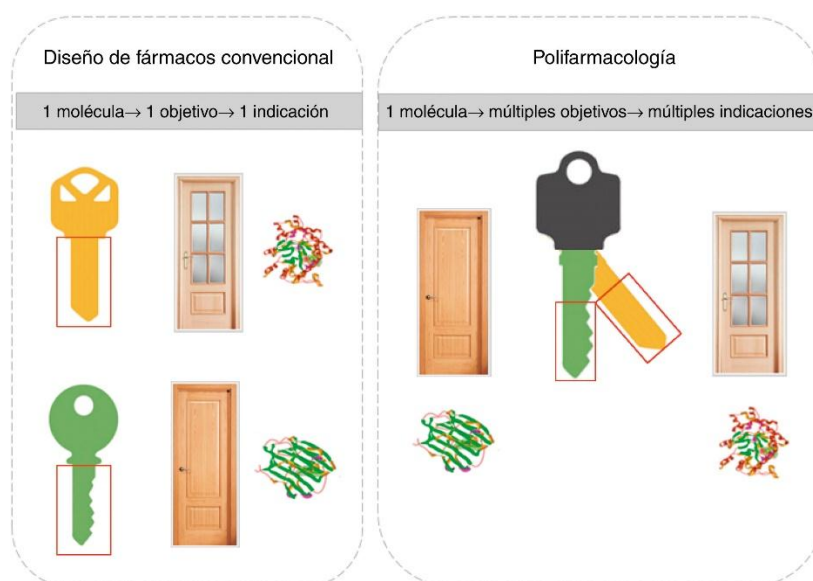


Figura 1. Polifarmacología.

Tomado de (Saldívar-González et al., 2017).

La similitud química a través de huellas dactilares 2d y 3d puede utilizarse para predecir nuevas dianas o interacciones de una molécula de consulta. (fradera & babaoglu, 2017).

También se ha utilizado el *target fishing* para el reposicionamiento de medicamentos que consiste en la búsqueda de nuevas aplicaciones para medicamentos que ya son conocidos. De esta forma se puede abordar de una manera más eficiente el descubrimiento de usos alternativos para medicamentos ya existentes.(van Laarhoven, Nabuurs, & Marchiori, 2011).

Varias bases de datos contienen millones de moléculas e información sobre la actividad de algunas moléculas como ChEMBL (Gaulton et al., 2017) y PubChem (Kim et al., 2016). Gracias a estas bases de datos ahora es posible realizar una fusión entre un producto químico conocido tanto con su estructura espacial y el espacio biológico que el mismo ocupa. Esto permite generar espectros biológicos que permitan predecir la actividad fenotípica de nuevas moléculas basándose en su estructura química y su bioactividad, o la bioactividad de compuestos similares (Kuhn, Campillos, González, Jensen, & Bork, 2008; Szklarczyk et al., 2015).

Varios métodos computacionales han sido desarrollados para predecir dianas a las cuales pueden llegar las moléculas de consulta. Inicialmente estos métodos fueron clasificados en cuatro grupos: Búsqueda por similitud química, aprendizaje automático, acoplamiento de paneles y análisis de espectros de bioactividad. (Schomburg et al., 2014).

2.2.1.1 Búsqueda por similitud molecular

Los métodos más simples para *target fishing* se basan en similitud molecular, en donde se afirma que es probable que moléculas similares tengan propiedades similares (Saldívar-González et al., 2017).

Así las dianas de la molécula de consulta pueden ser predichas por medio de la identificación de ligandos y proteínas de moléculas conocidas que sean similares a la de consulta. (Fradera & Babaoglu, 2017).

Por ejemplo, se puede representar una molécula pequeña como una huella dactilar única (o *fingerprint*), que es una forma de codificar la estructura de una molécula (Figura. 2). El tipo más común de huella dactilar es una serie de dígitos binarios (bits) que representa la presencia o ausencia de subestructuras en una molécula (Obaid et al., 2017).

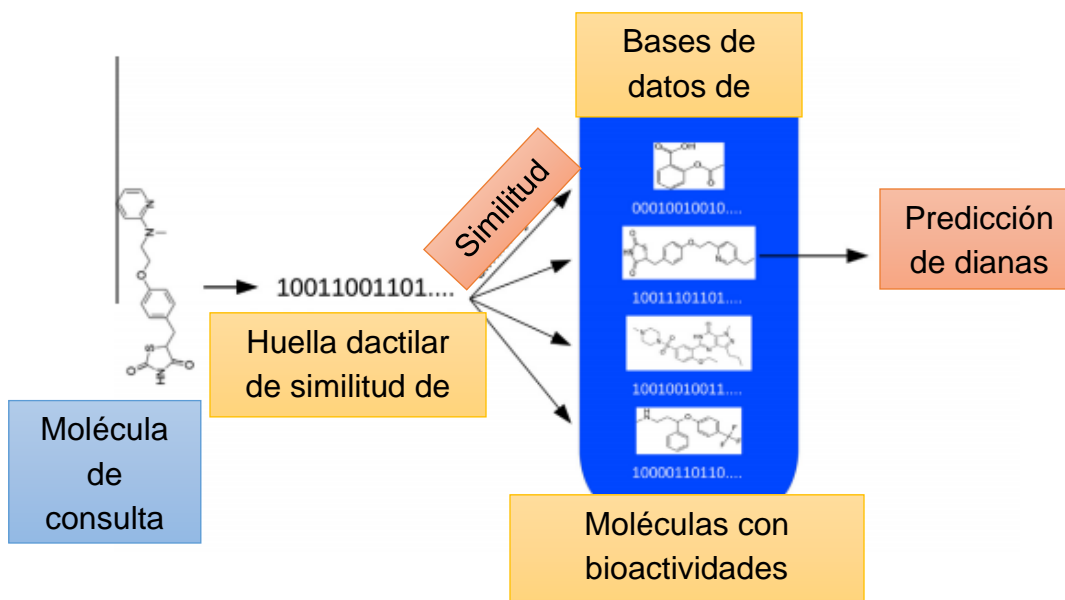


Figura 2. Similitud química.

Tomado de (fradera & babaoglu, 2017).

Otra manera de conocer la similitud entre dos moléculas es mediante un enfoque de similitud que compara dianas proteicas mediante similitud 2D de las moléculas. Con el paso del tiempo también se desarrollaron métodos de análisis de similitud 3D, pero conlleva a un costo computacional más alto que la similitud con huellas 2D. Algunos métodos que utilizan la información 2D han superado a métodos que utilizan las similitudes 3D que se emplea entonces en casos donde existe una similitud estructural baja (Fradera & Babaoglu, 2017).

2.2.1.2 Métodos de aprendizaje automático

Se han desarrollado varios métodos computacionales de *target fishing* basados en aprendizaje automático (*machine learning*) que consisten en obtener una matriz bidimensional teniendo una columna para las dianas o targets predichos y una fila para los ligandos. Una vez obtenida dicha matriz por medio de herramientas computacionales es posible completar los espacios en blanco o huecos que quedan y predecir su valor correspondiente para seleccionar los que corresponda a una mayor puntuación (Manuel Morilla & Francesc Xavier AvilésInstitut, 2017).

De esta manera es posible la obtención de clasificadores de red para la obtención de un resultado sistemático que permita asociar los nombres de dianas y sus estructuras químicas. Por lo tanto, obtener un modelo con múltiples objetivos individuales es posible gracias a estos métodos (Liu et al., 2014).

2.2.1.3 Métodos basados en estructura proteica

Otros métodos de *target fishing* utilizan las estructuras proteicas de sus dianas para poder predecir nuevas bioactividades (Cereto-Massagué et al., 2015). En estos métodos se utiliza un farmacóforo, que es un conjunto de distintos tipos de grupos funcionales que puede representar las interacciones en común de un conjunto de ligandos (and & Muskal*, 1999). Este farmacóforo, se lo utiliza para la predicción de nuevas bioactividades de estructuras proteicas por medio de la identificación de interacciones entre enlaces hidrogeno, interacciones hidrofóbicas e interacciones electrostáticas.

El acoplamiento molecular presenta limitaciones para poder predecir las interacciones de una diana y un ligando, debido a que no existe una relación significativa entre las puntuaciones de acoplamiento y la afinidad del ligando (Cereto-Massagué et al., 2015). En algunos casos estos métodos pueden ayudar de manera significativa a la predicción de moléculas en un menor tiempo posible (Liu et al., 2014).

2.2.1.4 Métodos basados en el análisis de espectros de bioactividad.

El conocimiento de las actividades de un compuesto determinando mediante perfiles de expresión génica o microarrays de proteínas se pueden ver como descriptores moleculares, y se los utiliza para la predicción de objetivos (Cereto-Massagué et al., 2015). En estos métodos se utilizan valores experimentales de espectros de bioactividad de las moléculas en consulta para la obtención de un mapa de conectividad tomando en cuenta los perfiles de expresión génica de cultivos celulares que hayan sido tratados con pequeñas moléculas bioactivas (Wang et al., 2013) .

2.2.2 Análisis de enriquecimiento bioinformático

Tradicionalmente en la investigación se estudia uno o pocos genes al mismo tiempo. Sin embargo, cuando nos enfrentamos a la tarea de analizar cientos o miles de genes que estén implicados en distintas rutas metabólicas de interés, es necesario recurrir a técnicas estadísticas que nos ayuden a condensar esos datos. Para ello usualmente se hace uso de informaciones complementarias como por ejemplo, la ontología de genes (*Gene Ontology*) (Ashburner et al., 2000), rutas

metabólicas (Kanehisa, Furumichi, Tanabe, Sato, & Morishima, 2017), etc. Para este tipo de análisis existen actualmente varias herramientas como EASE (Hosack et al., 2003) y DAVID (Huang, Sherman, & Lempicki, 2009).

El análisis de enriquecimiento juega un papel importante al contribuir al análisis funcional de grandes listas de genes para estudios de alto rendimiento. De esta manera se han desarrollado varias herramientas de enriquecimiento que sean más fáciles de interpretar para el usuario. Sin embargo, en algunas ocasiones se puede encontrar con servidores desactualizados que dificulten el desarrollo del trabajo de investigación (Oda, Nagasu, & Chait, 2001).

2.2.3.1 Principio general del análisis de herramientas de enriquecimiento

Basándose en el conocimiento biológico previo, se han desarrollado herramientas de enriquecimiento que, iniciando con una base de datos biológica se identifican términos biológicos que se relacionan con un mismo grupo, así, a cada termino biológico se le añade un valor estadístico de probabilidad (valor p) para determinar la importancia de cada termino con respecto al conjunto de datos genéticos que se está analizando. Para comprender un proceso biológico se debe mencionar que el mismo está asociado a un grupo de genes individuales, por lo que es importante determinar cuáles de los genes presentes desarrollan un trabajo conjunto para esto se utilizan herramientas de enriquecimiento. Por lo tanto, el conjunto que mayor enriquecimiento tenga será aquel que contenga una mayor cantidad de genes que actúen conjuntamente, generando un análisis de grandes listas de genes que se los observe mediante grupos enriquecidos (Al-Shahrour et al., 2007).

Al aumentar la probabilidad de contener varios genes en un grupo, aumenta la posibilidad de poder determinar un proceso biológico. Este enriquecimiento puede ser medido cuantitativamente por algunos métodos estadísticos como Chi-cuadrado. Estas herramientas sistemáticas pueden mapear una gran cantidad de genes que se asocien a un proceso biológico y poder examinarlo estadísticamente mediante el enriquecimiento de los genes (Khatri & Draghici, 2005).

2.2.3.2 Clasificación de las herramientas de enriquecimiento

2.2.3.2.1 Análisis de enriquecimiento singular (SEA)

Para el análisis de enriquecimiento se utilizan genes de interés que ya hayan sido pre seleccionados, los mismos que al ser analizados son establecidos con un valor de probabilidad (valor p) para determinar si corresponden a una clase biológica en particular (Al-Shahrour et al., 2007).

2.2.3.2.2 Análisis de enriquecimiento del conjunto genético (GSEA)

Se centraliza en el principio de SEA, pero contiene un algoritmo que permite agrupar todos los genes, sin seleccionar los más significativos, si no, basándose en el valor p de cada uno. Esto beneficia en el análisis de enriquecimiento ya que al no tomar solo como resultado los genes significativos, se reducen los factores

arbitrarios y se utiliza toda la información, haciendo posible la identificación de cambios mínimos que existan entre los términos genéticos (Väremo, Nielsen, & Nookaew, 2013).

2.2.3.2.3 Análisis de enriquecimiento modular (MEA)

Se centra básicamente en SEA. Sin embargo, adopta algoritmos adicionales que permiten considerar relaciones de cada termino, mejorando la sensibilidad y especificidad del descubrimiento. Utiliza un conjunto de genes compuestos como referencia y aprovechando las relaciones que pueden generarse a largo plazo teniendo un significado único. Mediante el uso de estadística *Kappa* se puede condensar y organizar los datos heterogéneos, permitiendo un análisis de enriquecimiento progresivo centrando la red en un gen de interés. Sin embargo, su limitación es que los genes huérfanos podrían quedar fuera del análisis (Carnielli, Winck, & Paes Leme, 2015).

3. Capítulo III. Diseño experimental

En el presente estudio se identificó el posible mecanismo de acción que siguen algunos compuestos bioactivos de la miel. El diagrama de flujo de nuestra metodología general se muestra en la Figura 3. Se utilizaron varios servidores de *target fishing* para determinar qué dianas estaban relacionadas con cada uno de los compuestos. Se emplearon tres servidores distintos de *target fishing*. Una vez obtenidos los resultados de cada servidor, se realizó una normalización de los datos para que estuvieran en un mismo formato, para obtener una lista final de dianas a las que los compuestos estuvieran dirigidos. Posteriormente, se realizó

un análisis de enriquecimiento y la construcción de la red metabólica para finalmente determinar el posible mecanismo de acción de los compuestos bioactivos de la miel para ejercer un efecto antioxidante.

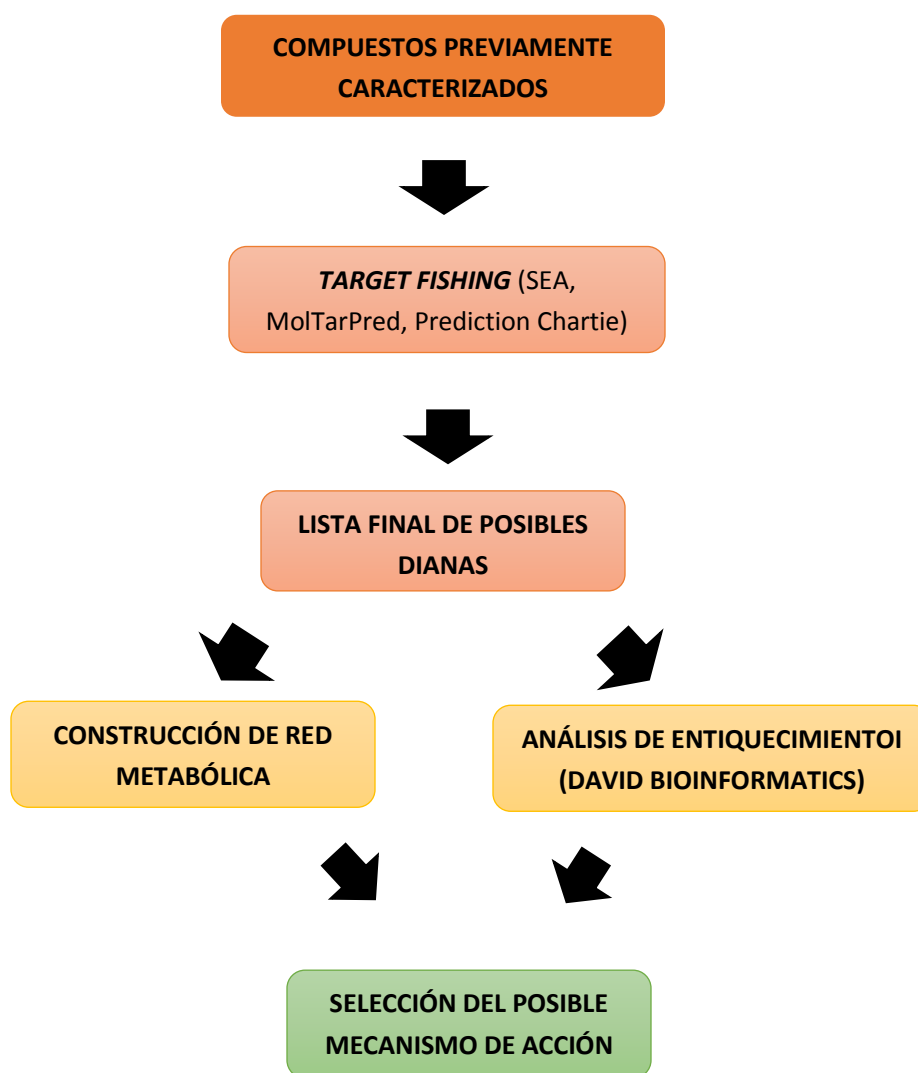


Figura 3. Diagrama de flujo del diseño experimental.

De la lista de posibles dianas se realizó un análisis de enriquecimiento mediante el servidor *David Bioinformatics* (Huang, Sherman, & Lempicki, 2009) para conocer los genes que se encuentran agrupados o se relacionan entre sí en distintas vías. Paralelamente también se realizó un análisis de integración de redes metabólicas usando el RSpider (Antonov A.V., Schmidt E., Dietmann S., Krestyaninova M., 2010). Esto nos permitió determinar las vías más enriquecidas de acuerdo con la determinación en conjunto de la cantidad de genes que se relacionaban mediante la misma vía, es decir actuaban en conjunto. Una vez obtenido dicho resultado se realizó un análisis de toda la red metabólica donde estaban presentes las dianas predichas y poder determinar un posible mecanismo de acción antioxidante que siguen los compuestos bioactivos de la miel.

4. Capítulo IV. Procedimientos

4.1 Determinación de compuestos bioactivos de la miel.

En el presente estudio se utilizó una lista de compuestos bioactivos de la miel (Tabla 1), obtenidos de la caracterización de mieles como Black mongrove, christmas vine, linen vine, Manuka, morning glory y singing vean.

Tabla 1.

Compuestos bioactivos de la miel.

COMPUESTOS BIOACTIVOS	
1.- 8-Methoxykaempferol	14.-Kaempferol
2.- Ácido caféico	15.-Kaempferol 7-O-rhamnoside
3.- Ácido fenilactico	16.-Lepstosin
4.- Ácido ferulico	17.-Luteolin
5.- Ácido p-cumárico	18.-Metil sirignato
6.- Ácido sirínigico	19.-Metil quercetin
7.- Ácido vanílico	20.-Myricetin
8.- Chrysin	21.-Pelargonidin 3-rhamnoside
9.- Cianidin 3-rhamnoside	22.-Pinobaskin
10.- Floroglucinol	23.-Pinocembrin
11.-Galangin	24.-Quercetin
12.- Hesperetin	25.-Quercetin 3-4' diglucoside
13.-Isorhamnetin	26.-Quercetin 3-O-rhamnoside

Tomado de (Alvarez-Suarez, J. M., Giampieri, F., Cordero, M., Gasparrini, M., Forbes-Hernández, T. Y., Mazzoni, L., ... Battino, M. 2016).

4.2 Target Fishing

Para determinar las dianas a las cuales está dirigido cada uno de los 26 compuestos (Tabla 1), se utilizaron las siguientes herramientas para *Target fishing*: SEA (Keiser et al., 2007), MoltraPred (Peón, A.; Naulaerts, S.; Ballester, 2017) y PredictionCharite (Nickel J., Gohlke B.-O., Ehreman J., Banerjee P., Rong W.W., Goede A., n.d.). Todas las herramientas fueron utilizadas con el sistema simplificado de entrada en línea (SMILES) el cual es una notación utilizada para la descripción de estructuras químicas que permiten la conversión de la estructura de forma bidimensional y tridimensional.

4.2.1 Similarity ensemble approach (SEA)

La herramienta SEA utiliza el enfoque del conjunto de similitud, el cual permite relacionar proteínas basándose en la similitud química. Identificando la similitud que existen entre sus ligandos, hasta la construcción de mapas de similitud que exista entre las dianas.

Una de las maneras de comprender un mecanismo de acción y la relación entre las proteínas involucradas en él es por medio de la comparación de las dianas biológicas de cada uno. Basándose en la química de sus ligandos, en donde se puede encontrar que dos moléculas pueden contener propiedades similares, por lo que estarán unidas al mismo grupo proteico. Sin embargo, si se da un pequeño cambio en la estructura química del ligando, la afinidad química de unión es drásticamente diferente.

De esta manera al encontrar la similitud química entre los ligandos de las moléculas se pueden relacionar las dianas sobre las que actúa o que están involucradas en su mecanismo de acción. Esto permite un gran avance en la ciencia al poder evaluar la farmacabilidad de los objetivos a los cuales se dirige cada proteína.

En el enfoque de conjunto de similitud (SEA), se utilizan dos conjuntos de ligandos que se consideran como similares. Partiendo de una base de datos de 65.000 ligandos que han sido conocidos como objetivos de fármacos. Este método permite crear un vínculo entre cientos de ligandos que se encuentran, y determinar las relaciones, orígenes y posible importancia de la relación entre cada objetivo (Keiser et al., 2007).

4.2.2 MolTarPred

MolTarPred es una herramienta web que permite la predicción de dianas utilizando las moléculas en formato de SMILES. Esta plataforma utiliza las similitudes de Tanimoto, haciendo uso de huellas dactilares Morgan dentro de los 607.659 compuestos que están disponibles en ChEMBL. Las dianas que se obtengan serán las diez moléculas más similares a la molécula en consulta. Los resultados que arroja serán de las dianas predichas, el nombre de cada una de ellas, el organismo al que pertenece y el puntaje de confianza, mientras mayor sea dicho puntaje habrá más probabilidad de que la diana predicha sea la molécula de consulta. (Peón, A.; Naulaerts, S.; Ballester, 2017)

4.2.3 Prediction Charite

Esta herramienta utiliza el principio de similitud. En donde se emplean similitudes 2D donde se puedan encontrar descriptores topológicos de huellas dactilares de cada compuesto. Aunque estas huellas son ampliamente utilizadas para aplicaciones como el tamizado virtual, pueden presentarse problemas como en el tamaño de moléculas de los compuestos, los cuales pueden afectar los cálculos de similitud. Por esta razón, es que esta herramienta no solo considera las similitudes 2D (Figura. 2), sino que también hace uso de las similitudes 3D que se dan entre los compuestos utilizando un enfoque de interacción químico-químico.

La predicción de las dianas para cada compuesto se basa en la distribución de similitud que existe entre los ligandos de cada una de las dianas. Estas distribuciones son utilizadas para calcular las posibilidades individuales que presentará cada objetivo. Los compuestos de interés se analizaran en una base de datos que contiene 1.800 proteínas, 341.000 compuestos y 66.500 interacciones específicas para cada compuesto.(Nickel et al., 2014)

4.3 Redes de Interacción metabólica

4.3.1 RSpider

RSpider (Antonov A.V., Schmidt E., Dietmann S., Krestyaninova M., 2010) analiza una lista de genes utilizando referencias ya conocidas de una red genética global que se construye mediante vías metabólicas y vías de señalización de las bases

de datos KEGG (Kanehisa, Furumichi, Tanabe, Sato, & Morishima, 2017) y Reactome con una red integral de alrededor 4000 genes y 50000 interacciones. Esta herramienta reconstruye una ruta metabólica unificada tomando como base una lista de genes según tres abordajes: 1) modelo simplificado sin adición de proteínas externas a la lista, 2) modelo ampliado con posibilidad de adición de una sola proteína por interacción y 3) modelo de mayor cobertura donde se posibilita la adición de dos proteínas por pares de interacción introducidos en la lista inicial.

Cada una de las redes en estos tres modelos es comparada con la posibilidad de formar una red semejante en una lista aleatoria. De esta forma si el *valor p* es menor de 0.05 se considera que la red metabólica obtenida es significativamente diferente de una generada de forma aleatoria.

4.4 Análisis de enriquecimiento

4.4.1 David Bioinformatic resources

David Bioinformatic (Huang, Sherman, & Lempicki, 2009) es una base de datos para anotación, visualización y de descubrimiento de rutas metabólicas integradas. Esta herramienta proporciona, entre otras cosas, una metodología para el análisis de enriquecimiento de una lista de genes en donde se puede determinar:

- Enriquecimiento biológico, de *gene ontology* (GO)
- Enriquecimiento biológico, de *rutas metabólicas*

5. Capítulo V. Resultados y discusión

Predicción de posibles dianas y análisis de enriquecimiento bioinformático

Con el uso de *target fishing* se predijeron los targets o dianas que estarían vinculadas con cada uno de los 26 compuestos que han sido identificados como elementos bioactivos de la miel (Tabla 6, Anexos). Los resultados de la Figura 4, indican que las predicciones con la primera herramienta SEA anotan un total de 457 dianas moleculares distintas compartidas entre los compuestos. La segunda herramienta MolTarPred identifica un total de 175 targets y la herramienta Prediction Charite identifica 111 dianas. El resultado de los targets en común que fueron predichos por los tres métodos fue de 60. Este número de predicciones comunes es bajo lo que puede deberse a que los servidores utilizados para el *target fishing* de hecho siguen abordajes diferentes en sus predicciones.

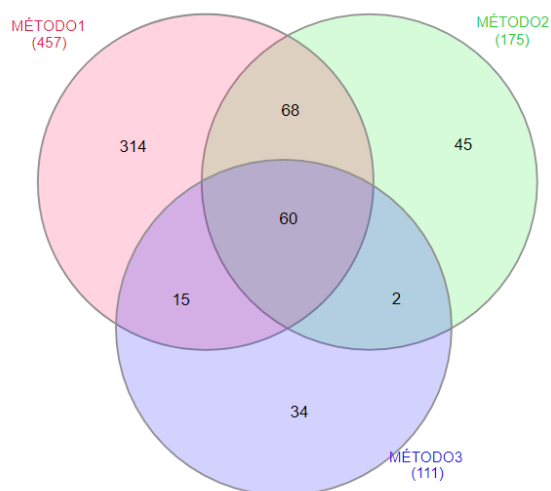


Figura 4. Target Fisghing.

Tomado de (Gong, Waris, Tanveer, & Siddiqui, 2001).

Partiendo del análisis de enriquecimiento de ontología genética se obtuvieron todos los procesos biológicos que se observan en la Tabla 5 de los Anexos. Para simplificar este espacio se utilizó la herramienta REVIGO (Supek, Bošnjak, Škunca, & Šmuc, 2011) que toma largas listas de términos de ontología genética (GO) y los resume, eliminando los términos de GO que son redundantes (Supek, Bošnjak, Škunca, & Šmuc, 2011). Estos grupos pueden resumirse en: respuesta a droga, desmontaje de la matriz extracelular, fosforilación de proteínas y envejecimiento (Figura 5).

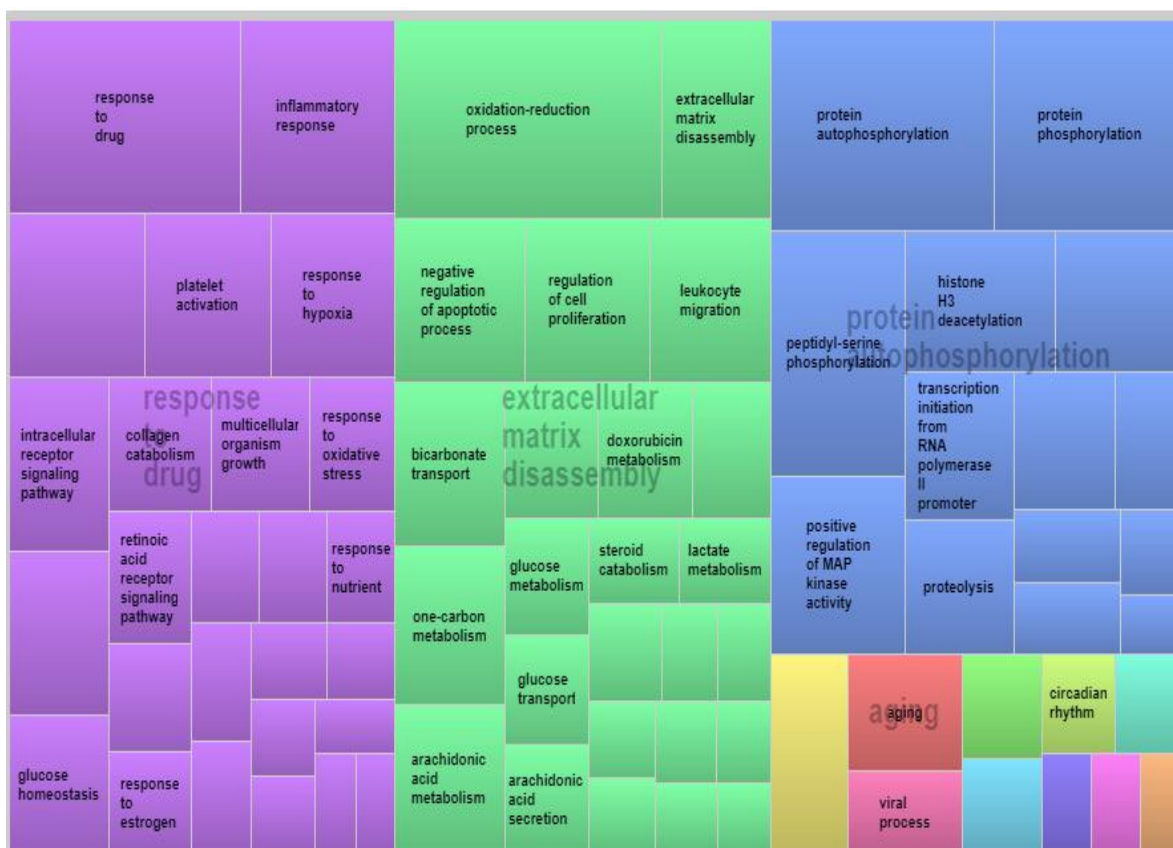


Figura 5. Diagrama de ontología genética

Tomado de (Supek, F., Bošnjak, M., Škunca, N., & Šmuc, T. 2011).

Nota: Una base datos que condensa la información permitiendo obtener los procesos más relevantes al agruparlos. se puede observar que nuestros datos se agrupan en cuatro procesos generales: respuesta a drogas; en donde encontramos la respuesta inflamatoria, respuesta a la hipoxia y respuesta al estrés oxidativo.

Dentro de estos grandes grupos encontramos procesos biológicos que lógicamente se relacionan con el estrés oxidativo como respuesta a la hipoxia, respuesta al estrés oxidativo y procesos de óxido-reducción. Sin embargo, procesos biológicos como respuesta a drogas, metabolismos del ácido araquidónico, respuesta inflamatoria, y procesos virales también son de interés para nuestro estudio.

Estos procesos biológicos como la respuesta a drogas, han sido estudiados con respecto al estrés oxidativo como lo indica (Deavall, Martin, Horner, & Roberts, 2012) en donde el estrés oxidativo inducido por fármacos se encuentra implicado en la toxicidad de varios tejidos. Esto puede deberse a que un medicamento puede generar un intermediario reactivo y reducir el oxígeno molecular hasta la formación de ROS. Este mecanismo se ha visto en varios medicamentos como la Doxorubicina que su reducción de un electrón por medio de reductasas mitocondriales podría generar radicales libres como semiquinona y antraquinona. Ambos son inestables bajo condiciones aeróbicas por lo que pueden reducir fácilmente al oxígeno molecular en ROS. Otra de las posibles vías de inducir el estrés oxidativo también es las reacciones del medicamento con hierro III que podrían generar el radical libre hierro II, que es capaz de reducir el oxígeno molecular. Este aumento de radicales libres conduce a un desequilibrio energético y alteraciones en la función mitocondrial que conlleva a la activación de vías de señalización como la p38, que resulta en la acumulación de p53 y finalmente la muerte celular.

Otro de los procesos biológicos determinados han sido los procesos virales, como lo indica (Gong, Waris, Tanveer, & Siddiqui, 2001), ya que varias proteínas no estructurales de virus se encuentran asociadas a la membrana celular como por ejemplo el componente ribonucleoproteína NS5A del virus de la hepatitis C. Ya que los virus de ARN viral se replican principalmente en el retículo endoplasmático (ER), esto podría llevar a la producción de ROS en ER que es vinculado con el Ca²⁺. La liberación de Ca²⁺ desde ER que es absorbida por las mitocondrias afecta al potencial transmembranal induciendo estrés oxidativo. Varios estudios han demostrado que con la liberación de calcio se desarrolla la producción de ROS. Este mecanismo por el cual NS5A induce el estrés oxidativo se da por la activación de NF- κ B y STAT-3 como proteínas no estructurales que conducen a la alteración de Ca²⁺ que, al ser liberados en respuesta a estímulos, se transfieren a la matriz mitocondrial lo que induce en el estrés oxidativo al elevar los niveles de ROS.

También se ha asociado el metabolismo del ácido araquidónico y la respuesta inflamatoria con el estrés oxidativo como lo indica (Pompeia, Freitas, Kim, Zyngier, & Curi, n.d.) Esta relación se identificó al evaluar la apoptosis en leucocitos que produce el ácido araquidónico (AA), que genera una modelación en las respuestas inmunes e inflamatorias, este efecto se da por una disminución en la reducción de los niveles de glutatión que se asocia a la peroxidación lipídica. Se cree que esto podía ser debido a la peroxidación del AA o la producción de superóxido que induce el AA desencadenaría el estrés oxidativo.

También se ha observado que las muertes celulares inducidas por AA se observan en la acumulación de granulaciones, en donde se han visto implicadas varias proteínas como COX, 5- α , 15-lipoxigenasa, LTB₄ sintasa, proteína activadora de 5-lipoxigenasa (FLAP), proteína quinasas activada (MAP quinasas) y fosfolipasa A₂.

Cuando el AA se acumula y se incorpora a los cuerpos lipídicos se genera una concentración intracelular muy alta de proteínas citotóxicas por la peroxidación lipídica.

Así también se ha considerado la relación del ácido araquidónico (AA) con el estrés oxidativo por medio de la modificación oxidativa de fosfolípidos que altera la señalización celular. Debido a que en su mayoría los ácidos grasos poli e insaturados se esterifican en la posición sn-2 de fosfolípidos, la peroxidación lipídica ocurre en su mayoría en esta posición siendo el objetivo para la fosfolipasa A2 (PLA2). Sin embargo, la peroxidación de la membrana y el estrés oxidativo se ha demostrado como potenciadores para PLA2 que dan respuesta a mediadores como el AA.

Con esto observamos que los procesos biológicos que se han obtenido reflejan procesos asociados con el estrés oxidativo. Este tipo de validación confirma que al menos el espacio de las dianas predichas es consecuente con los conocimientos que tenemos de las mieles y su relación con el estrés oxidativo.

También se evaluó el enriquecimiento de rutas metabólicas tomando como partida la información contenida en el KEGG que es una colección de varias rutas metabólicas, como se observa en la tabla 1.

Tabla 2.

Rutas metabólicas

Nota: Obsérvese las rutas metabólicas en las cuales convergen los targets u objetivos predichos, ordenados de acuerdo con su valor p para determinar la

significancia de cada una de las rutas. así determinando todas las posibles rutas en las cuales los objetivos desencadenan una función.

RUTAS METABÓLICAS, KEGG VALOR-P	
hsa04066:HIF-1 vía de señalización	1.07E-07
hsa00910:Metabolismo del Nitrógeno	1.87E-07
hsa04931:Resistencia a la insulina	1.01E-06
hsa00590:Metabolismo del ácido araquidónico	5.35E-06
hsa04520: Unión adherente	5.62E-05
hsa04012: Vía de señalización de ErbB	5.95E-05
hsa04024: Vía de señalización de cAMP	2.02E-04
hsa00140: Biosíntesis de hormonas esteroideas	5.78E-04
hsa04660: Vía de señalización del receptor celular T.	1.12E-03
hsa04370: Vía de señalización de VEGF	1.17E-03
hsa04014: Vía de señalización de Ras	1.31E-03

hsa04920: Vía de señalización de Adipocitoquina	1.47E-03
hsa04151: Vía de señalización de PI3K-Akt	1.72E-03
hsa00350: Metabolismo de la tirosina	2.50E-03
hsa00591: Metabolismo del ácido linoleico	2.84E-03
hsa04722: Vía de señalización de Neurotrofin	1.31E-02
hsa04913: Esteroidogenesis Ovárica	1.54E-02
hsa03320: PPAR vía de señalización,	2.10E-02
hsa04750: mediador de la regulación antiinflamatoria por los canales de TRP.	3.57E-02
hsa04080: Interacción neuro activa ligando-receptor.	3.96E-02
hsa04210: Apoptosis	4.05E-02
hsa04917: Vía de señalización de prolactina.	4.20E-02

Tomado de (Antonov A.V., Schmidt E., Dietmann S., Krestyaninova M., 2010)

Como se indicó antes, algunas rutas metabólicas como metabolismo del ácido araquidónico, mediadores inflamatorios, HIF1 y rutas de apoptosis tienen relación

con lo que se ha mencionado antes. La ruta del metabolismo del nitrógeno también se ha asociado con el estrés oxidativo como lo indica (Koskenkorva-Frank, Weiss, Koppenol, & Burckhardt, 2013), ya que mediante esta vía se forman especies reactivas como el radical super oxido y el óxido nítrico.

Otra de las rutas relacionadas con el estrés oxidativo es la síntesis del ácido linoleico porque este aumenta la síntesis del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), por vías de activación como la PKC-beta que aumenta la secreción de VEGF desencadenando en ROS (Doronzo et al., 2013).

También se relaciona al estrés oxidativo con la ruta de señalización de HIF-1 por hipoxia, que al igual que el receptor de insulina AKT inducen varios genes glucolíticos.

Como se conoce, la hipoxia induce al estrés oxidativo, por lo que su control contribuiría a varios procesos así se ha indicado que la miel puede ayudar a combatirlo ya que algunos compuestos de la miel inducen en dianas en donde se encuentran implicados varios genes glucolíticos que podrían aumentar el glucolisis y la producción energética para controlar el estrés oxidativo (Papandreou, Cairns, Fontana, Lim, & Denko, 2006).

La ruta de la resistencia a la insulina, también se ha relacionado con ROS ya que involucra a la vía de la proteína quinasa AMPK que tiene la función de señalización molecular y actúa con sensores como el TXNIP.

TXNIP, es un sensor de nutrientes que puede controlar la homeostasis. Por lo que es importante en la respuesta a nutrientes. Además, TXNIP juega un papel importante al activar la pro-interleucina-1 β (pro-IL-1 β) que juega un papel clave en la resistencia a la insulina y la homeostasis energética.

- **Integración metabólica**

Para la determinación de una red metabólica integral se utilizó RSpider. El resultado de cada una de las tres redes obtenidas se muestra en la Tabla 3. Como podemos observar, los tres modelos son significativamente diferentes de posibles redes aleatorias. El modelo 1 corresponde con la red más simple posible dado el conjunto de proteínas iniciales. Esta red es la más fácil de interpretar y se muestra en la Figura 6. En este modelo 1 solo se consideran las proteínas iniciales (aquellas derivadas del *target fishing*) mientras que en el modelo 3 se adicionan hasta un máximo de 2 genes adicionales por cada par de interacciones posibilitando así conectar rutas metabólicas distantes.

Tabla 3.

Tabla de 3 modelos de redes metabólicas.

Nota: Se determina la mínima red metabólica mediante tres modelos que agrupan distintas cantidades de genes que se relacionan entre sí.

RED METABÓLICA RSPIDER		
Modelo	Número de genes	Valor p
1	60	<0.005
2	193	<0.005

Tomado de (Antonov A.V., Schmidt E., Dietmann S., Krestyaninova M., 2010).

De la Tabla 1 de rutas metabólicas, podemos observar que existen varios posibles mecanismos de acción como el metabolismo del ácido araquidónico, la biosíntesis

de hormonas esteroideas, metabolismo del nitrógeno, entre otras. Sin embargo, como observamos en la Figura 6, encontramos varias dianas interconectadas entre sí por distintas vías metabólicas por lo que no solo se encuentra un mecanismo de acción que sigan los compuestos de la miel para cumplir su papel antioxidante. Hay varios posibles mecanismos y algunos de ellos pueden estar interconectados. La Figura 6 claramente está sobre-representada en el metabolismo lipídico lo cual indicaría que es esta una vía primordial incluyendo el metabolismo de esteroide y el ácido araquidónico.

Como podemos ver el ácido araquidónico está conectado como metabolito con varias proteínas que a su vez son blancos de algunas de las moléculas que componen la miel. Esta actividad podría causar una disminución de la producción de AA o en su acumulación, disminuyendo su toxicidad que lleva a la peroxidación lipídica. Este mismo efecto también puede disminuir la respuesta inflamatoria por disminución de la síntesis de eicosanoides. Recordemos que este ácido es un derivado del linoleico que es un aceite esencial en los humanos. Este análisis y la unión con algunas rutas esteroideas puede ser una de las rutas principales que expliquen el efecto antioxidante de algunos de los compuestos de las mieles.

A pesar de que la red metabólica del modelo 1 es más simple de explicar, la del modelo 3 contiene mucha más información. En nuestro caso prestamos especial atención a los metabolitos que derivan de este proceso de integración ya que no constituyen elementos de nuestra predicción inicial y adicionalmente pueden servir como formas de validaciones futuras por medios experimentales. Los metabolitos presentes en ambos modelos 1 y 3 se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4.

Metabolitos obtenidos de la red 1 y 3 con RSpider.

METABOLITOS OBTENIDOS PARA EL MODELO 1 y 3	
3alfa,21-Dihidroxi-5beta-pregnano-11,20-diona	Complejo de poro nuclear (NPC)
1,2-Dihidronaftaleno-1,2-diol)	Citalopram_aldehido
4-Acetamidobutanal	Mercaptopurine
6-Tioinosina-5'-monofosfato;	Endoxifen
3,4-Dihydroxyfenylethyleneglycol)	(1R,2S)-Nafthalene 1,2-oxide
Demetilcitalopram	Leucotrieno A4 (LTA4)
11beta-Hidroxiandrost-4-ene-3,17-dione	Retinal
Trigliceridos	Linolato
11beta,17beta-Dihidroxi-4-androsten-3-one	1-Metillxantina
Be-4,5-oxide	S-Metilmalonato semialdehido
Prostaglandina G2 (PGG2)	SN-38
Benoprieno	Glutation (GSH)
16alfa-Hidroxiestrone	Metilmalonato

3,4-Dihidroximandelaldehído;	Araquidonato
Androstanolona	3-Aminopropanal
Irinotecan	Arterenol

Tomado de (Alvarez-Suarez, J. M., Giampieri, F., Cordero, M., Gasparrini, M., Forbes-Hernández, T. Y., Mazzoni, L., Battino, M, 2016).

Dentro de estos metabolitos encontramos que se asocian principalmente a dos vías metabólicas, que son la respuesta a xenobióticos por el citocromo p-450. Las enzimas del citocromo P450 son monooxigenasas terminales que pertenecen a varias familias de genes que se localizan en distintos lugares como el citosol y la mitocondria. La importancia de dichas enzimas viene dada porque actúan como catalizadores de los metabolitos de medicamentos, y muchas veces aceptan compuestos que resultan ser tóxicos para la célula, y al aumentar su toxicidad empiezan a surgir ROS (Salin Raj et al., 2014).

Uno de los metabolitos encontrados son los ácidos grasos y los triglicéridos que en varios estudios se ha determinado su relación con el estrés oxidativo. Como lo indica (Lee, Ellis, & Wolfgang, 2015) el nivel de radicales libres se incrementa cuando la cantidad de grasa en los tejidos aumenta, desencadenando varias enfermedades como la diabetes tipo 2 y enfermedades cardiovasculares. Al producirse radicales libres llega a promover la resistencia a la insulina, una vía que ya se ha descrito antes que juega un papel importante en el equilibrio redox de las células que genera ROS y su acumulación desencadena en estrés oxidativo afectando a toda la célula. También al aumentar la cantidad de adipocitos es

requerida la oxidación de ácidos grasos para la producción de energía, por lo tanto, un desequilibrio en esta oxidación afectaría en todo el equilibrio.

También se ha encontrado metabolitos como 6-Thioinosine-5'-monofosphate que es utilizado para tratamiento de varias enfermedades como la leucemia. Este metabolito está involucrado en el metabolismo de trifosfato de inosina, que ayuda a la prevención de la acumulación de xenobióticos. Esta vía que se ha visto muy relacionada al estrés oxidativo ya que causa toxicidad. Así también es el caso de Demethylcitalopram, que se ha visto que produce efectos tóxicos elevando la cantidad de ROS por la toxicidad producida a nivel de la mitocondria (Ahmadian et al., 2017).

Otro de los metabolitos conocidos es el Benzopireno, en el cual pueden actuar algunos polifenoles como lo ha descrito (Omidian, Rafiei, & Bandy, 2017) induciendo el estrés oxidativo. Este control de los polifenoles se ha visto demostrado al inhibir el aumento de TNF- α que en condiciones de estrés o inflamación su expresión aumenta. También se ha visto relacionada a 16alfa-Hydroxyestrone con el estrés oxidativo mediante la disfunción del NADF que cuplé un papel importante en el intercambio de electrones (Harvey et al., n.d.) .

Por otro lado, es interesante el papel del araquidonato ya que puede estar involucrado también en respuestas hormonales, así como lo indica (Walters et al., 2018).

Una de las causas de infertilidad masculina es la defectuosa función de los espermatozoides, ya que la peroxidación lipídica en la membrana del esperma

genera aldehídos citotóxicos como 4-hidroxinonenal, que estimula a la producción de ROS causando daño celular.

Se ha visto que una de las células involucradas en el proceso anterior es la del araquidonato 15 lipoxigenasa (ALOX15) que se ha demostrado que tiene una relación directa con los compuestos citotóxicos de la membrana celular y los niveles de estrés oxidativo; por lo que un inhibidor de esta molécula sería de gran importancia también en temas de infertilidad.

Todas estas validaciones o conexiones entre los metabolitos encontrados y diversos mecanismos de estrés oxidativo sugieren que hay varias rutas posibles. Recordemos que estos metabolitos aparecen como consecuencia de nuestro análisis metabólico por tanto constituyen puntos de predicción metabólica que tienen sentido con la información científica asociada a sus efectos en los procesos oxidativos.

6. Conclusiones y recomendaciones

6.1 Conclusiones

Con la herramienta de *target fishing* es posible determinar un gran número de dianas que se relacionan con compuestos de interés, lo que permite ampliar la visión sobre mecanismos que pueden ejercer ciertos compuestos tanto directa como indirectamente.

El análisis de enriquecimiento nos permite observar de manera integrativa los procesos biológicos y las rutas metabólicas en donde varias dianas están presentes. Nuestros resultados prueban que las dianas predichas guardan relación con procesos biológicos y rutas metabólicas que sabemos tienen relación con el estrés oxidativo.

Encontramos que las dianas predichas se pueden involucrar en varias rutas metabólicas en donde se destacan la del ácido araquidónico, y su conexión con el metabolismo lipídico en general e incluso el metabolismo de hormonas esteroidales.

Para actuar como antioxidante, la miel sigue sin dudas varias rutas metabólicas algunas de las cuales pueden estar conectadas entre sí. Esto es una consecuencia directa de su composición químicamente diversa. Sin embargo, nuestros resultados parecen indicar que al menos una de las rutas principales se debe al metabolismo del ácido araquidónico en donde se podría potencialmente

disminuir el estrés oxidativo e incluso explicar otros efectos como el antiinflamatorio. No obstante, es necesario continuar las investigaciones tanto a nivel experimental como *in-silico* para evaluar de forma más específica la participación de estas rutas y cuáles de las moléculas de la miel presenta su mayor afinidad.

6.2 Recomendaciones

Se recomienda hacer un análisis *in-silico* de las interacciones ligando-proteína específicamente en los candidatos relacionados con el ácido araquidónico.

También se recomienda la evaluación experimental de algunos de los metabolitos reportados y de algunas de las proteínas reportadas dentro y fuera del metabolismo lipídico para establecer las conexiones por ejemplo con el metabolismo del nitrógeno (Ahmadian et al., 2017).

Es importante que cada ensayo siguiente se realice utilizando esta previa información para lograr obtener mejores resultados en trabajos experimentales.

REFERENCIAS

- Ahmadian, E., Eftekhari, A., Fard, J. K., Babaei, H., Nayebi, A. M., Mohammadnejad, D., & Eghbal, M. A. (2017). In vitro and in vivo evaluation of the mechanisms of citalopram-induced hepatotoxicity. *Archives of Pharmacal Research*, 40(11), 1296–1313. <https://doi.org/10.1007/s12272-016-0766-0>
- Al-Mamary, M., Al-Meer, A., & Al-Habori, M. (2002). Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. *Nutrition Research*, 22(9), 1041–1047. [https://doi.org/10.1016/S0271-5317\(02\)00406-2](https://doi.org/10.1016/S0271-5317(02)00406-2)
- Al-Shahrour, F., Minguéz, P., Tárraga, J., Medina, I., Alloza, E., Montaner, D., & Dopazo, J. (2007). FatiGO+: a functional profiling tool for genomic data. Integration of functional annotation, regulatory motifs and interaction data with microarray experiments. *Nucleic Acids Research*, 35(suppl_2), W91–W96. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm260>
- Aliyu, M., Odunola, O. A., Farooq, A. D., Rasheed, H., Mesaik, A. M., Choudhary, M. I., ... Erukainure, O. L. (2013). Molecular Mechanism of Antiproliferation Potential of *Acacia* Honey on NCI-H460 Cell Line. *Nutrition and Cancer*, 65(2), 296–304. <https://doi.org/10.1080/01635581.2013.756920>
- Alvarez-Suarez, J. M., Giampieri, F., Cordero, M., Gasparrini, M., Forbes-Hernández, T. Y., Mazzoni, L., ... Battino, M. (2016). Activation of AMPK/Nrf2 signalling by Manuka honey protects human dermal fibroblasts against oxidative damage by improving antioxidant response and mitochondrial function promoting wound healing. *Journal of Functional Foods*, 25, 38–49. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2016.05.008>
- and, M. J. M., & Muskal*, S. M. (1999). Pharmacophore Fingerprinting. 1. Application to QSAR and Focused Library Design. <https://doi.org/10.1021/CI980159J>

- Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J. M., ... Sherlock, G. (2000). Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nature Genetics*, 25(1), 25–29. <https://doi.org/10.1038/75556>
- Blass, B. E. (n.d.). *Basic principles of drug discovery and development*.
- Carnielli, C. M., Winck, F. V., & Paes Leme, A. F. (2015). Functional annotation and biological interpretation of proteomics data. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1854(1), 46–54. <https://doi.org/10.1016/J.BBAPAP.2014.10.019>
- Cereto-Massagué, A., Ojeda, M. J., Valls, C., Mulero, M., Pujadas, G., & Garcia-Vallve, S. (2015). Tools for in silico target fishing. *Methods*, 71, 98–103. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2014.09.006>
- Choudhury, F. K., Rivero, R. M., Blumwald, E., & Mittler, R. (2017). Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. *The Plant Journal*, 90(5), 856–867. <https://doi.org/10.1111/tpj.13299>
- Deavall, D. G., Martin, E. A., Horner, J. M., & Roberts, R. (2012). Drug-induced oxidative stress and toxicity. *Journal of Toxicology*, 2012, 645460. <https://doi.org/10.1155/2012/645460>
- Doranzo, G., Viretto, M., Barale, C., Russo, I., Mattiello, L., Anfossi, G., & Trovati, M. (2013). Oleic acid increases synthesis and secretion of VEGF in rat vascular smooth muscle cells: role of oxidative stress and impairment in obesity. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(9), 18861–18880. <https://doi.org/10.3390/ijms140918861>
- Farman, M., Calie, P., Jaromczyk, J., Jaromczyk, J., Moore, N., Harris, D., & Schardl, C. (2014). An adaptive landscape for training in the essentials of next gen sequencing data acquisition and bioinformatic analysis. *BMC Bioinformatics*, 15(10), 40546. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-15-S10-P25>
- Fradera, X., & Babaoglu, K. (2017). Overview of Methods and Strategies for Conducting Virtual Small Molecule Screening. In *Current Protocols in Chemical Biology* (Vol. 9, pp. 196–212). Hoboken, NJ, USA: John Wiley

- & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/cpch.27>
- Gaulton, A., Hersey, A., Nowotka, M., Bento, A. P., Chambers, J., Mendez, D., ... Leach, A. R. (2017). The ChEMBL database in 2017. *Nucleic Acids Research*, 45(D1), D945–D954. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1074>
- Gechev, T. S., Hille, J., Woerdenbag, H. J., Benina, M., Mehterov, N., Toneva, V., ... Mueller-Roeber, B. (2014). Natural products from resurrection plants: Potential for medical applications. *Biotechnology Advances*, 32(6), 1091–1101. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.03.005>
- Giampieri, F., Alvarez-Suarez, J. M., Cordero, M. D., Gasparrini, M., Forbes-Hernandez, T. Y., Afrin, S., ... Battino, M. (2017). Strawberry consumption improves aging-associated impairments, mitochondrial biogenesis and functionality through the AMP-activated protein kinase signaling cascade. *Food Chemistry*, 234, 464–471. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.017>
- Gong, G., Waris, G., Tanveer, R., & Siddiqui, A. (2001). Human hepatitis C virus NS5A protein alters intracellular calcium levels, induces oxidative stress, and activates STAT-3 and NF- κ B. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(17), 9599–9604. <https://doi.org/10.1073/pnas.171311298>
- Groves, M. J. (2006). *Pharmaceutical Biotechnology*. *Pharmaceutical Biotechnology*.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (n.d.). *Free radicals in biology and medicine*.
- Harvey, A. P., Nilsen, M., Montezano, A. C., Touyz, R. M., Maclean, M., & Hood, K. Y. (n.d.). 6 α -Hydroxyestrone Increases Oxidative Stress Through NADPH Oxidase 4 And Nrf2 Dysfunction Specifically In Human Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells. Retrieved from <https://search.proquest.com/openview/2f1f64b22d51a5117b14a9d139d7d64b/1?pq-origsite=gscholar&cbl=40575>
- Hosack, D. A., Dennis, G., Sherman, B. T., Lane, H. C., Lempicki, R. A., & Lempicki, R. A. (2003). Identifying biological themes within lists of genes

- with EASE. *Genome Biology*, 4(10), R70. <https://doi.org/10.1186/gb-2003-4-10-r70>
- Huang, D. W., Sherman, B. T., & Lempicki, R. A. (2009). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature Protocols*, 4(1), 44–57. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.211>
- 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>
- Keiser, M. J., Roth, B. L., Armbruster, B. N., Ernsberger, P., Irwin, J. J., & Shoichet, B. K. (2007). Relating protein pharmacology by ligand chemistry. *NATURE BIOTECHNOLOGY*, 25(2). <https://doi.org/10.1038/nbt1284>
- Khatri, P., & Draghici, S. (2005). Ontological analysis of gene expression data: current tools, limitations, and open problems. *Bioinformatics*, 21(18), 3587–3595. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti565>
- Kim, I., & He, Y.-Y. (2013). Targeting the AMP-Activated Protein Kinase for Cancer Prevention and Therapy. *Frontiers in Oncology*, 3. <https://doi.org/10.3389/fonc.2013.00175>
- Koskenkorva-Frank, T. S., Weiss, G., Koppenol, W. H., & Burckhardt, S. (2013). The complex interplay of iron metabolism, reactive oxygen species, and reactive nitrogen species: Insights into the potential of various iron therapies to induce oxidative and nitrosative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 65, 1174–1194. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.09.001>
- Koutsoukas, A., Simms, B., Kirchmair, J., Bond, P. J., Whitmore, A. V., Zimmer, S., ... Bender, A. (2011). From in silico target prediction to multi-target drug design: Current databases, methods and applications. *Journal of Proteomics*, 74(12), 2554–2574.

<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.05.011>

- Kuhn, M., Campillos, M., González, P., Jensen, L. J., & Bork, P. (2008). Large-scale prediction of drug-target relationships. *FEBS Letters*, 582(8), 1283–1290. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.02.024>
- Liao, Q., Sun, X.-Y., Guo, H., & Li, C. (n.d.). Exploring the potential mechanism and screening small molecule drugs for glaucoma by using bioinformatics approach.
- Lim, H., Poleksic, A., Yao, Y., Tong, H., He, D., Zhuang, L., ... Xie, L. (2016). Large-Scale Off-Target Identification Using Fast and Accurate Dual Regularized One-Class Collaborative Filtering and Its Application to Drug Repurposing. *PLOS Computational Biology*, 12(10), e1005135. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005135>
- Liu, X., Xu, Y., Li, S., Wang, Y., Peng, J., Luo, C., ... Jiang, H. (2014). In Silico target fishing: addressing a “Big Data” problem by ligand-based similarity rankings with data fusion. *Journal of Cheminformatics*, 6, 33. <https://doi.org/10.1186/1758-2946-6-33>
- Manuel Morilla, & Francesc Xavier AvilésInstitut. (2017). LA QUIMIOGENÓMICA. Una nueva disciplina postgenómica con aplicaciones biomédicas. Retrieved April 24, 2018, from https://www.institutoroche.es/biotecnologia/16/la_quimiogenomica_una_nueva_disciplina_postgenomica_con_aplicaciones_biomedicas
- Mobarok Ali, A. T. (n.d.). Natural honey exerts its protective effects against ethanol-induced gastric lesions in rats by preventing depletion of glandular nonprotein sulfhydryls. *Tropical Gastroenterology: Official Journal of the Digestive Diseases Foundation*, 16(1), 18–26. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7645050>
- Moniruzzaman, M., Sulaiman, S. A., Khalil, M. I., & Gan, S. H. (2013). Evaluation of physicochemical and antioxidant properties of sourwood and other Malaysian honeys: a comparison with manuka honey. *Chemistry Central Journal*, 7, 138. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-7-138>

- Niaz, K., Maqbool, F., Bahadar, H., & Abdollahi, M. (2017). Health Benefits Of Manuka Honey As An Essential Constituent For Tissue Regeneration. *Current Drug Metabolism*.
<https://doi.org/10.2174/1389200218666170911152240>
- Nickel J., Gohlke B.-O., Ehreman J., Banerjee P., Rong W.W., Goede A., D. M. and P. R. (n.d.). SuperPred webserver. Retrieved June 21, 2018, from <http://prediction.charite.de/index.php?site=home>
- Nickel, J., Gohlke, B.-O., Erehman, J., Banerjee, P., Rong, W. W., Goede, A., ... Preissner, R. (2014). SuperPred: update on drug classification and target prediction. *Nucleic Acids Research*, 42(W1), W26–W31.
<https://doi.org/10.1093/nar/gku477>
- Obaid, A. Y., Voleti, S., Bora, R. S., Hajrah, N. H., Omer, A. M. S., Sabir, J. S. M., & Saini, K. S. (2017). Cheminformatics studies to analyze the therapeutic potential of phytochemicals from *Rhazya stricta*. *Chemistry Central Journal*, 11(1), 11. <https://doi.org/10.1186/s13065-017-0240-1>
- Oda, Y., Nagasu, T., & Chait, B. T. (2001). Enrichment analysis of phosphorylated proteins as a tool for probing the phosphoproteome. *Nature Biotechnology*, 19(4), 379–382. <https://doi.org/10.1038/86783>
- Omidian, K., Rafiei, H., & Bandy, B. (2017). Polyphenol inhibition of benzo[a]pyrene-induced oxidative stress and neoplastic transformation in an in vitro model of carcinogenesis. *Food and Chemical Toxicology*, 106, 165–174. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2017.05.037>
- Osorio, S., & Fernie, A. R. (2013). *Biochemistry of Fruit Ripening. The Molecular Biology and Biochemistry of Fruit Ripening*.
<https://doi.org/10.1002/9781118593714.ch1>
- Papandreou, I., Cairns, R. A., Fontana, L., Lim, A. L., & Denko, N. C. (2006). HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metabolism*, 3(3), 187–197.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.01.012>
- Peón, A.; Naulaerts, S.; Ballester, P. J. (2017). Predicting the Reliability of Drug-

- target Interaction Predictions with Maximum Coverage of Target Space. Retrieved from <http://moltarpred.marseille.inserm.fr/tutorial.pdf>
- Pompeia, C., Freitas, J. J. S., Kim, J. S., Zyngier, S. B., & Curi, R. (n.d.). Arachidonic acid cytotoxicity in leukocytes: implications of oxidative stress and eicosanoid synthesis. Retrieved from <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1016/S0248-4900%2802%2901200-5>
- Real Academia Nacional de Farmacia (Spain), O. M. R., Díaz, Y. H., Vega, J. M. G. de la, Grau, R., Ponce, Y. M., & Monteagudo, M. C. (2002). *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia. Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia* (Vol. 79). Real Academia de Farmacia. Retrieved from <http://www.analesranf.com/index.php/aranf/article/view/1450>
- Rodrigues, F. A. R., Oliveira, A. C. A., Cavalcanti, B. C., Pessoa, C., Pinheiro, A. C., & de Souza, M. V. N. (2014). Biological evaluation of isoniazid derivatives as an anticancer class. *Scientia Pharmaceutica*, 82(1), 21–28. <https://doi.org/10.3797/scipharm.1307-25>
- Saldívar-González, F., Prieto-Martínez, F. D., & Medina-Franco, J. L. (2017). Descubrimiento y desarrollo de fármacos: un enfoque computacional. *Educación Química*, 28(1), 51–58. <https://doi.org/10.1016/J.EQ.2016.06.002>
- Sánchez-Valle, V., & Méndez-Sánchez, N. (2018). Estrés oxidativo, antioxidantes y enfermedad. *Médica Sur*, 20(3), 161–168. Retrieved from <http://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumenI.cgi?IDARTICULO=79284>
- Schomburg, K. T., Bietz, S., Briem, H., Henzler, A. M., Urbaczek, S., & Rarey, M. (2014). Facing the Challenges of Structure-Based Target Prediction by Inverse Virtual Screening. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 54(6), 1676–1686. <https://doi.org/10.1021/ci500130e>
- Supek, F., Bošnjak, M., Škunca, N., & Šmuc, T. (2011). REVIGO Summarizes and

- Visualizes Long Lists of Gene Ontology Terms. *PLoS ONE*, 6(7), e21800. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021800>
- Szklarczyk, D., Franceschini, A., Wyder, S., Forslund, K., Heller, D., Huerta-Cepas, J., ... von Mering, C. (2015). STRING v10: protein–protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Research*, 43(D1), D447–D452. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1003>
- van Laarhoven, T., Nabuurs, S. B., & Marchiori, E. (2011). Gaussian interaction profile kernels for predicting drug–target interaction. *Bioinformatics*, 27(21), 3036–3043. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr500>
- Väremo, L., Nielsen, J., & Nookaew, I. (2013). Enriching the gene set analysis of genome-wide data by incorporating directionality of gene expression and combining statistical hypotheses and methods. *Nucleic Acids Research*, 41(8), 4378–4391. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt111>
- Walters, J. L. H., De Iuliis, G. N., Dun, M. D., Aitken, R. J., McLaughlin, E. A., Nixon, B., & Bromfield, E. G. (2018). Pharmacological inhibition of arachidonate 15-lipoxygenase protects human spermatozoa against oxidative stress†. *Biology of Reproduction*, 98(6), 784–794. <https://doi.org/10.1093/biolre/iory058>
- Wang, K., Sun, J., Zhou, S., Wan, C., Qin, S., Li, C., ... Yang, L. (2013). Prediction of Drug-Target Interactions for Drug Repositioning Only Based on Genomic Expression Similarity. *PLoS Computational Biology*, 9(11), e1003315. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003315>
- Wilson, A. W., & Neumann, P. J. (2012). The cost-effectiveness of biopharmaceuticals, (April), 281–288.
- Zhang, H., & Tsao, R. (2016). Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. *Current Opinion in Food Science*, 8, 33–42. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2016.02.002>

ANEXOS

Tabla 5.

Targets predichos con su ranking.

TARGET PREDICHO Y RANKING							
CAH7_HUMAN	1	MMP13_HUMAN	129	RNH1_HUMAN	257	PA2GA_HUMAN	385
CAH12_HUMAN	2	UBP2_HUMAN	130	IL8_HUMAN	258	HSP7C_HUMAN	386
CP1B1_HUMAN	3	AMD_HUMAN	131	HPSE_HUMAN	259	MMP8_HUMAN	387
ALDR_HUMAN	4	SIAT6_HUMAN	132	ABC3G_HUMAN	260	ADH1B_HUMAN	388
CAH2_HUMAN	5	AHR_HUMAN	133	KDM2A_HUMAN	261	KCC4_HUMAN	389
XDH_HUMAN	6	TSHR_HUMAN	134	KDM6B_HUMAN	262	CDK5_HUMAN	390
CAH1_HUMAN	7	NFKB1_HUMAN	135	TRPV1_HUMAN	263	DAPK3_HUMAN	391
CAH3_HUMAN	8	EST1_HUMAN	136	S29A1_HUMAN	264	MITF_HUMAN	392
ABCG2_HUMAN	9	MYLK_HUMAN	137	ALK_HUMAN	265	HS71A_HUMAN	393
CAH4_HUMAN	10	MDR3_HUMAN	138	KCNK3_HUMAN	266	CDKL5_HUMAN	394
TYDP1_HUMAN	11	PA24B_HUMAN	139	THB_HUMAN	267	FUCO_HUMAN	395
TAU_HUMAN	12	GSK3B_HUMAN	140	CELA1_HUMAN	268	NR4A1_HUMAN	396
MDR1_HUMAN	13	ERR1_HUMAN	141	CC14A_HUMAN	269	CTNB1_HUMAN	397
CAH9_HUMAN	14	TF_HUMAN	142	RBBP9_HUMAN	270	CDK13_HUMAN	398
NOX4_HUMAN	15	EST2_HUMAN	143	MRP2_HUMAN	271	ST32A_HUMAN	399
DPOLB_HUMAN	16	RHOA_HUMAN	144	MRP3_HUMAN	272	RS27_HUMAN	400

CAH5A_HUMAN	17	CSK21_HUMAN	145	NPC1_HUMAN	273	CDK3_HUMAN	401
PDIA1_HUMAN	18	MBNL1_HUMAN	146	S22A3_HUMAN	274	MRCKB_HUMAN	402
CAH13_HUMAN	19	MBNL2_HUMAN	147	ERR2_HUMAN	275	PI51C_HUMAN	403
AK1BA_HUMAN	20	MBNL3_HUMAN	148	HDAC8_HUMAN	276	KC1AL_HUMAN	404
LGUL_HUMAN	21	AA3R_HUMAN	149	CD5R1_HUMAN	277	CDC42_HUMAN	405
KDM4E_HUMAN	22	ALDH2_HUMAN	150	PD2R2_HUMAN	278	NEK2_HUMAN	406
MRP1_HUMAN	23	IGF1R_HUMAN	151	P4HTM_HUMAN	279	KCNQ2_HUMAN	407
CP1A2_HUMAN	24	INSR_HUMAN	152	AOC2_HUMAN	280	AVR2B_HUMAN	408
CAH14_HUMAN	25	KDM3A_HUMAN	153	AMPN_HUMAN	281	NLRP3_HUMAN	409
CBR1_HUMAN	26	MK01_HUMAN	154	GABT_HUMAN	282	DCMC_HUMAN	410
CAH5B_HUMAN	27	KDM4C_HUMAN	155	V2R_HUMAN	283	G6PC_HUMAN	411
LOX5_HUMAN	28	TBB3_HUMAN	156	MMP26_HUMAN	284	DEFM_HUMAN	412
3MG_HUMAN	29	THRB_HUMAN	157	PDE4B_HUMAN	285	KCC2D_HUMAN	413
CAH6_HUMAN	30	P4HA1_HUMAN	158	LMBL1_HUMAN	286	P3C2G_HUMAN	414
DAPK1_HUMAN	31	PE2R2_HUMAN	159	UBP5_HUMAN	287	ST17A_HUMAN	415
CREB1_HUMAN	32	DHCR7_HUMAN	160	CPT1A_HUMAN	288	EGLN1_HUMAN	416
AK1BF_HUMAN	33	PACR_HUMAN	161	DNPEP_HUMAN	289	ESR1_RAT	417
PLGF_HUMAN	34	NEMO_HUMAN	162	AMPL_HUMAN	290	LYAM2_HUMAN	418
DYR1A_HUMAN	35	AK1C2_HUMAN	163	LDHA_HUMAN	291	IMDH2_HUMAN	419
PPAC_HUMAN	36	MIF_HUMAN	164	PIM2_HUMAN	292	CASP7_HUMAN	420
IL2_HUMAN	37	LT4R1_HUMAN	165	S22A6_HUMAN	293	CASP3_HUMAN	421
LOX15_HUMAN	38	ANDR_HUMAN	166	PTN13_HUMAN	294	CMA1_HUMAN	422

NF2L2_HUMAN	39	CISD1_HUMAN	167	TAAR1_HUMAN	295	LPAR1_HUMAN	423
CP1A1_HUMAN	40	G6PT1_HUMAN	168	CPT1B_HUMAN	296	CATL2_HUMAN	424
HCD2_HUMAN	41	IBP3_HUMAN	169	PE2R1_HUMAN	297	CP2CJ_HUMAN	425
P53_HUMAN	42	DUS3_HUMAN	170	PTN22_HUMAN	298	AOC3_HUMAN	426
NMUR2_HUMAN	43	DYN1_HUMAN	171	SENP7_HUMAN	299	GRM3_HUMAN	427
A4_HUMAN	44	IBP1_HUMAN	172	GLR_HUMAN	300	CP2C9_HUMAN	428
LYAG_HUMAN	45	IBP2_HUMAN	173	CD22_HUMAN	301	HGFA_HUMAN	429
AOFA_HUMAN	46	IBP4_HUMAN	174	CHK1_HUMAN	302	EGLN3_HUMAN	430
PPBI_HUMAN	47	IBP6_HUMAN	175	HMOX1_HUMAN	303	FABP4_HUMAN	431
TTHY_HUMAN	48	PE2R4_HUMAN	176	Q9UM81_HUMAN	304	AURKB_HUMAN	432
CDK6_HUMAN	49	EP300_HUMAN	177	NALD2_HUMAN	305	NAAA_HUMAN	433
TOP2A_HUMAN	50	AK1C4_HUMAN	178	P2RX4_HUMAN	306	IMDH1_HUMAN	434
SIAT1_HUMAN	51	DHB3_HUMAN	179	PYGL_HUMAN	307	MGLL_HUMAN	435
KS6A3_HUMAN	52	IBP5_HUMAN	180	MMP15_HUMAN	308	ABHD6_HUMAN	436
CP19A_HUMAN	53	PTN2_HUMAN	181	FABP5_HUMAN	309	HCAR2_HUMAN	437
TBB1_HUMAN	54	FFAR1_HUMAN	182	GGH_HUMAN	310	EAA2_HUMAN	438
HIF1A_HUMAN	55	S5A2_HUMAN	183	NEP_HUMAN	311	FABF_HUMAN	439
LCK_HUMAN	56	PE2R3_HUMAN	184	TLR9_HUMAN	312	RGS8_HUMAN	440
EGFR_HUMAN	57	KCNK9_HUMAN	185	GLSK_HUMAN	313	PPARD_HUMAN	441
ESR1_HUMAN	58	PTN11_HUMAN	186	COMT_HUMAN	314	TSSK2_HUMAN	442
ACES_HUMAN	59	PTN7_HUMAN	187	PTPRG_HUMAN	315	S22A8_HUMAN	443
GPR35_HUMAN	60	AL1A1_HUMAN	188	CBR3_HUMAN	316	XCT_HUMAN	444

NEK6_HUMAN	61	PIM1_HUMAN	189	IF4H_HUMAN	317	SRPK1_HUMAN	445
ULA1_HUMAN	62	PPBN_HUMAN	190	AMPB_HUMAN	318	LPAR2_HUMAN	446
TNKS1_HUMAN	63	NR1H3_HUMAN	191	DUS22_HUMAN	319	AKT1_HUMAN	447
ESR2_HUMAN	64	AA2AR_HUMAN	192	TY3H_HUMAN	320	MET_HUMAN	448
T2R31_HUMAN	65	DOPO_HUMAN	193	SMN_HUMAN	321	DRD4_HUMAN	449
FLT3_HUMAN	66	HDAC2_HUMAN	194	SMAD3_HUMAN	322	HDA10_HUMAN	450
RECQ1_HUMAN	67	KCMA1_HUMAN	195	HDAC9_HUMAN	323	CAN1_HUMAN	451
AMY1_HUMAN	68	NEUR3_HUMAN	196	LYAM3_HUMAN	324	AK1C1_HUMAN	452
ERN1_HUMAN	69	KCC2B_HUMAN	197	BGLR_HUMAN	325	ANO1_HUMAN	453
ADA2C_HUMAN	70	KLF5_HUMAN	198	MYG_HUMAN	326	FKG2_HUMAN	454
APEX1_HUMAN	71	PA24A_HUMAN	199	PSDE_HUMAN	327	KCNA3_HUMAN	455
LMNA_HUMAN	72	SHBG_HUMAN	200	LDHB_HUMAN	328	NR0B1_HUMAN	456
LOX12_HUMAN	73	KSYK_HUMAN	201	S22AC_HUMAN	329	TAOK1_HUMAN	457
MMP9_HUMAN	74	RXRA_HUMAN	202	LRRK2_HUMAN	330	NMDE2_HUMAN	458
TNR1A_HUMAN	75	FOLH1_HUMAN	203	BRSK1_HUMAN	331	KLK7_HUMAN	459
CD38_HUMAN	76	VE6_HP16	204	ERCC5_HUMAN	332	HDAC4_HUMAN	460
S28A3_HUMAN	77	PERM_HUMAN	205	FGF1_HUMAN	333	SGK2_HUMAN	461
MMP2_HUMAN	78	HDAC6_HUMAN	206	LIPL_HUMAN	334	DRD1_HUMAN	462
AK1C3_HUMAN	79	FAK1_HUMAN	207	EAA3_HUMAN	335	UPAR_HUMAN	463
FUT7_HUMAN	80	PA21B_HUMAN	208	DYRK3_HUMAN	336	GSHR_HUMAN	464
CCR4_HUMAN	81	TNFA_HUMAN	209	KMO_HUMAN	337	KC1G3_HUMAN	465
AK1A1_HUMAN	82	CDK2_HUMAN	210	TRPM2_HUMAN	338	FPPS_HUMAN	466

AKCL2_HUMAN	83	CDK4_HUMAN	211	CSK22_HUMAN	339	AMPE_HUMAN	467
MMP1_HUMAN	84	CBPA3_HUMAN	212	DGLA_HUMAN	340	HDAC3_HUMAN	468
HD_HUMAN	85	DHI1_HUMAN	213	RASH_HUMAN	341	KC1G2_HUMAN	469
BACE1_HUMAN	86	PTN9_HUMAN	214	ELAV1_HUMAN	342	TNNT2_HUMAN	470
DCOR_HUMAN	87	PDE5A_HUMAN	215	SC5A7_HUMAN	343	FACE2_HUMAN	471
AA1R_HUMAN	88	ARBK1_HUMAN	216	PPARA_HUMAN	344	STS_HUMAN	472
AOFB_HUMAN	89	CHLE_HUMAN	217	CTRB1_HUMAN	345	FAAH1_HUMAN	473
PTN1_HUMAN	90	ERBB2_HUMAN	218	KS6B2_HUMAN	346	TNNC1_HUMAN	474
TPMT_HUMAN	91	TRY1_HUMAN	219	HDA11_HUMAN	347	PGFRA_HUMAN	475
DHPR_HUMAN	92	UFO_HUMAN	220	FGF2_HUMAN	348	VGFR2_HUMAN	476
PGDH_HUMAN	93	CBPA1_HUMAN	221	FEN1_HUMAN	349	TNNI3_HUMAN	477
NR0B2_HUMAN	94	KDM4B_HUMAN	222	PPAP_HUMAN	350	THAS_HUMAN	478
MMP3_HUMAN	95	KDM4D_HUMAN	223	PPARG_HUMAN	351	PARP1_HUMAN	479
NUAK1_HUMAN	96	SC5A2_HUMAN	224	SC6A5_HUMAN	352	P2RX1_HUMAN	480
TNKS2_HUMAN	97	TOP1_HUMAN	225	HDAC5_HUMAN	353	PK3CG_HUMAN	481
ADA2A_HUMAN	98	RXRB_HUMAN	226	PTPRC_HUMAN	354	PLMN_HUMAN	482
PKN1_HUMAN	99	FTO_HUMAN	227	MMP16_HUMAN	355	KCC2G_HUMAN	483
DHB1_HUMAN	100	LYAM1_HUMAN	228	EBP_HUMAN	356	CFTR_HUMAN	484
AOXA_HUMAN	101	TF65_HUMAN	229	ADH1G_HUMAN	357	CNR2_HUMAN	485
MMP12_HUMAN	102	KDM5C_HUMAN	230	LKHA4_HUMAN	358	CP2D6_HUMAN	486
FUT4_HUMAN	103	PDE4D_HUMAN	231	VRK2_HUMAN	359	CP3A4_HUMAN	487
DHB2_HUMAN	104	GBRR2_HUMAN	232	OXDA_HUMAN	360	ERBB3_HUMAN	488

NQO2_HUMAN	105	MPRI_HUMAN	233	PTN12_HUMAN	361	ERBB4_HUMAN	489
TPO_HUMAN	106	CPT2_HUMAN	234	ABL1_HUMAN	362	FAS_HUMAN	490
GP183_HUMAN	107	THA_HUMAN	235	HDAC7_HUMAN	363	FGFR1_HUMAN	491
RAB9A_HUMAN	108	TOPK_HUMAN	236	HAOX1_HUMAN	364	MTOR_HUMAN	492
RARB_HUMAN	109	SGMR1_HUMAN	237	ACE2_HUMAN	365	FYN_HUMAN	493
6PGD_HUMAN	110	FFAR4_HUMAN	238	ACE_HUMAN	366	KIT_HUMAN	494
TYRO_HUMAN	111	S15A1_HUMAN	239	LIPC_HUMAN	367	LEG3_HUMAN	495
ALR_HUMAN	112	MOT4_HUMAN	240	P85A_HUMAN	368	PK3CA_HUMAN	496
MCL1_HUMAN	113	SC5A1_HUMAN	241	ACRO_HUMAN	369	PK3CB_HUMAN	497
NQO1_HUMAN	114	SSDH_HUMAN	242	MARK4_HUMAN	370	KPYM_HUMAN	498
TERT_HUMAN	115	DYRK4_HUMAN	243	SMO_HUMAN	371	PLK1_HUMAN	499
ADA2B_HUMAN	116	MMP10_HUMAN	244	KYNU_HUMAN	372	KPCE_HUMAN	500
CDK1_HUMAN	117	MMP27_HUMAN	245	RDH8_HUMAN	373	KPCT_HUMAN	501
HCAR3_HUMAN	118	KCNB1_HUMAN	246	1433G_HUMAN	374	SC6A2_HUMAN	502
KDM4A_HUMAN	119	RXRG_HUMAN	247	ERR3_HUMAN	375	SRC_HUMAN	503
CTDS1_HUMAN	120	GSTA1_HUMAN	248	SC5A4_HUMAN	376	STAT3_HUMAN	504
VEGFA_HUMAN	121	CXCR1_HUMAN	249	NAC1_HUMAN	377	STAT6_HUMAN	505
SYK_HUMAN	122	F263_HUMAN	250	MAK_HUMAN	378	YES_HUMAN	506
RARA_HUMAN	123	UBP4_HUMAN	251	AVR2A_HUMAN	379	PTGES_HUMAN	507
PGH1_HUMAN	124	KCC2A_HUMAN	252	PDE4C_HUMAN	380	MMEL1_HUMAN	508
PLAP_HUMAN	125	PPBT_HUMAN	253	HDAC1_HUMAN	381	NPSR1_HUMAN	509
RARG_HUMAN	126	MMP20_HUMAN	254	PAI1_HUMAN	382	S22AP_HUMAN	510

PGH2_HUMAN	127	PA2GD_HUMAN	255	KLK5_HUMAN	383	S22AA_HUMAN	511
SYUA_HUMAN	128	PTN6_HUMAN	256	BRPF1_HUMAN	384	BLM_HUMAN	512
						BRCA1_HUMAN	513

Tomado de (Peón, A.; Naulaerts, S.; Ballester, 2017).

Tabla 6.

Ontología Genética.

GENE ONTOLOGY, BIOLOGICAL PROCESS							
GO:0055114	3.87E-25	GO:0030855	2.57E-04	GO:0043154	4.86E-03	GO:0097192	1.90E-02
GO:0046777	2.40E-22	GO:0018401	2.66E-04	GO:0035094	4.95E-03	GO:0043524	1.94E-02
GO:0042493	2.77E-21	GO:0042420	2.66E-04	GO:0006810	4.98E-03	GO:0019233	2.04E-02
GO:0006468	2.40E-19	GO:0006706	2.66E-04	GO:0046889	4.99E-03	GO:0097190	2.07E-02
GO:0018105	6.70E-16	GO:0006089	2.66E-04	GO:0006069	4.99E-03	GO:0006284	2.09E-02
GO:0006954	1.95E-14	GO:0035556	2.68E-04	GO:0042738	4.99E-03	GO:0006641	2.09E-02
GO:0043401	3.73E-14	GO:0031572	2.69E-04	GO:0055119	4.99E-03	GO:0050918	2.09E-02
GO:0043406	1.37E-11	GO:0045670	3.43E-04	GO:0090399	4.99E-03	GO:0014911	2.16E-02
GO:0014066	1.41E-11	GO:0071498	3.43E-04	GO:0032230	4.99E-03	GO:0034614	2.16E-02
GO:0048015	5.32E-11	GO:0070989	3.43E-04	GO:0031000	4.99E-03	GO:0048545	2.16E-02
GO:0022617	8.92E-11	GO:0035902	3.44E-04	GO:0033138	5.26E-03	GO:0019370	2.16E-02
GO:0008284	8.98E-11	GO:1900182	3.44E-04	GO:0031647	5.26E-03	GO:0002052	2.16E-02

GO:0043066	1.47E-10	GO:0032212	3.52E-04	GO:0032811	5.30E-03	GO:0007179	2.19E-02
GO:0070932	1.60E-10	GO:0060048	3.82E-04	GO:0035625	5.30E-03	GO:0009887	2.19E-02
GO:0030168	2.47E-10	GO:0008542	3.82E-04	GO:0061370	5.30E-03	GO:0060396	2.28E-02
GO:0042127	3.97E-10	GO:0071407	3.89E-04	GO:0055118	5.30E-03	GO:1903351	2.28E-02
GO:0001666	4.59E-10	GO:0007584	3.92E-04	GO:0071883	5.30E-03	GO:0070544	2.28E-02
GO:0018107	7.15E-10	GO:0007623	4.34E-04	GO:0007088	5.51E-03	GO:0040016	2.28E-02
GO:0050900	7.36E-10	GO:0016575	4.38E-04	GO:2001237	5.56E-03	GO:0031659	2.28E-02
GO:0018108	1.38E-09	GO:0007507	4.80E-04	GO:0042981	5.67E-03	GO:0033629	2.28E-02
GO:0046854	2.96E-09	GO:0019372	4.83E-04	GO:0071260	5.69E-03	GO:0002674	2.28E-02
GO:0015701	4.71E-09	GO:0001963	4.83E-04	GO:0050853	5.73E-03	GO:0009308	2.28E-02
GO:0045944	5.42E-09	GO:0008630	5.02E-04	GO:0048511	5.73E-03	GO:0048469	2.30E-02
GO:0010628	7.98E-09	GO:0046483	5.20E-04	GO:0045668	6.22E-03	GO:0009791	2.34E-02
GO:0030522	1.04E-08	GO:0042737	5.20E-04	GO:0060644	6.35E-03	GO:0032094	2.47E-02
GO:0006730	1.06E-08	GO:0060789	5.20E-04	GO:0043568	6.35E-03	GO:0042730	2.47E-02
GO:0007165	1.12E-08	GO:0032869	5.28E-04	GO:0050715	6.41E-03	GO:0042346	2.47E-02
GO:0032496	2.67E-08	GO:0048148	6.60E-04	GO:0007569	6.41E-03	GO:0033198	2.47E-02
GO:0019369	2.71E-08	GO:0014912	6.60E-04	GO:0021766	6.84E-03	GO:0006921	2.47E-02
GO:0007169	2.92E-08	GO:0036152	6.67E-04	GO:0007399	6.90E-03	GO:0005980	2.47E-02
GO:0071456	2.92E-08	GO:0034599	6.81E-04	GO:0005975	6.96E-03	GO:0000724	2.48E-02
GO:0051897	3.03E-08	GO:0042632	6.81E-04	GO:0001889	7.13E-03	GO:0045786	2.52E-02
GO:0006367	3.61E-08	GO:0007189	7.37E-04	GO:0051930	7.39E-03	GO:0042475	2.54E-02
GO:0008202	4.35E-08	GO:0051092	7.44E-04	GO:0032757	7.39E-03	GO:0060548	2.54E-02

GO:0001934	5.47E-08	GO:0034605	7.95E-04	GO:0051209	7.71E-03	GO:0016925	2.63E-02
GO:0070374	8.36E-08	GO:2001240	7.95E-04	GO:0055085	7.80E-03	GO:0001570	2.72E-02
GO:0008283	8.71E-08	GO:0019433	8.14E-04	GO:0030194	7.90E-03	GO:0042517	2.75E-02
GO:0050728	9.68E-08	GO:0030593	8.38E-04	GO:0001516	7.90E-03	GO:0006695	2.75E-02
GO:0070301	1.10E-07	GO:1904707	8.79E-04	GO:0040029	7.90E-03	GO:0006281	2.77E-02
GO:0006508	2.11E-07	GO:0090050	8.90E-04	GO:0090303	7.90E-03	GO:0060045	2.79E-02
GO:0038083	2.28E-07	GO:0071320	9.37E-04	GO:0048009	7.90E-03	GO:0031334	2.79E-02
GO:0042593	3.79E-07	GO:0040014	9.82E-04	GO:0006661	8.11E-03	GO:0006090	2.79E-02
GO:0045766	3.89E-07	GO:0032148	9.82E-04	GO:0031069	8.48E-03	GO:0051000	2.79E-02
GO:0030574	4.22E-07	GO:0007202	9.82E-04	GO:0051225	8.48E-03	GO:0010906	2.79E-02
GO:0014068	5.04E-07	GO:0009749	1.02E-03	GO:0051281	8.48E-03	GO:2001243	2.79E-02
GO:0006805	5.83E-07	GO:0001938	1.13E-03	GO:0010575	8.48E-03	GO:0009651	2.88E-02
GO:0032355	5.95E-07	GO:0015698	1.14E-03	GO:0031622	8.66E-03	GO:0044342	2.88E-02
GO:0045471	6.34E-07	GO:0008209	1.14E-03	GO:0003417	8.66E-03	GO:0006853	2.88E-02
GO:0007568	6.58E-07	GO:0014065	1.18E-03	GO:0046651	8.66E-03	GO:0060020	2.88E-02
GO:0035264	7.89E-07	GO:0036151	1.18E-03	GO:0048143	8.66E-03	GO:0048617	2.88E-02
GO:0000187	8.12E-07	GO:0048146	1.18E-03	GO:0060336	8.66E-03	GO:0050665	2.88E-02
GO:1901796	1.10E-06	GO:0043123	1.28E-03	GO:2001300	8.66E-03	GO:0001973	2.88E-02
GO:2000145	1.25E-06	GO:0032024	1.39E-03	GO:1900113	8.66E-03	GO:0010469	2.88E-02
GO:0042135	1.32E-06	GO:0043068	1.39E-03	GO:0060509	8.66E-03	GO:0000733	2.88E-02
GO:0044598	1.32E-06	GO:0071316	1.39E-03	GO:1904357	8.66E-03	GO:0032922	2.91E-02
GO:0044597	1.32E-06	GO:0061418	1.40E-03	GO:2000343	8.66E-03	GO:0007612	2.91E-02

GO:0000122	1.61E-06	GO:0045931	1.40E-03	GO:0014823	9.42E-03	GO:0030890	2.99E-02
GO:0035335	1.70E-06	GO:0060079	1.40E-03	GO:0006691	9.65E-03	GO:0045666	3.12E-02
GO:0044267	2.87E-06	GO:0071380	1.46E-03	GO:0002042	9.65E-03	GO:0008286	3.12E-02
GO:0001975	2.92E-06	GO:0055093	1.46E-03	GO:0042993	9.65E-03	GO:0030316	3.14E-02
GO:0045893	3.11E-06	GO:0007173	1.46E-03	GO:0048714	9.65E-03	GO:0030218	3.25E-02
GO:0045907	3.79E-06	GO:0007565	1.51E-03	GO:0043277	9.65E-03	GO:0010468	3.26E-02
GO:0010629	4.16E-06	GO:0007595	1.58E-03	GO:2000352	9.65E-03	GO:0030097	3.31E-02
GO:0043525	4.60E-06	GO:0006470	1.60E-03	GO:0009755	9.65E-03	GO:0046718	3.47E-02
GO:0045429	4.60E-06	GO:0050729	1.63E-03	GO:0001933	1.03E-02	GO:0051924	3.51E-02
GO:0043065	5.37E-06	GO:0051973	1.65E-03	GO:0001523	1.03E-02	GO:0090314	3.51E-02
GO:0019371	5.63E-06	GO:0048662	1.65E-03	GO:0034644	1.04E-02	GO:0070527	3.51E-02
GO:0006979	6.04E-06	GO:0038096	1.70E-03	GO:0005977	1.09E-02	GO:0043268	3.53E-02
GO:0071222	8.30E-06	GO:0006974	1.77E-03	GO:0007613	1.11E-02	GO:0051901	3.53E-02
GO:0002003	1.01E-05	GO:0031623	1.79E-03	GO:0032870	1.14E-02	GO:0051918	3.53E-02
GO:0048010	1.03E-05	GO:0006325	1.79E-03	GO:0035855	1.16E-02	GO:2000036	3.53E-02
GO:0048384	1.04E-05	GO:0019373	1.83E-03	GO:0036149	1.16E-02	GO:0051481	3.53E-02
GO:0048013	1.07E-05	GO:2000249	1.83E-03	GO:0050995	1.16E-02	GO:0042416	3.53E-02
GO:0048661	1.18E-05	GO:0046326	1.93E-03	GO:0010832	1.16E-02	GO:0046415	3.53E-02
GO:0016098	1.20E-05	GO:0030217	1.93E-03	GO:0097194	1.16E-02	GO:0061001	3.53E-02
GO:0030335	1.31E-05	GO:0042448	2.04E-03	GO:0006935	1.21E-02	GO:0016242	3.53E-02
GO:0036092	1.43E-05	GO:0070933	2.04E-03	GO:0050731	1.23E-02	GO:0051289	3.53E-02
GO:0038128	1.50E-05	GO:0030324	2.11E-03	GO:0042572	1.23E-02	GO:0050679	3.53E-02

GO:1901215	2.24E-05	GO:0043433	2.20E-03	GO:0098656	1.23E-02	GO:0032092	3.75E-02
GO:2000379	2.54E-05	GO:0043393	2.27E-03	GO:0032754	1.27E-02	GO:0007566	3.79E-02
GO:0031641	2.66E-05	GO:0001659	2.27E-03	GO:0010887	1.27E-02	GO:0051496	3.79E-02
GO:0006693	2.66E-05	GO:0006915	2.36E-03	GO:0055012	1.27E-02	GO:0001816	3.90E-02
GO:0032526	2.71E-05	GO:0003007	2.59E-03	GO:0035814	1.27E-02	GO:0055010	3.90E-02
GO:0010870	2.74E-05	GO:0006694	2.59E-03	GO:0046321	1.27E-02	GO:0060070	4.04E-02
GO:0043567	2.74E-05	GO:0046677	2.59E-03	GO:0003081	1.27E-02	GO:0009611	4.22E-02
GO:0043552	3.19E-05	GO:0002005	2.71E-03	GO:1901216	1.38E-02	GO:0007586	4.22E-02
GO:0006006	3.20E-05	GO:0002068	2.71E-03	GO:0042523	1.38E-02	GO:0010763	4.22E-02
GO:0043410	3.23E-05	GO:2000630	2.71E-03	GO:0002407	1.38E-02	GO:0050868	4.22E-02
GO:0016032	4.52E-05	GO:0061198	2.71E-03	GO:0048265	1.38E-02	GO:0033169	4.22E-02
GO:0050852	4.53E-05	GO:0071375	2.77E-03	GO:0070542	1.38E-02	GO:0033628	4.22E-02
GO:0015758	4.92E-05	GO:0019229	2.77E-03	GO:0060749	1.38E-02	GO:0008210	4.22E-02
GO:0000165	5.32E-05	GO:1902895	2.77E-03	GO:2000811	1.38E-02	GO:0061045	4.22E-02
GO:0007204	5.78E-05	GO:0045892	2.83E-03	GO:0045765	1.38E-02	GO:0048149	4.22E-02
GO:0050482	6.43E-05	GO:0050727	2.91E-03	GO:0008016	1.38E-02	GO:2000773	4.22E-02
GO:0031100	7.59E-05	GO:0001558	2.92E-03	GO:0002223	1.46E-02	GO:0034374	4.22E-02
GO:0008285	8.25E-05	GO:0051402	2.98E-03	GO:0007268	1.52E-02	GO:0045820	4.22E-02
GO:0006940	8.38E-05	GO:0070555	2.98E-03	GO:0031663	1.54E-02	GO:0019674	4.22E-02
GO:1904355	8.38E-05	GO:0006629	3.07E-03	GO:0016311	1.56E-02	GO:0045945	4.22E-02
GO:1900034	8.62E-05	GO:0045861	3.34E-03	GO:0032868	1.59E-02	GO:0006081	4.22E-02
GO:0097267	9.38E-05	GO:0016310	3.38E-03	GO:0042752	1.61E-02	GO:0051928	4.32E-02

GO:0010863	9.38E-05	GO:0051384	3.48E-03	GO:0014070	1.61E-02	GO:0002053	4.32E-02
GO:0071395	1.09E-04	GO:0008217	3.48E-03	GO:0033189	1.62E-02	GO:0042755	4.32E-02
GO:0050860	1.16E-04	GO:0008360	3.65E-03	GO:0030225	1.62E-02	GO:0016241	4.39E-02
GO:0031295	1.21E-04	GO:0030183	3.79E-03	GO:0036120	1.62E-02	GO:0023014	4.39E-02
GO:0017144	1.31E-04	GO:0006703	3.83E-03	GO:0008203	1.70E-02	GO:0032436	4.47E-02
GO:0043627	1.44E-04	GO:0000082	3.85E-03	GO:0043491	1.71E-02	GO:0038095	4.55E-02
GO:0042060	1.50E-04	GO:0006654	3.87E-03	GO:0061298	1.75E-02	GO:0006928	4.67E-02
GO:0006476	1.53E-04	GO:0010506	3.90E-03	GO:0042908	1.75E-02	GO:0032147	4.71E-02
GO:0036148	1.56E-04	GO:0043171	3.98E-03	GO:0034983	1.75E-02	GO:0046330	4.73E-02
GO:0036150	1.56E-04	GO:0019722	4.31E-03	GO:0040012	1.75E-02	GO:0035987	4.75E-02
GO:0001525	1.64E-04	GO:0032481	4.31E-03	GO:0007617	1.75E-02	GO:0015721	4.75E-02
GO:0006919	2.04E-04	GO:0010507	4.39E-03	GO:0002318	1.75E-02	GO:0001759	4.97E-02
GO:0006855	2.07E-04	GO:0051726	4.54E-03	GO:0010700	1.75E-02	GO:0015909	4.97E-02
GO:0006644	2.09E-04	GO:0001764	4.67E-03	GO:0043536	1.88E-02	GO:0071872	4.97E-02
GO:0031397	2.10E-04	GO:0051091	4.67E-03	GO:0051968	1.88E-02	GO:0042136	4.97E-02
GO:0030307	2.25E-04	GO:0043252	4.70E-03	GO:0030220	1.88E-02	GO:0036499	4.97E-02
GO:0050927	2.34E-04	GO:0035924	4.70E-03	GO:1902236	1.88E-02	GO:0010524	4.97E-02
GO:0045740	2.45E-04	GO:0006633	4.75E-03	GO:0002026	1.88E-02	GO:0097028	4.97E-02
GO:0009636	2.48E-04	GO:0071333	4.75E-03	GO:0042542	1.89E-02	GO:0007567	4.97E-02
						GO:0042574	4.97E-02

Tomado de (Peón, A.; Naulaerts, S.; Ballester, 2017).

