

Universidad de San Carlos de Guatemala
Dirección General de Investigación
Programa Universitario de Investigación Interdisciplinaria en Salud

Informe final

Dilucidación del mecanismo corrector por el cual la genisteína, un producto natural, actúa sobre CFTR en fibrosis quística en poblaciones latinoamericanas.

Equipo de investigación

Coordinador del Proyecto: **Christian Daniel Farfán Barrera**

Investigador: Luis Manuel López Dávila

Investigador: Oscar Hugo Machuca

Investigador: Rodrigo José Vargas Rosales

Auxiliar de investigación I: Amanda Damaris Hernández Tzorín

Guatemala, 15 de enero 2021.

Unidad de investigación avaladora: Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas IIQB

Dr. Félix Alan Douglas Aguilar Carrera
Director General de Investigación

Ing. Agr. MARN Julio Rufino Salazar
Coordinador General de Programas

Dra. Hilda Elena Valencia de Abril
Coordinadora Programa Universitario de Investigación Interdisciplinaria en Salud

Christian Daniel Farfán Barrera
Coordinador de proyecto

Luis Manuel López Dávila
Investigador

Oscar Hugo Machuca
Investigador

Rodrigo José Vargas Rosales
Investigador

Amanda Damaris Hernández Tzorín
Auxiliar de Investigación II

Universidad de San Carlos de Guatemala, Dirección General de Investigación, 2019. El contenido de este informe de investigación es responsabilidad exclusiva de sus autores.

Esta investigación fue cofinanciada por la Dirección General de Investigación de la Universidad de San Carlos de Guatemala, proyecto Código B23-2020 durante el año 2020 en el Programa Universitario de Investigación Interdisciplinaria en Salud.

Financiamiento aprobado por DIGI: Q 292,868.04_Financiamiento ejecutado: _Q_235,752.04

Índice

1. Resumen	1
2. Palabras clave	1
3. Abstract and keyword	2
4. Introducción	3
5. Planteamiento del problema	5
6. Preguntas de investigación	5
7. Delimitación en tiempo y espacio	5
7.1 Delimitación temporal	5
7.2 Delimitación espacial	6
8. Marco teórico	6
8.1 Fibrosis Quística (FQ)	6
8.2 Genisteína	6
8.3 Modelaje por homología	7
9. Estado del arte	7
10. Objetivos General	9
11. Objetivos Específicos	9
12. Hipótesis	9
13. Materiales y métodos	9
13.1 Enfoque de investigación: Cuantitativo	9
13.2 Tipo de Investigación: Aplicada	9
13.3 Método	10
13.4 Técnicas e instrumentos	12
13.5 Operacionalización de las variables	13
13.6 Procesamiento y análisis de la información	13
14. Vinculación, difusión y divulgación	13
15. Resultados	14

16.	Análisis y discusión de resultados	22
17.	Conclusiones	26
18.	Impacto esperado	26
19.	Referencias bibliográficas	27

Lista de tablas

Tabla 1.	Mutaciones más frecuentes en Latinoamérica para CFTR	14
Tabla 2.	Resultados de modela por homología	17
Tabla 3.	Modelos en bases de datos	17
Tabla 4.	Acoplamiento de 3-hidroxigenisteína con variantes clínicas	19

Lista de figuras

Figura 1.	Recientes avances en investigación en genisteína y fibrosis quística.	15
Figura 2.	Genisteína CID: 5280961 y 3-hidroxigenisteína CID: 5281801	15
Figura 3.	Mecanismo de genisteína en CFTR	16
Figura 4.	Representación de Cartoon modelaje por homología de G85E-I-Tasser	16
Figura 5.	Representación de Cartoon modelaje por homología de n1303k I-Tasser	17
Figura 6.	Ramachandran plot modelo por homología n549s Probit software	18
Figura 7.	Ramachandran plot modelo por homología n1303k Probit software	18
Figura 8.	Ramachandran plot modelo por homología g85e Probit software	19
Figura 9.	Acoplamiento molecular 3-hidroxigenisteína N549S	20
Figura 10.	Acoplamiento molecular 3-hidroxigenisteína G85E	20
Figura 11.	Acoplamiento molecular 3-hidroxigenisteína S549N	21
Figura 12.	Acoplamiento molecular 3-hidroxigenisteína N1303K	21
Figura 13.	Acoplamiento molecular 3-hidroxigenisteína F508 4WZ6.PDB	22

Dilucidación del mecanismo corrector por el cual la genisteína, un producto natural, actúa sobre CFTR en fibrosis quística en poblaciones latinoamericanas

1. Resumen

La fibrosis quística es una de las enfermedades monogénicas más frecuentes; se estima que una de cada 32 personas sanas son portadoras del gen para fibrosis quística, lo que aumenta la importancia de su estudio y tratamiento. Los tratamientos convencionales descritos en guías de práctica clínica son poco prometedores y los tratamientos más novedosos son exitosos para un porcentaje muy limitado de las mutaciones descritas. Existe evidencia clínica de efectos positivos en el uso de genisteína, una isoflavona extraída de la soya, la promiscuidad de las isoflavonas y su semejanza a fármacos exitosos como el ivacaftor proporcionan datos suficientes para el estudio de mecanismos en el receptor CFTR en sus mutaciones más frecuentes, dilucidando mecanismos posibles. En Guatemala es urgente contar con un tamizaje neonatal que detecte no solamente la presencia de fibrosis quística, sino también permita determinar la mutación en cada paciente. El objetivo fue dilucidar el mecanismo de la proteína de CFTR asociada a genisteína en fibrosis quística, para lo cual se realizó una revisión amplia de literatura que conllevó a obtener las mutaciones más frecuentes en Latinoamérica y la evidencia reciente sobre la genisteína como tratamiento en fibrosis quística. Las mutaciones fueron modeladas por homología y luego con acoplamiento molecular se obtuvieron las energías de enlace y propuesta de mecanismo de genisteína en las mutaciones analizadas.

2. Palabras clave

CFTR, genisteína, isoflavona, Ivacaftor, fibrosis quística.

3. Abstract and keyword

Cystic fibrosis is one of the most common monogenic diseases since it is estimated that 1 in 32 healthy people carry the gene for cystic fibrosis, which increases the importance of its study and treatment. The treatments described in the clinical practice guidelines are not particularly promising and the newer treatments are successful for a very limited percentage of the mutations described. There is clinical evidence of positive effects in the use of genistein, an isoflavone extracted from soy, the molecular promiscuity of isoflavones and their similarity to successful drugs such as ivacaftor provides useful data for the study of mechanisms in the CFTR receptor in its most frequent mutations, and elucidating possible mechanisms. It is urgent to have neonatal screening in Guatemala that detects not only the presence of cystic fibrosis, but also allows determining the mutation in each patient. The objective was to elucidate the mechanism of the CFTR protein associated with genistein in cystic fibrosis, for which a comprehensive review of the literature was carried out that led to obtaining the most frequent mutations in Latin America and the recent evidence on genistein as a treatment for cystic fibrosis. The mutations were modeled by homology and then with molecular coupling, the binding energies and proposed genistein mechanism were obtained in the analyzed mutations.

Keywords

CFTR, genistein, isoflavone, ivacaftor, cystic fibrosis.

4. Introducción

Una sola proteína, la CFTR, es la responsable de una de las enfermedades monogénicas más estudiadas en la actualidad, sin embargo, son cada vez más mutaciones conocidas del mismo gen las identificas y que no parecen detenerse en CFTR. Su pertinencia en la enfermedad conocida como fibrosis quística llega a más de 1,600 mutaciones y el número va en aumento (Jaffe, A., Bush, A., 2001).

El diagnóstico molecular, resulta ser cada vez más importante en el éxito del tratamiento, pues el diagnóstico limitado solamente a una condición clínica sin profundizar la mutación del paciente, resulta insuficiente. Se ha publicado que el 70% de los diagnósticos corresponden a una mutación mayoritaria, $\Delta F508$, sin embargo, en la medida que más mutaciones sean incluidas en paneles de diagnóstico, este porcentaje podrá cambiar y existen diferentes pronósticos de tratamiento según la mutación del paciente (Tsui, L., 1992).

Si bien, la lista de mutaciones para el gen y la proteína CFTR va en aumento, la proporción de mutaciones según los diferentes grupos poblacionales es distinto, por lo que la frecuencia de mutaciones cambia en diferente grupo poblacional (Cheadle, J.P., 1994).

El panel consenso es un criterio de un grupo de expertos en fibrosis quística que puede cambiar en la medida de nuevos conocimientos científicos, en la actualidad, paneles de 20 y hasta 30 mutaciones son comercializados para pruebas diagnósticas, tomando en cuenta más de 1,500 mutaciones conocidas, son un grupo de mutaciones mayoritariamente conocidas y presentes en la población, mas no la mayoría de las mutaciones existentes. Lo cual excluye poblaciones de menor interés comercial como es el caso de la guatemalteca y latinoamericana en general (Rosenstein, B.J., Cutting, G.R., 1998).

Los avances en investigación sobre tratamientos en fibrosis quística han sido muchos, desde terapia génica, que no ha sido aprobada por FDA (*Food and Drug Administration*, por sus siglas en inglés), hasta tratamiento de las complicaciones clínicas con antibióticos; o bien en casos documentados, trasplantes de pulmón. Sin embargo, la más prometedora y exitosa terapia en la actualidad es la combinación de Lumacaftor e Ivacaftor. Pero esta terapia solo ha demostrado ser potencialmente exitosa para dos mutaciones del CFTR. Su costo aún no permite garantizar el

acceso a los pacientes para este tratamiento (Abbott, J.D., Dodd, M., Bilton, D., Webb, A.K., 1994) (Wainwright, et.al., 2015).

Ensayos clínicos controlados en pacientes con fibrosis quística continúan identificando nuevas entidades farmacológicas para fibrosis quística, una de ellas ha sido la Genisteína, una molécula encontrada en la soya, y cuya actividad farmacológica ha sido documentada como fitoestrógeno y posible activo beneficioso en hiperplasia prostática benigna previo a cirugía. En el caso de fibrosis quística en pacientes con la mutación más conocida, se han obtenido resultados de eficacia en la conducción de cloro al espacio extracelular, lo que ha derivado en estudios sobre su mecanismo de acción asociado y posible actividad terapéutica (Zeitlin P.L., 1999) (Wegrzyn, G., et.al., 2010).

El desarrollo de nuevos tratamientos farmacológicos, ha concentrado su algoritmo de investigación en el uso de herramientas *in silico* que permiten optimizar el andamio de la molécula y optimizar su posible eficacia a la vez de reducir su toxicidad, sin embargo, también estas herramientas permiten evaluar candidatos farmacofóricos en distintas proteínas e incluso modelar proteínas con mutaciones puntuales para evaluar candidatos farmacológicos (Terstappen G.C., Reggiani, A., 2001).

En Latinoamérica son pocos los países que han logrado determinar sus frecuencias de mutaciones, como Cuba, Chile, México, Colombia, y Ecuador, donde se resaltan cuatro mutaciones frecuentes en Latinoamérica que además son Clase III. Al modelarlas por homología, puesto que no están presentes de forma tridimensional en la literatura, fue posible evidenciar que la genisteína presenta una afinidad de dichas mutaciones y puede ser una molécula candidato a optimizarse para ensayos clínicos futuros para mutaciones frecuentes en Latinoamérica. Las mutaciones para CFTR G85E, N1303K, S549N y F805Del, son las más frecuentes en Latinoamérica y corresponden a mutaciones clase II, los modelajes por homología y acoplamiento molecular evidencian que el metabolito activo de la Genisteína 3-hidroxigenisteína, puede tener un efecto potenciador en estas mutaciones dada su interacción en -8.5, -7.8, -7.6 y -6.3 Kcal/mol.

5. Planteamiento del problema

El Ivacaftor y Lumacaftor son en la actualidad los tratamientos más prometedores en fibrosis quística para dos mutaciones puntuales en estudios realizados en población anglosajona. Sin embargo, evidencia en ensayos clínicos y reportes de uso, han incluido en guías de práctica clínica más mutaciones en sus recomendaciones de uso. También moléculas como la Genisteína han resultado eficaces en ensayos clínicos de fibrosis quística (MacDonald, K.D., McKenzie, K.R., & Zeitlin, P.L., 2007). Estos estudios solo han sido realizados en pacientes con un solo tipo de mutación, lo que ha dejado como pregunta, si esta molécula podría o no ser efectiva en otras mutaciones o bien si podría tener mayor eficacia en mutaciones hasta ahora sin tratamiento presentes en poblaciones latinoamericanas. Herramientas *in silico* fueron de utilidad al evaluar, a través de modelaje por homología y estudios de acoplamiento, la Genisteína para mutaciones frecuentes en poblaciones latinoamericanas, lo que evidencia que la Genisteína puede dar origen a nuevas entidades farmacológicas.

6. Preguntas de investigación

- ¿Posee la Genisteína un mecanismo corrector para CFTR en diferentes mutaciones conocidas?
- ¿Tiene el andamio farmacofórico de Genisteína posibilidades de acoplamiento molecular en CFTR con mutaciones puntuales?

7. Delimitación en tiempo y espacio

7.1 Delimitación temporal

El estudio se realizó *in silico*, por lo que no fue requerido recolección de muestras, dictamen de comité de bioética en investigación o ser realizado en una época del año específica. El estudio se realizó en un servidor con software y tecnología de la Unidad de Investigación en Química Computacional de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, debido a que los insumos requeridos fueron adquiridos en noviembre, posterior a la generación de resultados.

7.2 Delimitación espacial

Únicamente se utilizó el espacio provisto por la Unidad de Química Computacional en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

8. Marco teórico

8.1 Fibrosis Quística (FQ)

Es una enfermedad genética letal muy frecuente en la población caucásica, aunque se describe en todas las etnias, con una frecuencia que varía de 1:2,000 recién nacidos en caucásicos, hasta 1:31,000 recién nacidos en asiáticos (Sontag, M.K., Hammond, K.B., Zielenski, J., Wagener, J.S., Accurso, F.J., 2005). Continúa siendo una causa de importante daño en morbilidad biológica y psicológica para el paciente y su familia, y un serio desafío para los sistemas de salud. Desde el descubrimiento del gen de FQ en el brazo largo del cromosoma 7 en 1989, se han descrito más de 1,800 mutaciones, de las cuales la mayoría son variantes que no producen enfermedad FQ. Alrededor de 30 a 40 de ellas inducen la falta de producción, o la producción defectuosa de la proteína CFTR, que regula el paso del ión cloro en las membranas celulares, por lo que también se le conoce como el canal del cloro (Fielbaum, C.Ó., 2011).

8.2 Genisteína

La genisteína o 4',5,7-trihidroxiisoflavona, es un producto natural y precursor común en la biosíntesis de fitoalexinas y fitoanticipinas antimicrobianas en las leguminosas, y una importante molécula en las semillas de soya.

Este compuesto es un fitoestrógeno con una amplia variedad de efectos farmacológicos en las células animales, incluida la inhibición de la tirosina quinasa, y la ingesta de esta isoflavona en la dieta se ha relacionado, a través de estudios epidemiológicos y de modelos animales, con una gama de posibles efectos beneficiosos para la salud. Estos incluyen la quimioprevención de los cánceres de mama y próstata, enfermedades cardiovasculares y enfermedades postmenopáusicas. A pesar de una extensa literatura sobre los efectos de la genisteína en la dieta, todavía existen preguntas sobre sus beneficios generales potenciales como un componente

de la dieta humana. Como otras isoflavonas, se puede sintetizar químicamente a través de la ruta de la desoxibenzoína o la chalcona. La genisteína se sintetiza en plantas a partir de la naringenina de flavanona mediante una nueva reacción de migración en anillo catalizada por la enzima isoflavona sintasa del citocromo P450 (IFS). Los genes IFS se han clonado recientemente a partir de una serie de especies de plantas, y la producción de genisteína ahora se puede lograr en no leguminosas mediante enfoques de ADN recombinante (Dixon, R.A., Ferreira, D., 2011).

8.3 Modelaje por homología

A medida que los proyectos de genómica estructural continúan depositando estructuras 3D representativas de proteínas, los métodos de modelado de homología tienen un papel cada vez más importante en el descubrimiento de fármacos basados en estructuras. Si bien los métodos de predicción de la estructura computacional proporcionan una alternativa rentable en ausencia de estructuras experimentales, el desarrollo de modelos suficientemente precisos sigue siendo un gran desafío (Cavasotto, C.N., Phatak, S.S., 2009). Los avances en bioinformática y algoritmos de modelado de proteínas, además del enorme aumento en la información de la estructura de proteínas experimentales, han ayudado en la generación de bases de datos que comprenden modelos de homología de una porción significativa de secuencias de proteínas genómicas conocidas. Actualmente, la información de la estructura 3D se puede generar hasta en un 56% de todas las proteínas conocidas (Hillisch A., Pineda L, Hilgenfeld R., 2004).

9. Estado del arte

La genisteína fue uno de los primeros compuestos que impactaron al CFTR, la cual es parte de una familia de isoflavonas, polifenoles heterocíclicos que se encuentran naturalmente en muchas plantas. Así mismo la soya es una de las fuentes más ricas de Genisteína y han resultado atribuidos a ésta numerosos beneficios para la salud, incluidas sus acciones como un fitoestrógeno, un antioxidante y un inhibidor de la tirosina quinasa, y se ha propuesto que son eficaces en diversos trastornos como el cáncer, las enfermedades cardiovasculares y los problemas de la menopausia (Szkudelska, K., Nogowski, L., 2007).

Aunque los efectos de la genisteína pueden ser algo débiles, su baja toxicidad ha alentado a los investigadores a evaluar la genisteína como un agente terapéutico potencial. El descubrimiento de que la genisteína podría actuar como un fármaco potenciador planteó la posibilidad de que la misma pudiera usarse en pacientes con fibrosis quística. De hecho, los estudios sugirieron que esta isoflavona no solo podría aumentar la actividad del canal iónico de G551D CFTR, una clase de activación mutante, sino también la mutación común $\Delta F508$. La idea de que la genisteína podría ser eficaz contra G551D CFTR es atractiva, ya que esta mutación da como resultado una proteína que llega a la membrana plasmática como una proteína madura, pero con una función muy dañada.

La genisteína parece interactuar directamente con CFTR para modular su actividad del canal iónico, y de hecho es uno de los potenciadores más potentes de $\Delta F508$ CFTR y curiosamente, además de potenciar la actividad del canal de CFTR, se ha demostrado que el tratamiento a largo plazo de las células con genisteína aumenta el nivel de expresión de la proteína para el CFTR mutante (Dey, I., Shah, K., Bradbury, N.A., 2016).

Las enfermedades genéticas e inmunológicas, a pesar de muchos intentos de desarrollar tratamientos efectivos, siguen siendo un gran desafío para la medicina. Las terapias actuales de estas enfermedades consisten en el alivio farmacológico de los síntomas, la rehabilitación y la ayuda psicológica que, aunque son muy importantes, definitivamente no son suficientes. Por lo tanto, la búsqueda de nuevas terapias que puedan eliminar las causas principales de estas enfermedades es de particular importancia para la sociedad. Los compuestos naturales revelan muchas actividades biológicas que los hacen candidatos para medicamentos en tales enfermedades.

Uno de ellos es la genisteína, un compuesto del grupo de los flavonoides. Debido a que afecta a múltiples procesos, la genisteína se ha convertido en el centro de interés de muchos científicos que trabajan en enfermedades de diversa etiología, curso y herencia. Se utilizó en terapias experimentales de algunas enfermedades genéticas, como la enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Parkinson y fibrosis quística (Wegrzyn, G., et.al., 2018).

10. Objetivos General

Dilucidar el mecanismo de CFTR asociado a genisteína en fibrosis quística.

11. Objetivos Específicos

1. Calcular el cambio de energía de interacción genisteína-CFTR nativa contra mutantes, por medio de métodos computacionales.
2. Determinar el mecanismo de reacción genisteína-CFTR en función de la interacción molecular de los grupos farmacofóricos del complejo proteína-ligando.
3. Generar modelaje por homología de CFTR para mutaciones reconocidas por el panel consenso para fibrosis quística.
4. Generar acoplamiento molecular de CFTR y genisteína en diferentes condiciones de mutación.
5. Determinar la efectividad de genisteína como corrector de CFTR en mutaciones comunes en poblaciones latinoamericanas

12. Hipótesis

La Genisteína tiene una unión ligando-receptor en diferentes mutaciones de la proteína CFTR.

13. Materiales y métodos

13.1 Enfoque de investigación: Cuantitativo

La investigación es cuantitativa debido a que se determina la existencia o no de una unión ligando receptor de la genisteína con proteínas CFTR a través de cuantificaciones fisicoquímicas. Estas cuantificaciones se realizan haciendo uso del software correspondiente y dan una serie de valores que permiten su interpretación adecuada, requiriendo únicamente de estadística descriptiva.

13.2 Tipo de Investigación: Aplicada

Haciendo uso de los conocimientos originados a partir de ciencias básicas como la química y física y con el apoyo de matemática e informática es posible obtener información específica de la interacción y posible utilización de la genisteína para el tratamiento de fibrosis quística. De tal manera, se logra determinar en cuales mutaciones de CFTR es posible utilizar a esta isoflavona como un producto natural de interés y aplicación.

13.3 Método

13.3.1 Recolección de Información

Debido al tipo de investigación, aunque es una investigación cuantitativa, no fue necesario realizar un muestreo y por lo mismo tampoco corresponde un diseño de muestreo o experimental.

13.3.2 Revisión bibliográfica

Se realizó una exhaustiva revisión bibliográfica para determinar las principales mutaciones para el gen CFTR que codifica a la proteína CFTR, determinando las mutaciones clase III, más frecuentes en Latinoamérica.

La revisión sistemática es un método que tiene como objetivo resumir la información más relevante, y es en sí misma una investigación científica, utilizada a nivel mundial por congresos de científicos quienes conforman equipos multidisciplinarios. Un aspecto importante, es que la revisión sistemática parte de una pregunta de investigación, generalmente como una duda clínica,

la cual debe ser formulada de forma clara y es la base de toda la revisión que le sucede, es un requisito y a la vez un objetivo en la investigación documental.

La revisión también se basa en la evidencia, por lo que sus conclusiones son un grado de evidencia sobre los estudios revisados. Una escala muy utilizada en investigación biomédica es la escala de GRADE el cual es una metodología de uso amplio en las guías de práctica clínica y

una guía importante en la valoración de las experiencias clínicas y la evidencia científica. El sistema GRADE, establece el meta-análisis como el más amplio estudio y con la mayor evidencia, la iniciativa *Cochrane* ha resultado en el mundo como una herramienta líder en el desarrollo de revisiones y meta-análisis de gran calidad académica.

13.3.2.1 Motores de búsqueda

La información científica se encuentra en revistas y estas a su vez deben estar indexadas, lo que sugiere pertenecer a un selecto grupo de revistas (*journals*) que son reconocidos por motores de búsqueda académicos. Sin embargo, las revistas usualmente no son indexadas en todos los motores de búsqueda, solo un cúmulo de revistas principalmente de ciencias médicas, se encuentran en *Pubmed* y no todas comparten su filiación con *Pubmed Central*, de igual forma, *Hinari*, *Scopus*, *ScienceDirect*, *Cochrane*, *Trial*, *Copernicus*, *Chemical Abstracts*, *Ebsco*, *Scielo* y *Google Scholar*, entre otros, no comparten la misma cantidad de revistas científicas y algoritmos de búsqueda. Razón por la que las revisiones sistemáticas no suelen utilizar solo *Pubmed* o *Embo* para realizar su búsqueda, sino que definen los motores a incluir en su revisión.

Base de datos	Criterio
<i>Cochrane</i>	Meta-análisis y revisiones sistemáticas
<i>Trial.gov</i>	Ensayos clínicos finalizados o en ejecución
<i>PubMed</i>	Artículos científicos
<i>Scopus</i>	Artículos científicos
<i>PubChem</i>	CAS y ensayos
<i>Chembl</i>	Regla de los cinco
<i>Google Scholar</i>	Artículos científicos

13.3.2.2 Pregunta de investigación

Con el objeto de orientar la búsqueda en la Web, primero se realizó una pregunta. La pregunta con criterios consensuados, ejemplo de esto son las preguntas *PICO* y/o *PECO*, las cuales hacen inclusión y exclusión, además de ser una guía en el proceso de revisión. En este escenario, la búsqueda de nuevas entidades con actividad farmacológica de origen polifenol, debe responder a preguntas de investigación. Se realizaron preguntas *PICO*.

13.4 Técnicas e instrumentos

13.4.1 Traducción gen–proteína

Se utilizó *EMBOSS*, donde se obtuvo las secuencias en formato FASTA para la proteína nativa del gen CFTR, y utilizando *Uniprot* y *Genbank* se desarrollaron las mutaciones para las diferentes secuencias mutantes de la proteína CFTR.

13.4.2 Modelaje por Homología

El criterio CASP fue utilizado para la selección del mejor método para modelaje, por lo que I-Tasser fue el software utilizado para el modelaje, con el método de uso de plantilla, obteniendo las estructuras secundarias, y plantillas por LOMETS, el método de Monte Carlo fue utilizado en las réplicas y el refinamiento del modelo utilizó una simulación dinámica. El criterio de éxito del modelo fue el ranking del servidor y la calidad del modelo se verificó con el ploteo de Ramadhandran para obtener el diagrama de ángulos ϕ/ψ para cada modelo obtenido. El método para modelaje por homología, es el descrito por Krieger (Krieger, E., Nabuurs, S.B., Vriend, G., 2003).

13.4.3 Ensamble proteína - ligando

El ligando genisteína en formato mol2 fue obtenido del banco de *docking zinc* y fue oxidado a su metabolito activo para el acoplamiento. El ensamble en los dos sitios activos documentados para la proteína CFTR y su puntuación fue evaluada basándose en el ensamble más estable tomando como referencia la energía libre producida. El software propuesto inicialmente fue Glide del consorcio Shrodinger inc. Publicado en *Journal of Medicinal Chemistry*, (Friesner R.A., et.al., 2004). Sin embargo, el análisis fue realizado por SwissDock y Autodock Vina.

13.5 Operacionalización de las variables

Objetivos específicos	VARIABLES o unidades de análisis que serán consideradas	Forma en que se medirán, clasificarán o calificarán
Calcular cambio de energía genisteína-CFTR nativa vrs mutante	Energía libre de Gibbs	Cambios negativos en energía libre de Gibbs
Mecanismo genisteína-CFTR de los grupos farmacofóricos	Tripletes farmacofóricos	Amstrongs de distancia entre cada grupo funcional y aminoácido proteico
Modelaje por homología de CFTR mutantes	RMSD % de identidad	RMSD menor a 2 y porcentaje de identidad mayores a 60%
Acoplamiento molecular	Puntos rotables, densidad, superficie polar, señalización	Distancias en Amstrongs

13.6 Procesamiento y análisis de la información

El análisis de los datos es inherente a los procesos informáticos que se utilizan para el desarrollo de la investigación. Por lo mismo, solo fue necesario estadística descriptiva para la finalización y presentación de los resultados. No corresponde hacer uso de regresión o correlación, ya que no se trabaja sobre un grupo de muestras, sino sobre cuantificaciones realizadas *in silico*.

14. Vinculación, difusión y divulgación

Se trabajó de forma colaborativa entre la Facultad de Ciencias Médicas y la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia; además, se buscó la colaboración de la Asociación Guatemalteca de Fibrosis Quística para socializar datos de interés para sus asociados.

15. Resultados

Se presentan los resultados de la revisión sistemática sobre las mutaciones más frecuentes registradas en poblaciones latinoamericanas para CFTR (tabla 1).

Tabla 1. Mutaciones más frecuentes en Latinoamérica para CFTR

Clase	Mutación	% por país								
		Cuba ¹¹	Venezuela ¹²	México ¹³	Ecuador ¹⁴	Chile ¹⁵	Uruguay ¹⁶	Argentina ¹⁷	Colombia ¹⁸	Brasil ¹⁹
II	F508	33.8	26.19	45	37.1	30.6	40.4	58.64	41.8	39.9
I	G542X	4.6	3.3	5	2.4	2.4	5.7	4.1	3.8	6.2
I	R1162X	2.3	1.43	ND	ND	ND	2.9	0.45	1.1	4.4
IV	R334W	2.3	ND	ND	0.8	3.1	1.9	1.14	0.5	2.6
I	R553X	1.5	ND	ND	ND	1.2	ND	0.23	ND	0.5
III	G551D	ND	ND	ND	1.6	ND	ND	ND	ND	ND
III	G551S	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
I	W1282X	ND	0.48	ND	ND	ND	ND	2.73	1.1	1.6
II	N1303K	ND	0.95	1.25	2.4	ND	2.9	2.73	ND	2.6
II	G85E	ND	ND	ND	8.9	ND	2.9	0.68	ND	2.3
V	3849 + 10 kb C→T	ND	ND	2.5	ND	1.7	ND	0.91	0.5	1.3
II	S549N	ND	0.48	1.25	ND	ND	ND	ND	2.2	ND
I	621 + 1 G→T	ND	ND	1.25	ND	ND	ND	ND	ND	0.3
	Sin detectar	57	63.33	44.75	46.8	58.0	28.9	16.95	59	37

ND; no determinado



Figura 1. Recientes avances en investigación en genisteína y fibrosis quística.

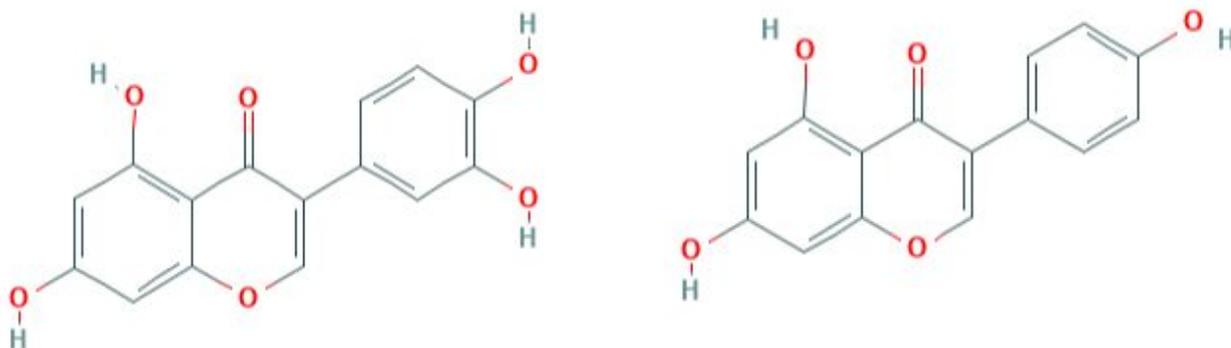


Figura 2. Genisteína CID: 5280961 y 3-hidroxigenisteína CID: 5281801

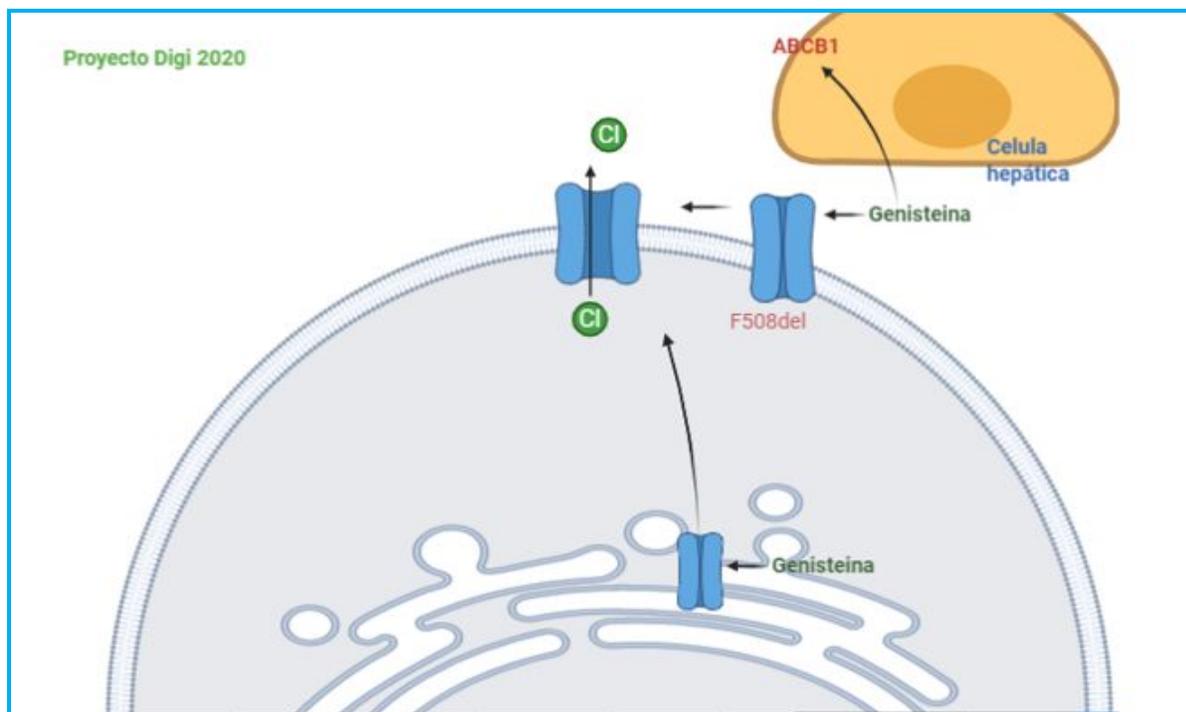


Figura 3. Mecanismo de genisteína en CFTR

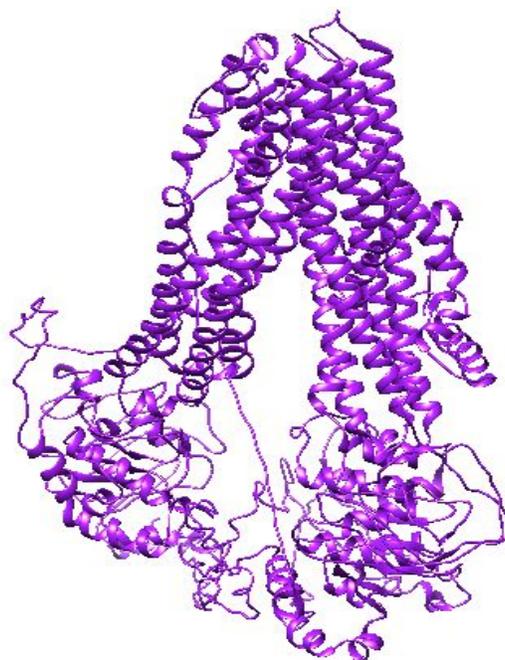


Figura 4. Representación de Cartoon modelaje por homología de G85E-I-Tasser

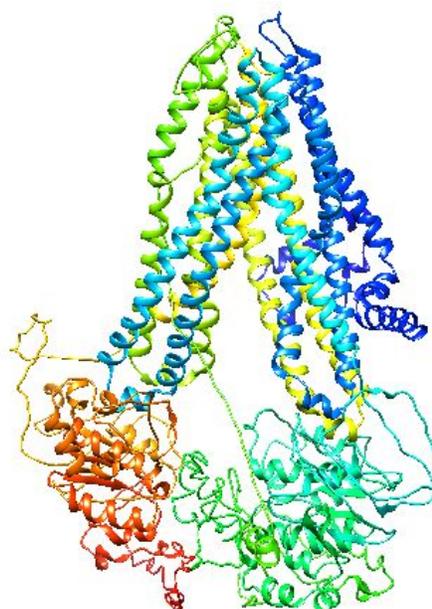


Figura 5. Representación de Cartoon modelaje por homología de n1303k I-Tasser

Tabla 2. Resultados de modela por homología

critério	C-score	Exp.TM-Scor e	Exp.RMS D	No.of decoys	Cluster density
Modelaje E85G	-1.34	0.55+-0.15	13.2+-4.1	282	0.027
Modelaje n1303k	-1.40	0.54+-0.15	13.4+-4.1	267	0.0254
Modelaje n549s	-1.17	0.57+-0.15	12.8+-4.2	303	0.032

Tabla 3. Modelos en bases de datos

Variante	Código Protein model data base	ClinVar NCBI
G85E	PMDB: PM0083447	NM_000492.4(CFTR):c.254G>A (p.Gly85Glu) NM_000492.4(CFTR):c.3909C>G
n1303k	PMDB: PM0083450	(p.Asn1303Lys)
s549n	PMDB: PM0083452	NM_000492.4(CFTR):c.1646G>A (p.Ser549Asn)

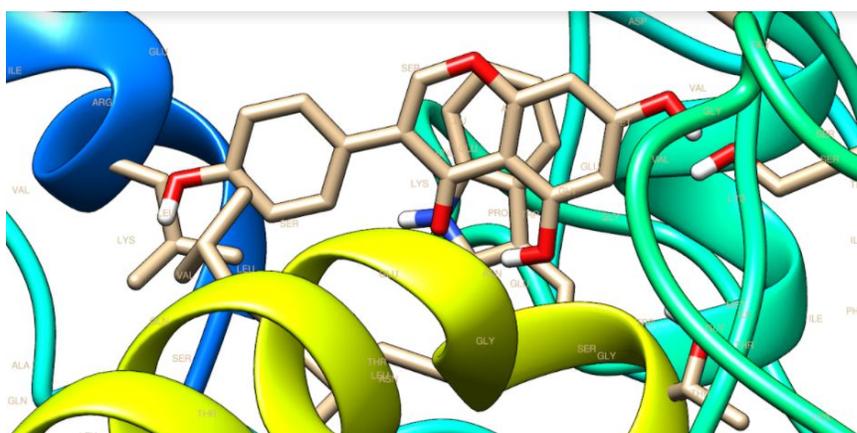


Figura 9. Acoplamiento molecular 3-hidroxigenisteína N549S

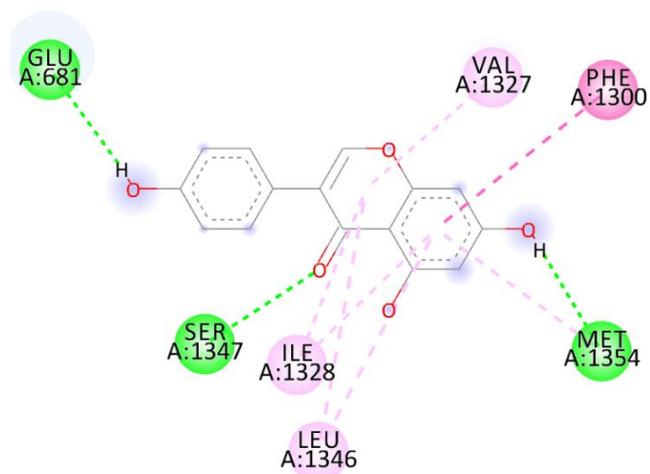


Figura 10. Acoplamiento molecular 3-hidroxigenisteína G85E

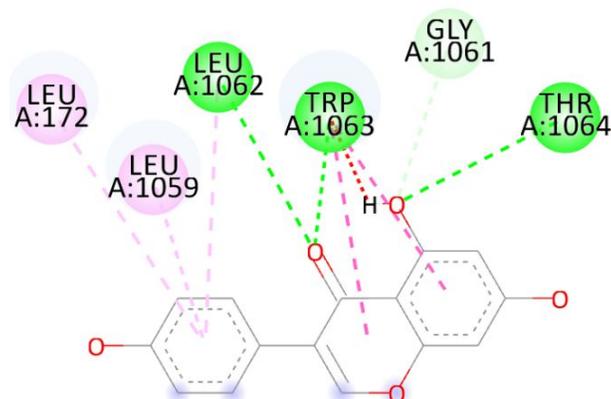


Figura 11. Acoplamiento molecular 3-hidroxigenisteína S549N

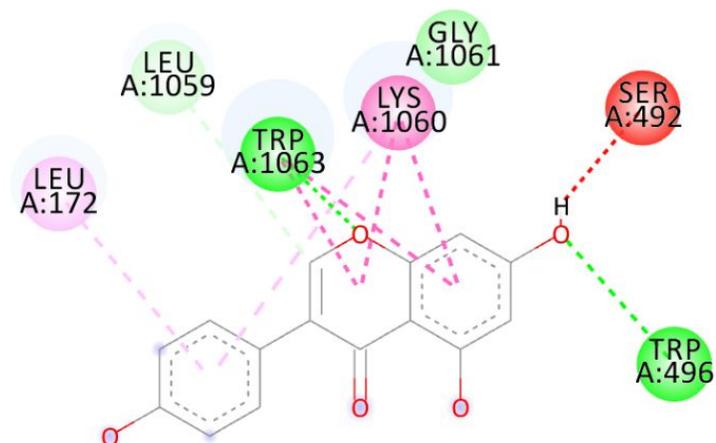


Figura 12. Acoplamiento molecular 3-hidroxigenisteína N1303K

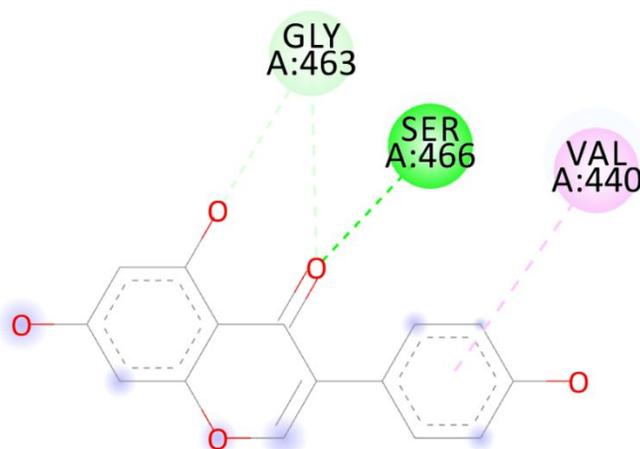


Figura 13. Acoplamiento molecular 3-hidroxigenisteína F508 4WZ6.PDB

16. Análisis y discusión de resultados

Las más de 1,500 mutaciones no son determinadas en Latinoamérica, por lo que se ha limitado a los pacientes a la determinación de mutaciones dentro de paneles comerciales que en su mayoría detectan entre 20 y hasta 40 mutaciones “más frecuentes”; de tal cuenta, los resultados muestran cerca de un 50 % de mutaciones no determinadas ND (tabla 1) sin embargo, es posible distinguir que las frecuencias son distintas en cada país, producto de su composición genética como población. Este estudio revisó ampliamente la literatura existente en Latinoamérica, encontrando la mutación $\Delta F508$ como la más frecuente, lo que coincide con lo que se espera en datos globales con un promedio de 39.27 % para esta mutación, seguida de otras 3 mutaciones clase II que fueron incluidas en este estudio. G85E, N1303K, S549N. Las mutaciones clase I no fueron incluidas debido a que representan una muy baja probabilidad terapéutica con Genisteína, debido a que son proteínas incompletas cuyo mecanismo de acción no es viable. Las mutaciones

clase III como G551D, la cual ha demostrado efectividad con Ivacaftor no fue incluida por su poco porcentaje presente en Latinoamérica y su ya ampliamente estudiada efectividad con fármacos como Lumacaftor. Mutaciones clase IV o V, no fueron incluidas por su poco porcentaje en Latinoamérica.

Guatemala debe realizar esfuerzos urgentes por detectar, a través de tamizaje neonatal, a pacientes con fibrosis quística y luego determinar las mutaciones, a fin de determinar las frecuencias mayoritarias y ofrecer mejores opciones de tratamiento a dichos pacientes.

La evidencia de efectividad de la cumarina, genisteína entre otras más moléculas de origen natural ha sido documentada, resaltando en 2010 con revisiones que afirman toda la información previa sobre el tema, para en 2015 demostrar con ensayos en animales su posible eficacia. Un ensayo de efectividad para S1045Y fue publicado en 2016, sin embargo, los estudios más prometedores fueron publicados en 2017 con una actividad potenciadora *in vitro*, en combinación con otros tratamientos. También en 2019 una combinación de genisteína con Ivacaftor demostró impacto en ABCA3 una actividad potenciadora en CFTR. Finalmente, en 2020 fue publicado un sinergismo potenciador de la actividad farmacológica de Genisteína e Ivacaftor, además de un mecanismo que podría estar implicado en el dímero NBD1 y NBD2 (figura 1).

En estudios *in silico* es importante seleccionar el metabolito activo para los ensayos, por lo que la genisteína no fue utilizada en este estudio, sino la 3-hidroxigenisteína (figura 2), esto debido a que la genisteína sufre una hidroxidación al ingresar al organismo y resulta improbable que la molécula genisteína llegue a interactuar con el CFTR, aunque sí es probable que la 3-hidroxigenisteína, un metabolito activo de la Genisteína logre ejercer un efecto farmacodinámico. La 3-hidroxigenisteína no es el único metabolito activo de la Genisteína, pero en este estudio fue seleccionado por su ya documentado metabolismo en el citocromo p450 en la región 1A 2 CYP1A2.

El mecanismo de un fármaco candidato a interactuar con CFTR puede ser por medio de un mecanismo corrector o potenciador, la propuesta expuesta en esta investigación, se basa en la

revisión de literatura y características farmacofóricas de la genisteína, como un mecanismo potenciador de CFTR en mutaciones clase II, (figura 3). El mecanismo potenciador permite al canal de ion cloro CFTR abrirse y permanecer abierto ante la presencia del ion cloro.

Las mutaciones clase II como la $\Delta F508$, han sido objetivos terapéuticos más importantes debido no solamente a su alta prevalencia, sino a su mecanismo de potenciar y corregir. Esta mutación ha sido ampliamente documentada, incluso es posible encontrarla en bancos de proteínas bajo el código 4WZ6.PDB, la cual fue utilizada en este trabajo para acoplamiento molecular con Genisteína. Sin embargo, las cerca de 1,600 mutaciones no se encuentran en bancos de proteínas por lo que las proteínas G85E, N1303K y S549N, fueron modeladas por homología en este estudio. (figura 4 y 5).

Los modelajes se realizaron con un C-Score de -1.34, -1.40 y -1.17 respectivamente (tabla 2), lo que representa los mejores modelos generados en cada ejecución con I-Tasser software. La desviación estándar media para la proteína en 3 dimensiones fue calculada con un RMSD y cada modelo fue verificado en calidad con criterios de densidad y TM-Score. Un ploteo de Ramachandran también fue generado para cada modelo (figura 6, 7 y 8) con ángulos psi/phi aceptables en cada caso. La reproducibilidad de los experimentos puede ser corroborada en el banco *protein model data* base PMDB, donde los modelos por homología fueron incluidos durante la generación de este trabajo (tabla 3).

El acoplamiento molecular, también conocido como *Docking*, fue realizado para la 3-hidroxigenisteína y cada modelo por homología, así como para la 4WZ6.PDB correspondiente a la F508. Los acoplamientos fueron realizados en Autogrid y Autodock (tabla3). Los cálculos de ataque se realizaron utilizando DockingServer (*Bikadi, Hazai, 2009*). Se añadieron cargas parciales de Gasteiger a los átomos del ligando. Los átomos de hidrógeno no polares se fusionaron y se definieron enlaces rotativos. Los cálculos de acoplamiento se realizaron en el modelo de proteína 3-hidroxigenisteína. Se agregaron átomos de hidrógeno esenciales, cargas

de tipo átomo unido de Kollman y parámetros de solvatación con la ayuda de herramientas AutoDock (*Morris, Goodsell et al., 1998*).

Se generaron mapas de afinidad (cuadrícula) de puntos de cuadrícula $\times \times \text{Å}$ y espaciado de 0.375 Å utilizando el programa Autogrid (*Morris, Goodsell et al., 1998*). Se utilizaron funciones dieléctricas dependientes de la distancia y el conjunto de parámetros de AutoDock en el cálculo de los términos de van der Waals y electrostáticos, respectivamente. Las simulaciones de ataque se realizaron utilizando el algoritmo genético de Lamarck (LGA) y el método de búsqueda local de Solis & Wets (*Solis y Wets, 1981*). La posición inicial, la orientación y las torsiones de las moléculas de ligando se establecieron al azar. Todas las torsiones giratorias se liberaron durante el acoplamiento. Cada experimento de acoplamiento se derivó de dos ejecuciones diferentes que se establecieron para finalizar después de un máximo de 250000 evaluaciones de energía. El tamaño de la población se estableció en 150. Durante la búsqueda, se aplicaron un paso de traslación de 0,2 Å y pasos de cuaternión y torsión de 5.

Las kilocalorías por mol Kcal/mol obtenidas representan la afinidad de la 3-hidroxigenisteína por los sitios activos de las proteínas, mostrando una energía de acoplamiento espontánea entre el ligando y el sitio activo. Los aminoácidos Glu 681, Val1327, Phe1300, Ser1347, Ile1328, Leu1346 y Met 1354 fueron los acoplamientos aminoacídicos para el ligando en G85E, comparado con Ser466 Gly 463 y Val440 de 4WZ6.PDB de F508. (Figura 10, 11, 12 y 13). Los acoplamientos representan la señalización molecular entre el metabolito activo de Genisteína en las variantes clínicas de CFTR, provocando su actividad potenciadora.

17. Conclusiones

- Las mutaciones para CFTR más frecuentes en Latinoamérica son F508Del, G85E, N1303K y S549N y existe afinidad entre la 3-hidroxigenisteína y las variantes clínicas de CFTR estudiadas
- El cambio de energía de interacción Genisteína-CFTR fue determinada en -8.5, -7.8, -7.6 y -6.3 Kcal/mol para G85E, N1303K, S549N y F508 respectivamente.
- La 3-hidroxigenisteína, realiza un posible mecanismo potenciador de la CFTR por su interacción molecular con los aminoácidos Val1327, Ser 1347, Leu1346, Ile1328 en G85E. Leu1062, Thr1064, Trp1063, Leu1059 en S549N, Leu1059, Trp1063, Lys1060 en N1303K, Gly463, Ser466, Val440 en F508.
- Los modelajes por homología para G85E, N1303K y S549N, fueron generados y publicados en PMDB códigos PM0083447, PM0083450 y PM0083452 respectivamente

18. Impacto esperado

En el ámbito latinoamericano existen mutaciones genéticas más frecuentes que en otras latitudes. Dichas características genéticas no han sido estudiadas en el marco del tratamiento de la fibrosis quística; una condición que genera desventajas en cuanto al acceso a terapias con eficacia y seguridad demostrada para las poblaciones latinoamericanas, que poseen mutaciones distintas a las más frecuentes de población caucásica. Por lo tanto, este proyecto de investigación ha incluido mutaciones hasta ahora excluidas de posibilidades de tratamiento y excluidas de ensayos clínicos, lo que deriva en inclusión de más mutaciones conocidas en estudios para tratamientos posibles de fibrosis quística. Permitiendo de tal manera que poblaciones latinoamericanas y guatemaltecas sean incluidas en trabajos que citen el presente trabajo.

19. Referencias bibliográficas

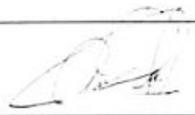
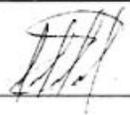
- Abbott, J.D., Dodd, M., Bilton, D. & Webb, A.K. (1994). Treatment compliance in adults with cystic fibrosis. *Thorax*, 49(2), 115-120.
- Bikadi, Z., Hazai, E. (2009) La aplicación del método semi-empírico PM6 para modelar proteínas mejora la precisión de acoplamiento de AutoDock J. Cheminf. 1 , 15
- Cavasotto, C.N., Phatak, S.S. (2009). Homology modeling in drug discovery: current trends and applications. *Drug discovery today*, 14(13-14), 676-683.
- Cheadle, J.P. (1994). Population variation of common cystic fibrosis mutations. *Human Mutation*, 4(3), 167-177.
- Dixon, R.A., Ferreira, D. (2002). Genistein. *Phytochemistry*, 60(3), 205-211.
- Dey, I., Shah, K., Bradbury, N.A. (2016). Natural compounds as therapeutic agents in the treatment cystic fibrosis. *Journal of genetic syndromes & gene therapy*, 7(1).
- Fielbaum, C.Ó. (2011). Avances en fibrosis quística. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 22(2), 150-159.
- FJ Solis y RJB (1981) Minimización de mojados mediante técnicas de búsqueda aleatoria Matemáticas de la investigación de operaciones 6 (1) , 19-30
- Friesner, R.A., Banks, J.L., Murphy, R.B., Halgren, T.A., Klicic, J.J., Mainz, D.T., Shaw, D.E. (2004). Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy. *Journal of medicinal chemistry*, 47(7), 1739-1749.
- GM Morris, DS Goodsell, et al. (1998) Acoplamiento automatizado utilizando un algoritmo genético lamarckiano y una función empírica de energía libre de enlace Journal of Computational Chemistry 19 (14) , 1639-1662
- Hillisch, A., Pineda, L.F., Hilgenfeld, R. (2004). Utility of homology models in the drug discovery process. *Drug discovery today*, 9(15), 659-669.
- Jaffe, A., Bush, A. (2001). Cystic fibrosis: review of the decade. *Monaldi archives for chest disease*, 56(3), 240-247.
- Krieger, E., Nabuurs, S.B., Vriend, G. (2003). Homology modeling. *Methods of biochemical analysis*, 44, 509-524.
- Liu, F., Zhang, Z., Csanády, L., Gadsby, D., Chen, J. (2017). Molecular Structure of the Human CFTR Ion Channel. *Cell*, 169, 85-95.
- MacDonald, K.D., McKenzie, K.R., & Zeitlin, P.L. (2007). Cystic fibrosis transmembrane regulator protein mutations. *Pediatric drugs*, 9(1), 1-10.

- Rose, A., Bradley, A., Valasatava, Y., Duarte, J., Prlic, A., Rose, P. (2018). NGL viewer: web-based molecular graphics for large complexes. *Bioinformatics*, 34(21), 3755-3758.
- Rosenstein, B.J., Cutting, G.R. (1998). The diagnosis of cystic fibrosis: a consensus statement. *The Journal of pediatrics*, 132(4), 589-595.
- Sontag, M.K., Hammond, K.B., Zielenski, J., Wagener, J.S., Accurso, F.J. (2005). Two-tiered immunoreactive trypsinogen-based newborn screening for cystic fibrosis in Colorado: screening efficacy and diagnostic outcomes. *The Journal of pediatrics*, 147(3), S83-S88.
- Szkudelska, K., Nogowski, L. (2007). Genistein—a dietary compound inducing hormonal and metabolic changes. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 105(1-5), 37-45.
- TA Halgren (1998) Merck campo de fuerza molecular. I. Base, forma, alcance, parametrización y rendimiento de MMFF94 *Journal of Computational Chemistry* 17 (5-6) , 490-519
- Terstappen, G.C., Reggiani, A. (2001). In silico research in drug discovery. *Trends in pharmacological sciences*, 22(1), 23-26.
- Tsui, L.C. (1992). The spectrum of cystic fibrosis mutations. *Trends in Genetics*, 8(11), 392-398.
- Wainwright, C.E., Elborn, J.S., Ramsey, B.W., Marigowda, G., Huang, X., Cipolli, M., Konstan, M.W. (2015). Lumacaftor–ivacaftor in patients with cystic fibrosis homozygous for Phe508del CFTR. *New England Journal of Medicine*, 373(3), 220-231.
- Wegrzyn, G., Jakóbkiewicz-Banecka, J., Gabig-Cimińska, M., Piotrowska, E., Narajczyk, M., Kloska, A., Węgrzyn, A. (2010). Genistein: a natural isoflavone with a potential for treatment of genetic diseases. *Biochem Soc Trans.* 38(2), 965-701.
- Wegrzyn, G., Pierzynowska, K., Podlacha, M., Brokowska, J., Gaffke, L., Mantej, J., Puchalski, M. (2018). Molecular mechanisms of genistein action in the light of therapies for genetic and immunological diseases. *Postepy biochemii*, 64(4), 262-276.
- Zeitlin, P.L. (1999). Novel pharmacologic therapies for cystic fibrosis. *The Journal of clinical investigation*, 103(4), 447-452.

**Listado de los integrantes del equipo de investigación
Contratados por contraparte y colaboradores**

Nombre	Firma
Lic. Christian Daniel Farfán Barrera	
Dr. Luis Manuel López Dávila	

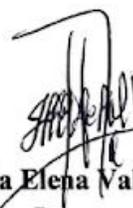
Contratados por la Dirección General de Investigación

Nombre	Categoría	Registro de Personal	Pago		Firma
			SI	NO	
Br. Amanda Hernández Tzorín	Auxiliar de Investigación	20190190	X		
Lic. Rodrigo José Vargas Rosales	Investigador	20080978	X		
Lic. Oscar Hugo Machuca Coronado	Investigador	20040118	X		

Guatemala, 14 de enero 2021.



Christian Daniel Farfán Barrera
Coordinador Proyecto de Investigación



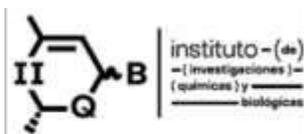
Dra. Hilda Elena Valencia de Abril
Coordinador Programa Universitario
de Investigación Interdisciplinaria en Salud



Ing. Julio Rufino Salazar
Coordinador General de Programas



USAC
TRICENTENARIA
Universidad de San Carlos de Guatemala



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICAS Y BIOLÓGICAS

REF.IIQB.014.01.2021

Guatemala, 18 de enero del 2021

Señor Director
Dr. Félix Alan Douglas Aguilar Carrera
Director General de Investigación
Universidad de San Carlos de Guatemala

Señor Director:

Con un cordial saludo me dirijo a usted para adjuntar el informe final del proyecto: **“Dilucidación del mecanismo corrector por el cual la genistéina, un producto natural, actúa sobre CFTR en fibrosis quística en poblaciones latinoamericanas”** con partida presupuestal 4.8.63.6.12.000, **coordinado por el M.Sc. Christian Daniel Farfán Barrera** y avalado por el Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

Este informe final fue elaborado con base en la guía de presentación de la Dirección General de Investigación, el cual fue revisado su contenido en función del protocolo aprobado, por lo que esta unidad de investigación da la aprobación y aval correspondiente.

Asimismo, el coordinador del proyecto, se compromete a dar seguimiento y cumplir con el proceso de revisión y edición establecido por DIGI del **informe final y del manuscrito científico**. El manuscrito científico debe enviarse, por el coordinador del proyecto, para publicación, al menos, en una revista de acceso abierto (*Open Access*) indexada y arbitrada por expertos en el tema investigado.

Sin otro particular, suscribo atentamente.

“Id y enseñad a todos”

M.A. Christian Daniel Farfán Barrera
Coordinador del Proyecto

Dra. María Eunice Enríquez Cotto
Directora

Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas



c.c. archivo
MEEC/tvch.