

**Título: Predicción virtual y corroboración experimental de compuestos con otros usos farmacológicos frente a *Trichomonas vaginalis***

**Autores: Alfredo Meneses Marcel<sup>1</sup>, Yovani Marrero Ponce<sup>1</sup>, José Antonio Escario García Trevijano<sup>2</sup>, Alicia Gómez Barrio<sup>2</sup>, Alina Montero<sup>1</sup>**

**1- Universidad Central de Las Villas**

**2- Universidad Complutense de Madrid. España**

**RESUMEN**

*Trichomonas vaginalis* es un protozoo parásito que causa una enfermedad de transmisión sexual conocida como tricomonosis. Afecta principalmente a la mujer en la que produce síntomas que puede llegar a ser graves. El tratamiento de la enfermedad se realiza a través de metronidazol, pero ya se ha encontrado cierta resistencia del protozoo a este fármaco. En los últimos años se ha venido incrementando el cribado virtual para la búsqueda de nuevos principios activos, disminuyendo el tiempo y el coste de recursos, siendo el objetivo principal de este trabajo identificar compuestos con otros usos farmacológicos activos frente a *T. vaginalis* mediante el desarrollo secuencial y coordinado de ensayos *in silico*, *in vitro* e *in vivo*. En primer lugar, se recopiló de la literatura internacional una base de datos conformada por 123 compuestos activos e inactivos. De este conjunto de compuestos 50 tienen actividad tricomonocida. Cada compuesto de la base de datos fue parametrizado usando los índices cuadráticos, lineales y bilineales estocásticos y no estocásticos (tanto totales como locales) basados en relaciones de átomos y de enlaces, los cuales fueron calculados con el programa **TOMOCOMD-CARDD**. Posteriormente, el análisis de conglomerados (*clusters*) fue empleando para el diseño “racional” de la serie de aprendizaje (SE, 91 compuestos) y de predicción (SP, 22 compuestos). Se obtuvieron un total de 12 modelos de clasificación con estos índices y el uso del análisis discriminante lineal. Todos los modelos fueron evaluados utilizando procedimientos de validación interna (validación cruzada *leave-10%-out*) y externa empleando una SP. Además, la calidad predictiva de los modelos fue controlada usando una segunda serie de compuestos de los que se conoce la actividad frente a *T. vaginalis*, comparando ésta con la predicción obtenida por los modelos. Finalmente, cada uno de los modelos se utilizó para estimar *in silico* la actividad de 71 nuevos compuestos de síntesis y de 544 compuestos divididos en 174 con actividad frente a otros protozoos y 370 con otros usos farmacológicos. Los resultados *in vitro* (usando la cepa ATCC JH31 A#4 de *T. vaginalis*) mostraron una adecuada concordancia entre las predicciones para los 9 fármacos seleccionados con otros usos farmacológicos. Los productos con mejores resultados experimentales fueron seleccionados para ensayos *in vivo* utilizando un modelo utilizando ratones NMRI infectados por vía intraperitoneal y tratados por vía oral con productos de síntesis (VA5-10, VA2-25, VA7-67, VA7-69, VA8-34, VA2-38 y VA5-5b) y con compuestos utilizados para otros usos (benznidazol; nihidrazona y nitrofenida). Los resultados *in vivo* indicaron que de todos los productos identificados como *bioactivos* por los modelos teóricos, el benznidazol es el compuesto más prometedor, el cual deberá ser optimizados con el propósito de encontrar nuevas alternativas terapéuticas.

## 1. INTRODUCCIÓN

La tricomonosis humana es una enfermedad causada por el protozoo *Trichomonas vaginalis*. Este afecta mayormente a las mujeres produciendo una vulvovaginitis que puede variar desde leve hasta grave, pudiendo además dañar la uretra y el endocervix (Egan y Lipsky, 2000; Adad y col., 2001). Las variadas formas clínicas de la enfermedad dependen tanto de condiciones intrínsecas como extrínsecas, principalmente del número y virulencia del parásito y de la resistencia del hospedador. Se plantea que los síntomas son mayores cuanto mayor es el número de parásitos y cuanto más alcalino sea el pH vaginal (Fernández y Fernández, 2004). En el hombre el microorganismo habita en la uretra, próstata y vesículas seminales (Hobbs y col., 1999), pero rara vez produce uretritis o algún otro síntoma. Una de las razones de este comportamiento se ha atribuido a la presencia de zinc contenidas en su semen que tienen capacidad tricomonocida (Rein, 1995; Vázquez y col., 2001). La importancia de conocer el grupo de individuos asintomáticos radica en que ellos actúan como portadores “sanos” y pueden transmitir sexualmente el parásito a otras personas (Llop y col., 2001).

Recientemente, se ha asociado tricomonosis al cáncer cervical, enfermedad inflamatoria pélvica atípica, esterilidad y a una predisposición a la infección con VIH, debido a la acumulación local de linfocitos y macrófagos (Laga y col., 1991). La infección en mujeres embarazadas provoca un mayor riesgo de ruptura prematura de las membranas de la placenta, niños con bajo peso al nacer (Cotch y col., 1997), además de infecciones postquirúrgicas del tracto reproductor (Álvarez y col., 2000; Núñez, 2001).

Desde el punto de vista epidemiológico la tricomonosis es una de las enfermedades de transmisión sexual (ETS) no vírica más importante en el mundo. Recientemente a estas ETS se les ha denominado *Infecciones de Transmisión Sexual* (ITS) (García, 1993). Su distribución es cosmopolita y afecta a todos los grupos raciales y estratos socioeconómicos. Según datos de 2001, la Organización Mundial de la Salud estima que anualmente se infectan entre 170 y 180 millones de personas; sin embargo, no se conocen las cifras exactas de esta enfermedad, pues los datos de la prevalencia e incidencia son limitados (WHO, 2001a).

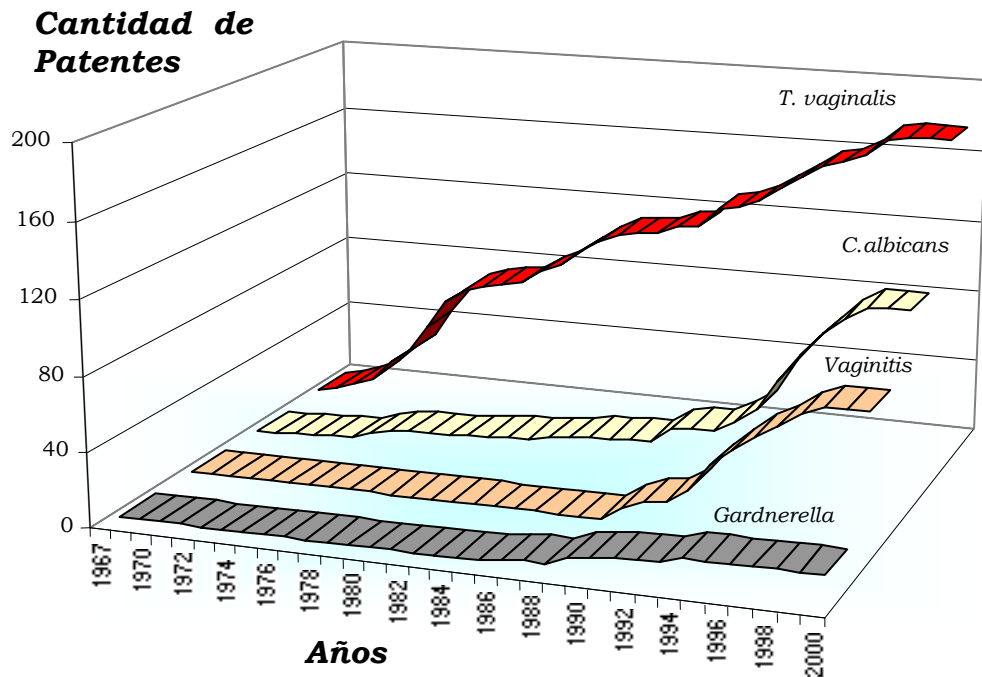
En los países desarrollados todas las ITS han estado sometidas a un incremento constante. La Organización Mundial de la Salud (OMS, 1995) ha estimado que de 120 a 180 millones de personas se infectan anualmente en el mundo. En Estados Unidos se infectan cada año aproximadamente entre 5 y 8 millones de personas y de ellos, un 50 % de los casos son asintomáticos (Hook, 1999; Petrin y col., 1998). Aunque en regresión, (7,4 millones de casos anuales en el año 2000) sigue siendo la infección sexual transmitida más frecuentemente al

compararla con *Chlamydia trachomatis* (3 millones de casos anuales) o *Neisseria gonorrhoeae* (718 000 casos anuales) (Lister y col. 2006).

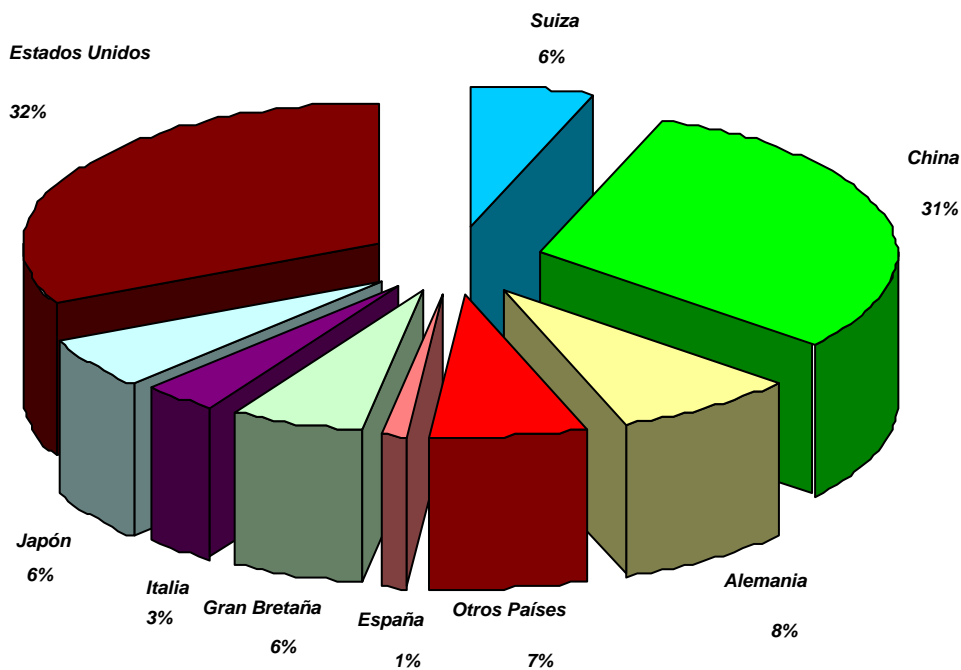
El control fundamental de la enfermedad se ha basado en el tratamiento farmacológico (WHO, 1997). No obstante, en la actualidad es frecuente encontrar en los microorganismos ciertos mecanismos de resistencia a la actividad de fármacos que constituían hasta hace poco la piedra angular en el tratamiento de las afecciones provocadas por éstos. Si a esto le añadimos las contraindicaciones y los efectos adversos que muchos de ellos presentan, se nos reduce cada vez más el número de fármacos de que disponemos (Upcroft y col., 2006).

Lo planteado anteriormente hace que en los momentos actuales la búsqueda de nuevos fármacos tricomonocidas se haya convertido en un aspecto fundamental para poder contrarrestar la enfermedad. Así por ejemplo, la cantidad de patentes generadas en el año 1998 de nuevos productos con actividad frente a *T. vaginalis* ascendía a 180 patentes solicitadas (Díaz, 2001). La Figura 1.1 muestra la cantidad de patentes solicitadas entre los años 1967 - 2000. La pendiente de la curva que describe el comportamiento de las patentes solicitadas para compuestos activos frente a *T. vaginalis* nos indica que este tipo de productos farmacéuticos tiene un gran interés socio-económico, constituyendo un sector atrayente para la generación de nuevas soluciones y para la inversión en nuevas líneas de Investigación – Desarrollo.

El origen de las patentes relacionadas con el tratamiento de estos microorganismos en general, como se muestra en la Figura 1.2, se concentra en dos países fundamentalmente: Estados Unidos con un 32% de las mismas, y China con un 31% aproximadamente. Le sigue Alemania con un 8% y luego Japón, Suiza y Gran Bretaña, muy similares, con 6% cada uno (Díaz, 2001).



**Figura 1.1** Tendencia evolutiva de las patentes solicitadas entre 1967 y 2000 para el tratamiento de vaginitis.



**Figura 1.2** Países de origen de las patentes.

Todos estos resultados evidencian el gran esfuerzo internacional que durante todo este período se ha desarrollado con el propósito de encontrar nuevas entidades moleculares (NEM) activas frente *T. vaginalis* y menos tóxicas que los fármacos actuales. Sin embargo, en la

actualidad el metronidazol sigue siendo el medicamento de elección de la terapia tricomonocida en muchos países e incluso en algunos de ellos se utilizan como el único medicamento disponible para el tratamiento de mujeres embarazadas (Pickering y col., 2005). Varios autores han planteado que la terapia con los nitroimidazoles durante el embarazo sigue siendo polémica, existiendo pocas alternativas para el tratamiento y en la mayoría de los casos estos tienen eficacia limitada y una toxicidad elevada (Nanda y col., 2006).

El gran coste y la lentitud del proceso de descubrimiento y optimización de nuevos candidatos a fármacos del método tradicional, basados en ensayos de “*prueba y error*”, hacen imposible que las industrias farmacéuticas puedan dar una respuesta efectiva a las crecientes demandas de esta enfermedad (Tollman, 2001; Seifert y col., 2003). Este método es cada vez más ineficaz, siendo necesario ensayar más de 10.000 compuestos para encontrar el deseado (Mosqueira, 1994; Seifert y col., 2003). Un estudio reciente llevado a cabo por el *Boston Consulting Group* (BCG) y que involucró a 50 compañías e instituciones académicas, mostró que el coste de desarrollo de un nuevo medicamento desde la identificación de su diana farmacológica, el descubrimiento y optimización de uno de los nuevos compuestos líderes, el desarrollo de los ensayos clínicos requeridos y su uso autorizado en terapéutica es como promedio de 880 millones de dólares (USD) y se necesita también como promedio un período de 15 años de investigación (Tollman, 2001). Además, 7 de cada 10 medicamentos no recuperan su coste (PhARMA Industry Profiles, 2000). Estas características desfavorables (inefectividad, alto coste y gran consumo de tiempo) hacen el método “tradicional” de evaluación al *azar* inaplicable para los países en vías de desarrollo e incluso para las grandes multinacionales farmacéuticas (Seifert y col., 2003).

Los métodos *in silico* son una de las pocas técnicas que han tenido y tienen potencial para mejorar significativamente el descubrimiento y posterior desarrollo de fármacos. Así por ejemplo, la aplicación de las nuevas tecnologías de la genómica, ha contribuido a ahorrar como promedio 140 millones de USD y 0.9 años de investigación por cada fármaco. Asimismo, según la BCG, las técnicas *in silico* (químico- y bio-informáticas) ahorran un promedio de 130 millones de USD y 0.8 años por cada fármaco (Tollman, 2001).

De forma adicional, podemos plantear que el número de compuestos conocidos sobrepasa los 26 millones (<http://www.cas.org/cgi-bin/regreport.pl>), y aunque un gran número de estos (>1.000.000) está disponible en diferentes bases de datos químicas, muchos de ellos no han encontrado todavía aplicaciones farmacológicas o de otro tipo. Esto es consecuencia de la diferencia (desfase) que existe entre la velocidad a la cual las NEM son sintetizadas y el

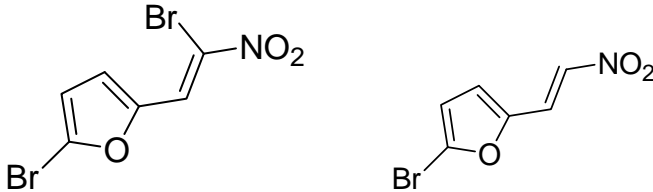
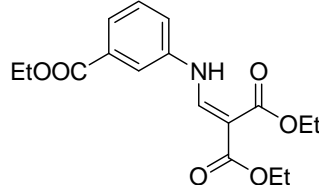
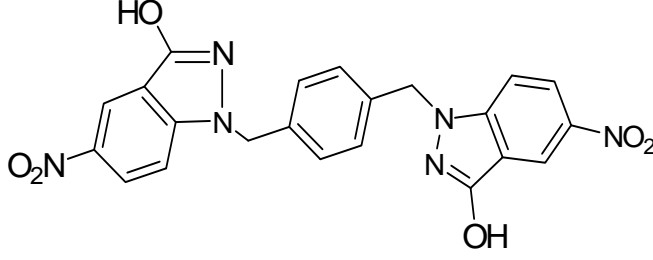
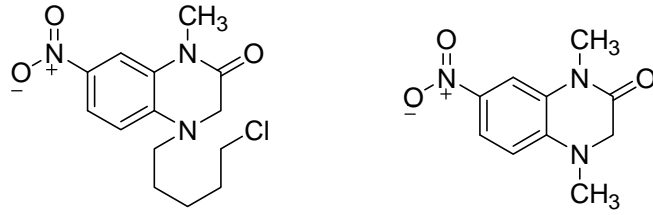
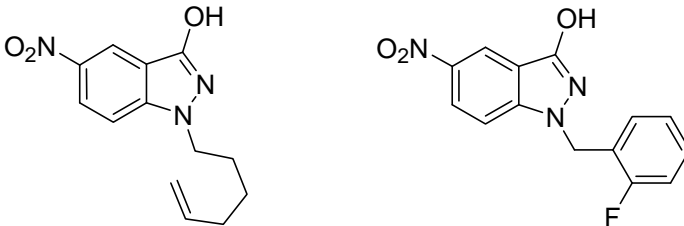
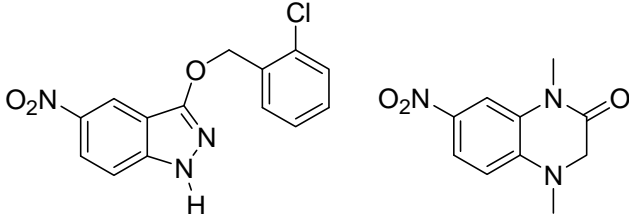
número de compuestos que pueden ser evaluados en ensayos farmacológicos, toxicológicos y farmacocinéticos (Estrada y Uriarte, 2001).

En la actualidad, el “*screening*” *virtual* de bibliotecas químicas (Walters y col., 1998) ha emergido como una nueva alternativa (Hann y Green, 1999; Venkatesh y Lipper, 2000). Por este medio, varias técnicas computacionales son usadas para seleccionar un reducido número de compuestos potencialmente activos de una gran biblioteca química o combinatoria que esté disponible, a la cual podemos llamar base de datos estructural. *El principal objetivo de este enfoque es discriminar las moléculas que constituyen potentes candidatos, de las inactivas o de las moléculas menos potentes.*

Si tenemos en cuenta que el paso limitante en el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos continúa siendo la identificación y la optimización de nuevos compuestos líderes de un modo efectivo (en el menor tiempo posible y a un coste razonable), el enfoque de diseño/descubrimiento de fármacos asistido por ordenador ofrece una alternativa para el mundo real de síntesis y evaluación (Venkatesh y Lipper, 2000). Este procedimiento engloba todas las técnicas asistidas por ordenador usadas en el diseño/descubrimiento y optimización de compuestos con propiedades deseadas y ha jugado un papel fundamental en el desarrollo de diversos fármacos que están ahora en el mercado (Ooms, 2000). Este tipo de estudio se basa en el uso de un mundo “virtual” de hipótesis, generadas por ordenador y probadas en la práctica. El procedimiento “*in silico*” evita costosas tareas de síntesis y bio-ensayos, que se hacen solamente después de la exploración de los conceptos iniciales con modelos QSAR (*Quantitative Structure Activity Relationship*) (Hann y Green, 1999). Es decir, en los momentos actuales se está evidenciando “*un cambio*” en los paradigmas del descubrimiento de nuevos fármacos. En este sentido, la utilización de modelos de predicción *in silico* han demostrado que pueden ser usados en el descubrimiento “*racional*” de nuevos fármacos, acelerando el proceso de selección de nuevos compuestos líderes bioactivos. Por tanto, *los métodos computacionales tienen el potencial para transformar el descubrimiento de fármacos en sus etapas iniciales, con un consecuente ahorro de recursos de todo tipo.*

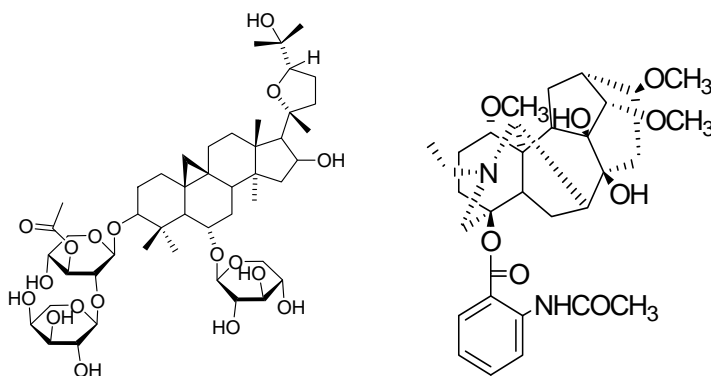
En este contexto, investigadores de la Facultad de Farmacia y del Centro de Bioactivos Químicos de la Universidad Central de Las Villas (UCLV), Cuba, ha venido trabajando, desde hace algún tiempo, en el desarrollo de nuevos sistemas informáticos para el diseño de fármacos asistido por ordenador, entre los que se destacan el **MODEST** (siglas de **MO**lecular **DES**ing **T**ool) (Rodríguez y Estrada, 1995), el **TOSS-MODE** (siglas de **TO**pological **S**ub-**S**tructural **MO**lecular **DE**sing) (Gutiérrez y col., 1995), el **MARCH-INSIDE** (siglas de

**Tabla 1.1** Algunos de los nuevos compuestos antiparasitarios identificados utilizando el enfoque *TOMOCOMD-CARDD* en el cribado virtual.

Actividad	Compuesto Seleccionados	Referencia
Antihelmínticos		Marrero-Ponce y col. 2004a; 2005a
Antimaláricos		Marrero-Ponce y col., 2005b
Antimaláricos		Montero y col., 2006.
Tricomonicidas		Meneses y col., 2005
Tricomonicidas		Marrero-Ponce y col., 2005c
Tripanosomicidas		Montero y col., 2005; Vega y col., 2006

---

Inhibidores de la  
Enzima Tirosinasa



Casañola y col.,  
2006; Marrero  
Ponce y col.;  
Aceptado para  
publicar  
Comb.Sci.

---

**Markov Chain In Silico Design**) (González-Díaz y col., 2003) y el programa **TOMOCOMD-CARDD**, (siglas de **TO**pological **MO**lecular **COM**puter **D**esign-**COM**puter-**A**ided **R**ational **D**rug **D**esign) (Marrero-Ponce y Romero, 2002). Este último enfoque computacional ha permitido el descubrimiento *biosilico* de varios compuestos activos frente a diversas enfermedades de gran impacto social (Marrero-Ponce, 2003; Marrero-Ponce y col., 2003; Marrero-Ponce y col., 2004a,b,c,d,e,f; 2005a,b,c,d,e,f,g,h,i; Meneses y col., 2005; Montero y col., 2005; Casañola y col., 2006; Castillo y col., 2006; Marrero-Ponce y col., 2006; Montero y col., 2006; Marrero-Ponce y col., Aceptado para publicar en *QSAR Comb.Sci*; Marrero-Ponce y col., Aceptado para publicar *J. Comput. Aided Mol. Des*). Así por ejemplo, los modelos de relaciones cuantitativas estructura-actividad (conocidos por su siglas en inglés, QSAR) desarrollados con los diversos descriptores moleculares implementados en este paquete computacional, han posibilitado la predicción de nuevos compuestos potencialmente activos frente a *Plasmodium sp.* (Marrero-Ponce y col., 2005b; Montero y col., 2006), *T. vaginalis* (Meneses y col., 2005; Marrero-Ponce y col.; 2005), *Trypanosoma cruzi* (Montero y col., 2005; Vega y col., 2006), helmintos (Marrero-Ponce y col., 2004a; 2005a) y otros con posible actividad en el tratamiento del cáncer (Casañola y col., 2006; Marrero-Ponce y col., aceptado para publicar Comb.Sci.), y diversas dianas anti-VIH (Marrero-Ponce, 2004a). Algunos de estos nuevos compuestos y sus actividades biológicas determinadas en estudios experimentales son mostrados en la Tabla 1.1. Muchos de estos estudios están todavía en proceso y los resultados que se están obteniendo son muy prometedores en cada una de las propiedades/actividades modelizadas. Sólo en los últimos dos años han aparecido en la literatura internacional más de 25 estudios utilizando este método de diseño y modelizado molecular (Marrero-Ponce, 2003; Marrero-Ponce y col., 2003; Marrero-Ponce y col., 2004a,b,c,d,e,f; 2005a,b,c,d,e,f,g,h,i; Meneses y col., 2005; Montero y col., 2005; Casañola y



col., 2006; Castillo y col. 2006; Marrero-Ponce y col., 2006; Montero y col., 2006; Marrero-Ponce y col., Aceptado para publicar en *QSAR Comb.Sci*; Marrero-Ponce y col., Aceptado para publicar *J. Comput. Aided Mol. Des*).

Teniendo en cuenta la relevancia de los resultados alcanzados en el grupo de diseño de Fármaco de la Universidad Central de Las Villas (Cuba) utilizando el método **TOMOCOMD-CARDD**, consideramos adecuado desarrollar modelos QSAR que constituyan un sistema de cribado computacional capaz de identificar/seleccionar nuevos compuestos líderes activos contra *T. vaginalis* y validar experimentalmente, en los casos más prometedores, los resultados teóricos satisfactorios alcanzados con los modelos *in silico*, mediante estudios *in vitro* e *in vivo*.

**Por todo lo anterior se plantea el siguiente PROBLEMA CIENTIFICO:**

El paso limitante en el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos continúa siendo la identificación y la optimización de nuevos compuestos líderes. Los altos costes y baja efectividad que presentan los métodos tradicionales de “*ensayo y error*”, la creciente sensibilidad social de la enfermedad y emergente resistencia a las terapias actuales proveen un ímpetu adicional a la utilización de métodos *más racionales* para la obtención de NEM potencialmente bioactivas frente a *T. vaginalis*.

**Como vía para solucionar el problema científico se formula la siguiente HIPÓTESIS:**

Es posible identificar NEM activas frente a *T. vaginalis* mediante el desarrollo de una metodología que combina estudios *in silico*, *in vitro* e *in vivo*.

**Para cumplimentar la anterior hipótesis y dar respuesta a la problemática científica planteada, se propone el siguiente objetivo general:**

Identificar NEM activas frente a *T. vaginalis* mediante el desarrollo secuencial y coordinado de ensayos *in silico*, *in vitro* e *in vivo*.

**Para cumplimentar el objetivo general planteado nos proponemos las siguientes etapas u objetivos específicos:**

1. Desarrollar y validar modelos QSAR predictivos que permitan la discriminación de la actividad antiprotozoaria frente a *T. vaginalis* utilizando el método **TOMOCOMD-CARDD**.

2. Utilizar los modelos QSAR obtenidos en el proceso de “*cribado virtual*” de bases de datos con el propósito de identificar los candidatos más prometedores.
3. Corroborar los resultados obtenidos mediante ensayos *in vitro* utilizando una cepa de referencia de *T. vaginalis*.
4. Ensayar la actividad *in vivo* de los productos que mostraron mayor actividad *in vitro*.

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1 Ensayos *in silico*

#### 2.1.1 Generalidades

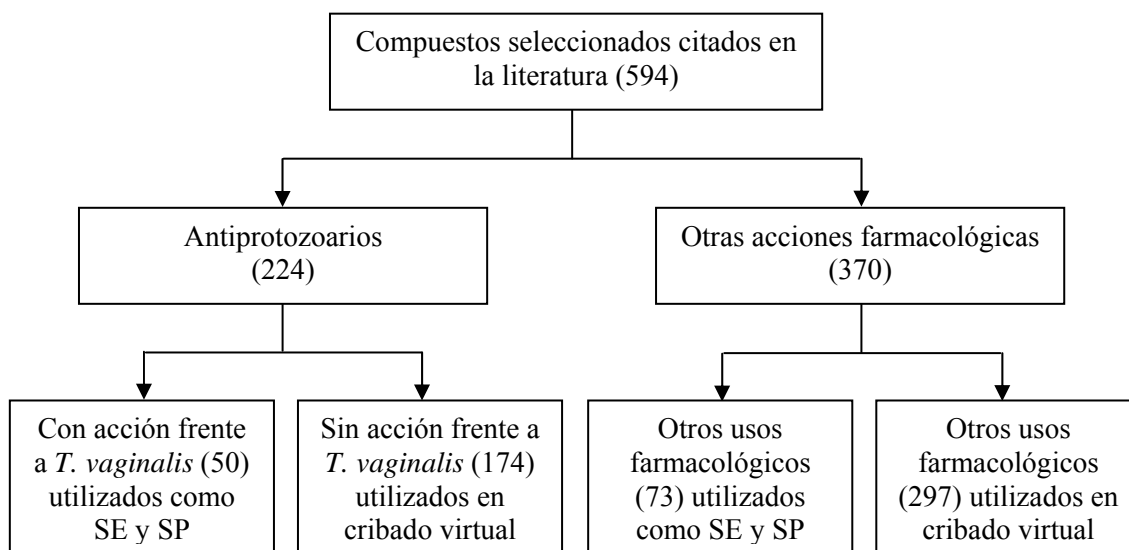
Todos los cálculos fueron efectuados en un ordenador personal PC Pentium-4 3.0 GHz. El módulo **CARD** implementado en el programa **TOMOCOMD** (Marrero-Ponce y Romero, 2002) fue usado para el cálculo de los descriptores moleculares. El análisis estadístico se efectuó empleando el paquete de procesamiento **STATISTICA 6.0** para Windows (StatSoft Inc., 2001). Los datos fueron almacenados y procesados utilizando el programa de Microsoft Excel (2002).

#### 2.1.2 Selección de compuestos y cálculo de descriptores moleculares.

Un grupo de 594 compuestos extraídos de la literatura [principalmente del *Handbook* Martin Negwer (Negwer, 1987), de la base de datos ‘*Merck Index*’ (Chapman & Hall, 1996), de la Enciclopedia de Antibióticos (Glasby, 1978) y de la base de datos del Servicio de Información Especializada de la Biblioteca Nacional de Medicina (SIS, 2006), donde pueden encontrarse los nombres, sinónimos y fórmulas estructurales para cada uno de los compuestos] fueron utilizados para generar las series de entrenamiento (SE) y predicción (SP) necesarias para la construcción y validación de los modelos discriminantes. De dichos compuestos, 224 según la bibliografía consultada, presentaban actividad antiprotozoaria y de estos, 50 acción específica frente a *T. vaginalis*. Este último grupo fue “etiquetado” como activo, y los 174 antiprotozoarios restantes empleados en el cribado virtual para la búsqueda de nuevos agentes activos frente a *T. vaginalis*.

De los 370 compuestos restantes, tomados de la literatura por poseer acciones diferentes a las anteriormente mencionadas, fueron seleccionados al azar 73, para ser utilizados como grupo de inactivos en la generación de los modelos. Todos estos compuestos aparecen citados por poseer acciones farmacológicas diferentes a la antiprotozoaria (antivirales, hipnóticos y sedantes, anticonvulsivantes y antiepilépticos, catárticos, hemostáticos, etc) (Glasby, 1978;

Negwer, 1987; Chapman & Hall, 1996; SIS, 2006) según se refleja en el Anexo 4. En la Figura 2.1 se ofrece un resumen de la composición de los datos en cada serie.



**Figura 2.1** Distribución de compuestos extraídos de la literatura para el estudio de predicción.

Todos los compuestos fueron dibujados empleando el programa *TOMOCOMD-CARDD* y calculados los índices cuadráticos [ $q_k(v)$ ,  $q_{kL}(v)$ ,  $q_k^H(v)$ ,  $q_{kL}^H(v)$ ], lineales [ $f_k(v)$ ,  $f_{kL}(v)$ ,  $f_k^H(v)$ ,  $f_{kL}^H(v)$ ] y bilineales [ $b_k(v_n, z_m)$ ,  $b_{kL}(v_n, z_m)$ ,  $b_k^H(v_n, z_m)$ ,  $b_{kL}^H(v_n, z_m)$ ] estocásticos y no estocásticos, totales y locales ( $L$ ), basados en relaciones de átomos y de enlaces ( $v = \bar{x}$ ;  $z = \bar{y}$  o  $v = \bar{w}$ ;  $z = \bar{u}$ , respectivamente).

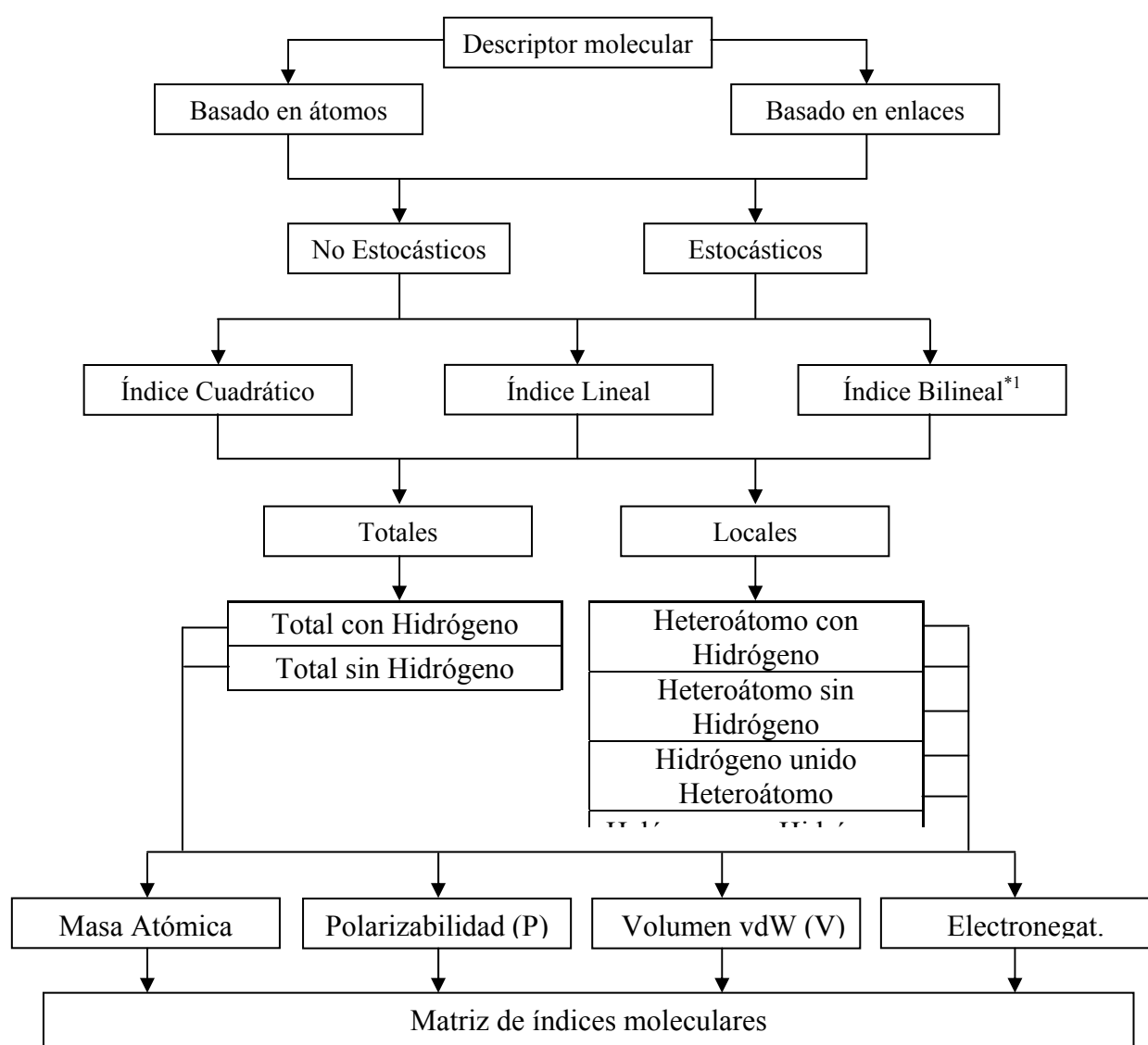
**Tabla 2.1** Valores de los pesos atómicos usados (Pauling, 1939; Todeschini y Gramatica, 1998)

ID	Masa Atómica	Volumen VdW <sup>a</sup>	Polarizabilidad	Electronegatividad de Pauling
H	1.01	6.709	0.667	2.20
B	10.81	17.875	3.030	2.04
C	12.01	22.449	1.760	2.55
N	14.01	15.599	1.100	3.04
O	16.00	11.494	0.802	3.44
F	19.00	9.203	0.557	3.98
Al	26.98	36.511	6.800	1.61
Si	28.09	31.976	5.380	1.9
P	30.97	26.522	3.630	2.19
S	32.07	24.429	2.900	2.58
Cl	35.45	23.228	2.180	3.16
Fe	55.85	41.052	8.400	1.83
Co	58.93	35.041	7.500	1.88
Ni	58.69	17.157	6.800	1.91
Cu	63.55	11.494	6.100	1.90
Zn	65.39	38.351	7.100	1.65

Br	79.90	31.059	3.050	2.96
Sn	118.71	45.830	7.700	1.96
I	126.90	38.792	5.350	2.66

<sup>a</sup>VdW: van der Waals

Con el objetivo de diferenciar los vértices y las aristas (átomos y enlaces) de los grafos moleculares, cuatro sistemas de pesos fueron considerados como componentes vectoriales en el cálculo de los descriptores. Con tal propósito fueron empleados valores de masa atómica (M), polarizabilidad atómica (P), volumen de van der Waals (V) y electronegatividad de Pauling (E) (véase Tabla 2.1). En el caso de los índices bilineales fueron consideradas todas las posibles combinaciones de dichos pesos.



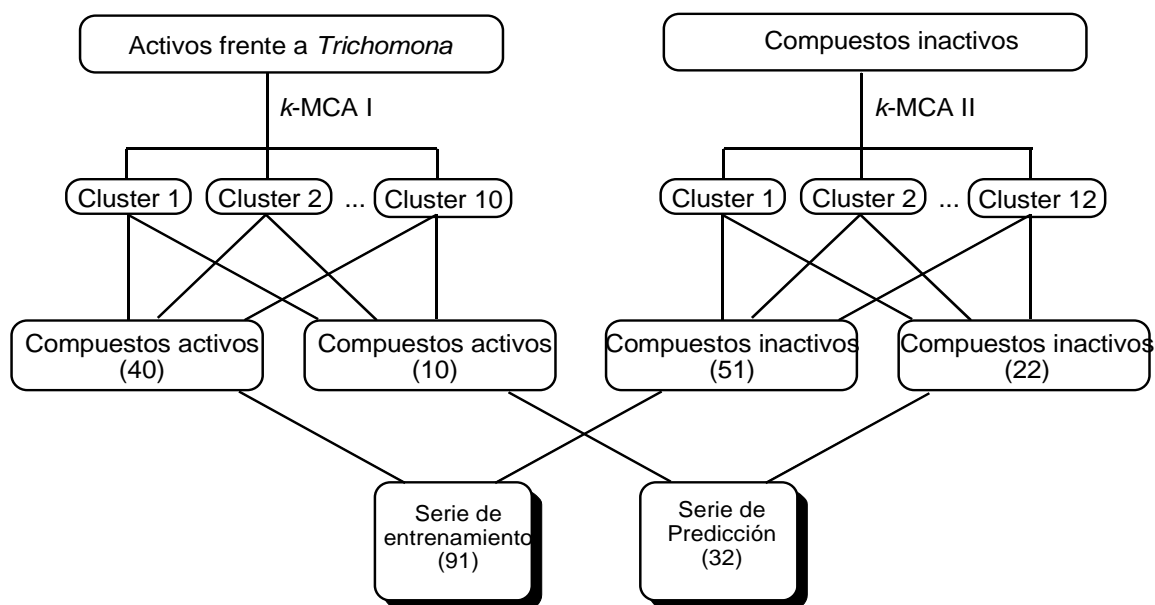
\*1 Para Índices Bilineales se utilizaron todas las combinaciones posibles para los distintos pesos calculados (M-P; M-V; M-E; P-V; P-E; V-E).

**Figura 2.2** Diagrama de los cálculos realizados utilizando el programa *TOMOCOMD-CARDD*.

### **2.1.3 Diseño de las series de entrenamiento y predicción utilizando Análisis de Cluster (AC)**

Como vía de evaluación de la distribución y diversidad estructural existente dentro de los grupos de observaciones activas e inactivas respectivamente, fueron efectuados dos análisis de *clusters* o conglomerados jerárquicos según el procedimiento *k*-NNCA (siglas de *k-nearest neighbor cluster algorithm*) implementado en el paquete de procesamiento *STATISTICA* (StatSoft Inc., 2001). Para efectuar dicho estudio se procedió a estandarizar todas las matrices de descriptores moleculares anteriormente calculados.

Con posterioridad, los conjuntos de 50 y 73 compuestos activos e inactivos, respectivamente, fueron divididos a su vez en dos subconjuntos mediante dos análisis de *clusters* (AC) del tipo *k*-MCA (*k-means cluster analysis*) (también llamado análisis de agrupaciones o análisis de conglomerados) (Johnson y Wichern, 1988; McFarland y Gans, 1995; Xu, 2002), los cuales fueron efectuados para cada grupo. Asegurada de este modo la representatividad de elementos del mismo dominio en los dos subconjuntos obtenidos en cada caso, fueron tomados dos grupos constituidos por 40 activos y 51 inactivos para conformar la serie de entrenamiento (SE) de los modelos. Los restantes compuestos (10 activos y 22 inactivos) fueron preparados como grupo de predicción externa. Los compuestos incluidos en la SP nunca fueron usados en el desarrollo de los modelos cuantitativos (Figura 2.3).



**Figura 2.3.** Selección de la SE y SP mediante análisis de *clusters*.

#### 2.1.4 Desarrollo y validación de la función discriminante

Para la obtención de las funciones de clasificación fue seleccionado el método de análisis discriminante lineal [ADL] (van der Waterbeemd, 1995b). Los modelos QSAR-ADL se obtuvieron con el paquete de programas estadísticos *STATISTICA* (StatSoft Inc., 2001), utilizando el método de “pasos hacia delante” (*forward stepwise*) para la selección de las variables. Los mismos poseen la forma general, ejemplificada a continuación para el caso de los índices cuadráticos no estocásticos:

$$A = a_0q_0(\bar{x}) + a_1q_1(\bar{x}) + a_2q_2(\bar{x}) + \dots + a_kq_k(\bar{x}) + c \quad (2.1)$$

donde  $A$  es el clasificador de la actividad,  $q_k(\bar{x})$  [o  $q_{kL}(\bar{x})$ ] el  $k$ -ésimo índice cuadrático total o local, y los términos  $a_k$ 's los coeficientes obtenidos por el análisis estadístico multivariado. El principio de parsimonia (“Occam’s Razor”) fue tomado siempre en cuenta para la selección del modelo, teniendo presente que cuando las explicaciones múltiples están disponibles para un fenómeno, se prefiere la versión más simple (*necessitatem del praeter del multiplicanda del sunt de los entia no*, o las "entidades no se deben multiplicar más allá de necesidad") (Ariew, 1976).

En todos los casos el estadígrafo  $F$  y la *tolerancia* se usaron para el control del proceder de selección. Siempre se utilizó, por defecto, como mínimo aceptable de *tolerancia* el valor de 0.01. Con el objetivo de ensayar la *calidad* y *robustez* de los modelos obtenidos, se evaluaron

varios parámetros estadísticos, tales como la  $\lambda$  de Wilks, el valor de  $F$  y el cuadrado de la distancia de Mahalanobis ( $D^2$ ). Otro factor que se tuvo en consideración para evaluar la habilidad (poder discriminante) de las FDs obtenidas, fueron los *porcentajes de buena clasificación* (Exactitud,  $Q$ ) en cada uno de los grupos y del modelo en general en la SE. La clasificación de los casos se desarrolló por medio de la *probabilidad de clasificación posterior*. En este sentido, fueron calculados los valores de diferencia de probabilidades según:  $\Delta P\% = [P(\text{activ}) - P(\text{inactiv})] \times 100$ , donde  $P(\text{activ})$  es la probabilidad con que la ecuación clasifica un compuesto como activo. Contrariamente,  $P(\text{inactiv})$  es la probabilidad con que el modelo clasifica un compuesto como inactivo. Compuestos con valores de  $\Delta P\% > 5$ , fueron considerados con probabilidad positiva de poseer la acción deseada. Por el contrario, valores de  $\Delta P\% < 5$ , indicaron la presencia de casos inactivos. Compuestos con  $\Delta P\%$  en el rango comprendido entre  $-5$  y  $5$ , se consideraron como *no clasificados*.

De igual forma fueron calculados los parámetros estadísticos recomendados en la literatura médico-estadística (Baldi y col., 2000). En este sentido la calidad de los modelos obtenidos fue igualmente expresada a través del coeficiente de correlación de Matthews ( $C$ ), la sensibilidad, la especificidad y la relación de falsos positivos “*false alarm rate (FAR)*” (Baldi y col., 2000):

$$Q = 100 * (VP + VN) / (VP + FP + VN + FN) \quad (2.2)$$

$$C = 100 * (VP * VN - FP * FN) / \sqrt{(VN + FN) * (VN + FP) * (VP + FP) * (VP + FN)} \quad (2.3)$$

$$\text{Sensibilidad} = 100 * VP / (VP + FN) \quad (2.4)$$

$$\text{Especificidad} = 100 * VN / (VN + FP) \quad (2.5)$$

$$FAR = 100 * FP / (FP + VN) \quad (2.6)$$

donde VP y VN son los verdaderos positivos y negativos, respectivamente y FP y FN son los falsos positivos y negativos, correspondientemente.

Para probar la robustez de los modelos y para demostrar el poder predictivo de los mismos, fueron efectuados ejercicios de validación interna y externa. En la *validación interna*, se llevó a cabo una estrategia de validación cruzada (VC) dejando el 10 % de los compuestos fuera (*Leave-10-fold full-out*, según sus siglas en inglés) generando nuevos modelos con los cuales se predice tanto la nueva SE utilizada, como el grupo de 10% no incluido en cada ocasión. Este proceder se repite hasta que todos los casos (en este caso grupos) han sido

retirados una vez y predichos por el modelo generado con las respectivas bases de datos reducidas.

Como segundo ejercicio de validación, la SP generada mediante el análisis de clusters o conglomerados (véase Figura 2.3) fue sometida a la evaluación de las funciones discriminantes, de modo que pudieron ser calculados para cada caso los porcentajes de buena clasificación, así como los parámetros estadísticos recomendados (coeficiente de correlación de Matthews (*C*), sensibilidad, especificidad y relación de falsos positivos “*false alarm rate (FAR)*”) (Baldi y col., 2000).

Una tercera validación de los modelos de predicción se realizó a partir de compuestos cuya actividad ha sido demostrada frente a *T. vaginalis* (Alcalde y col., 1995; Gavini y col., 1997; Ochoa y col., 1999; Gavini y col., 2000; Aguirre y col., 2004; Kouznetsov y col., 2004b; Coro y col., 2005). A estos compuestos, seleccionados al azar, se les realizó igual procedimiento que a los compuestos de la SE y SP calculándoseles los índices cuadráticos, lineales, o bilineales. Posteriormente les fueron calculados los valores de la diferencia de probabilidades según:  $\Delta P\% = [P(\text{actv}) - P(\text{inactv})] \times 100$ , comparando este  $\Delta P\%$  con la actividad citada por los diferentes autores. En la Tabla 2.2 se muestra la composición de las SP externas empleadas para cada uno de los casos.

**Tabla 2.2** Selección de compuestos para la SP externa.

Conectividad	Índice	<i>n</i>	Activos	Inactivos
Átomo	IL	9	7	2
	IB	18	9	9
Enlace	IQ	12	4	8
	IL	12	9	3
	IB	12	11	1

*n*: número de compuestos.

(véase materiales y métodos *in vitro*).

## 2.2 Ensayos *in vitro*

### 2.2.1 Medios y técnicas utilizados

#### 2.2.1.1 Medios y diluciones

Medio Diamond TYM y TYI-S-33

**Tabla 2.3** Composición del medio TYM.

Composición TYM	Firma	Cantidad (g)
Tripticasa	Becton Dickinson	20



Extracto de levadura	Becton Dickinson	10
Maltosa	Difco Laboratories	5
L(-)-cisteína	Carlo Erba	1
Ác. L(+)-ascórbico	Carlo Erba	0,2
Agua destilada	-	c.s.p 1000 ml

### 2.2.1.2 Material biológico en ensayos *in vitro*

#### Cepa ATCC *T. vaginalis*

Para los ensayos de actividad *in vitro* se utilizó la cepa JH31 A#4, número de referencia 30326 y lote SF-2006, solicitada a la *American Type Culture Collection* (ATCC) y cuyo aislamiento se produjo en el Johns Hopkins Hospital de Baltimore (U.S.A.) en el año 1963. Esta cepa de *T. vaginalis* procede del lavado endocervical de una paciente con tricomonosis y se caracteriza por su sensibilidad al metronidazol.

### 2.2.1.3 Preparación de cultivos en masa de *T. vaginalis*

Veinticuatro horas antes de comenzar los experimentos *in vitro* se prepara un cultivo en masa en un frasco estéril de 100 a 200 ml conteniendo medio Diamond, suplementado con 10% suero fetal bovino y antibiótico. Se le añade un inóculo de 2000 *T. vaginalis*/ml y se incuba a 37°C con 5 % CO<sub>2</sub>.

#### 2.2.1.3.1 Preparación del cultivo madre para cribados *in vitro*

Se prepararon cultivos madres a partir de los cultivos en masa (en fase de crecimiento logarítmico). El volumen de cultivo madre a preparar se calculó teniendo en cuenta la cantidad de tratamientos, grupos controles, número de réplicas, volumen de cada réplica, volumen final de cultivo a preparar y la concentración inicial y final de *T. vaginalis* por ml para cada caso en particular. Teniendo estos datos se procede a calcular la cantidad de cultivo utilizando la fórmula siguiente:

$$VF = [(CP*CC*NR)+Tubos\ controles]*VR]+ME \quad (2.7)$$

donde **VF** es el volumen final ha utilizar; **CP** la cantidad de productos a evaluar; **CC** la cantidad de concentraciones utilizar; **NR** número de réplicas para cada concentración; **VR** volumen de cada réplica y **ME** margen de error (5 a 10 ml). El volumen inicial (**VI**) de inóculo a añadir se calcula por  $VI = VF*CF/CI$ , siendo **CF** la concentración final de parásitos que deseamos ( $10^5$  *T. vaginalis*/ml) y **CI** la concentración inicial de parásitos determinados por recuento en cámara de Nuebauer del cultivo fase logarítmica. Al **VF** se le

calcula el 10 % del Suero Bovino Fetal y el volumen de antibiótico a añadir. El *VI* se obtiene del cultivo en masa y se le añade la cantidad suficiente para completar el *VF*.

## 2.2.2 Cribado farmacológico *in vitro*

### 2.2.2.1 Cribado farmacológico frente a la cepa ATCC JH31 A#4 de *T. vaginalis*

Se utilizó la cepa JH31 A#4 de *T. vaginalis* (ATCC, Maryland, USA), resuspendida en medio TYM suplementado con 10% de suero de bovino fetal y antibiótico según se describe en el punto 2.2.1.1 Medios y diluciones. Se procedió también con los pasos de preparación de cultivos en masa y cultivo madre para el ensayo *in vitro* descritos en este mismo epígrafe. La concentración de parásitos se ajustó a  $1 * 10^5$  cel/ml, distribuyéndose 2 ml de volumen final en cada tubo e incubándose a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. A las 6 horas de iniciado el cultivo se realizó un recuento en cámara de Neubauer al grupo control, añadiéndose en este tiempo los compuestos a ensayar utilizando las concentraciones de 100, 10 y 1 µg/ml. Se utilizó en cada ensayo un grupo control sin tratamiento y un grupo control con metronidazol (2, 1 y 0,5 µg/ml). La viabilidad de los protozoos fue realizada a las 24 y 48 horas de la incubación, mediante conteo doble ciego en cámara de Neubauer. La actividad citocida y citostática se determinó por el cálculo de los porcentajes de reducción (%R) y de inhibición de crecimiento en relación con el grupo control. Todos los datos fueron procesados mediante procesador de datos EXCEL y archivados como documentos primarios.

Fórmulas utilizadas:

$$\text{ICC} = \text{MCCC (24 ó 48 horas)} / \text{MCCC (6 horas)} \quad (2.12)$$

$$\text{ICT} = \text{Media recuento de cultivos tratados (24 ó 48 horas)} / \text{MCCC 6 horas} \quad (2.13)$$

$$\% \text{ de CCT} = \text{ICT} * 100 / \text{ICC} \quad (2.14)$$

$$\% \text{ de Actividad Citostática} = 100 - \% \text{ de CCT} \quad (\text{cuando se cumple } \text{ICT} \geq 1) \quad (2.15)$$

$$\% \text{ de reducción} = 100 - \% \text{ de CCT} \quad (\text{cuando se cumple } \text{ICT} < 1) \quad (2.16)$$

donde **ICC** es el índice de crecimiento del control, **ICT** es el índice de crecimiento de los cultivos tratados, **MCCC** corresponde a la media conteo del cultivo control, **% CCT** es el porcentaje de crecimiento cultivo tratado y **% de reducción** es igual que % de actividad citocida.

Cuando el índice de crecimiento de cada producto es menor a 1 se calcula el porcentaje de reducción, por el contrario si es mayor o igual a 1 se procede a calcular el porcentaje de actividad citostática. El porcentaje de reducción corresponde a la actividad citocida de los productos ensayados frente a *T. vaginalis* (Kouznetsov y col., 2004a,b; 2005).

#### **2.2.2.2 Ensayos *in vitro* de productos que mostraron actividad virtual frente a *T. vaginalis***

Se evaluaron 9 productos (Tabla 2.4) que presentan otros usos farmacológicos, pero que no están citados en la literatura internacional como tricomonocidas. El criterio de selección de estos productos se realizó teniendo en cuenta los resultados en los 12 modelos de predicción y la disponibilidad de los mismos. Para el cribado farmacológico *in vitro* se procedió siguiendo el protocolo de investigación descrito en el punto 2.2.2 Cribado farmacológico *in vitro*.

**Tabla 2.4** Productos evaluados *in vitro* y que mostraron buena actividad virtual.

No.	Producto	Nombre químico	Actividad frente a:	Referencia
1	Nitromida	3,5-dinitrobenzamida	Coccidios	Parks, 1985
2	Benznidazol	<i>N</i> -bencil-2-nitro-1 <i>H</i> -imidazol-1-acetamida	<i>Trypanosoma</i>	Corti y Yampolsky, 2006
3	Nihidrazona	<i>N</i> -(5-nitrofurfurilidenamino)acetamida	Coccidios	Johnson y O'Connor, 1965
4	Nitrofural	(5-nitro-2-furfurilidenamino)urea	<i>Trypanosoma</i>	Mcloughlin y Gardiner, 1965 Chung y col., 2003
5	Nitrofenida	disulfuro de bis(3-nitrofenilo)	Coccidios	Allocco y col., 2001
6	Nifurtimox	3-metil-4-(5-nitrofurfurilidenamino) tetrahidro-2 <i>H</i> -1,4-tiazina 1,1-dióxido	<i>Trypanosoma</i>	Weir, 2006
7	Mefloquina	DL- <i>eritro</i> -2,8-bis(trifluorometil)- $\alpha$ -(2-piperidil)-4-quinolinametanol	<i>Plasmodium</i>	Omari y col., 2006
8	Nitrodan	3-metil-5-(4-nitrofenilazo)rodanina	Antihelmíntico	Douch y Buchanan, 1979
9	Troxerutina	3',4',7-tris[ <i>O</i> -(2-hidroxietyl)]rutina	Trastornos circulatorios y hepáticos	Cesarone y col., 2006
Control	Mtz	metronidazol		

## 2.3 Ensayos *in vivo*

### 2.3.1 Material biológico empleado en los ensayos *in vivo*

#### Cepa ATCC *Trichomonas vaginalis*

Para los ensayos de actividad *in vivo* se utilizó la cepa C1NIH, solicitada a la *American Type Culture Collection* (ATCC). Esta cepa es mantenida en nitrógeno líquido hasta unos días antes de su utilización con el objetivo de que no pierda su poder infectante.

### 2.3.2 Modelo de *T. vaginalis* en ratones NMRI

#### 2.3.2.1 Ratones utilizados

Se trabajó con la cepa de ratones no consanguínea NMRI con un peso aproximado de 20 – 25 g. Todos los ratones fueron mantenidos en condiciones óptimas de alimentación, alojamiento y temperatura.

#### 2.3.2.2 Método de infección en ratones NMRI

El procedimiento seguido para la infección de los ratones fue primeramente descrito por Toyos (1974) y posteriormente modificado por Escario (1985). Este mismo procedimiento fue desarrollado y validado por Nogal (1999). El principio del método consiste en evaluar a los 15 días posteriores a la infección intraperitoneal con una cepa infectante de *T. vaginalis*, la presencia de líquido ascítico, lesiones en peritoneo, grasa pélvica, bazo, páncreas, estómago y

en el hígado por su cara diafragmática y visceral, así como si hubo mortalidad en los ratones infectados a partir del tercer día de infección. A los ratones supervivientes a los 15 días se le practica la necropsia, procediéndose a clasificar los distintos grados de las lesiones observadas. (Nogal, 1999). Con los datos obtenidos se calcula el índice de patogenia para cada ratón, realizando la sumatoria de cada valor dado a las lesiones observadas y a la presencia o no de líquido ascítico y mortalidad. Según Toyos (1974) el máximo valor obtenido será para aquellos ratones que mueren en el tercer día, con el grado máximo dado a las lesiones observadas y la presencia del parásito en el líquido ascítico. El índice de patogenia total del grupo de ratones infectados se calcula hallando la media de las puntuaciones del lote, de acuerdo al baremo indicado (Tabla 2.5).

---

**Tabla 2.5** Valoración de las lesiones y la mortalidad en el modelo de ratones infectados de *T. vaginalis*. I.- Mortalidad durante la experiencia

- Ratones muertos al 3 <sup>er</sup> día p.i .....	50 puntos
- Ratones muertos al 4 <sup>o</sup> día p.i.....	44 puntos
- Ratones muertos al 5 <sup>o</sup> día p.i.....	38 puntos
- Por cada día de retraso 6 puntos menos.	
- Ratones muertos después del día 10 <sup>o</sup> p.i.....	6 puntos
 II.- Líquido ascítico	
- Menos de 1ml .....	2 puntos
- De 1 a 2 ml .....	4 puntos
- Más de 2ml .....	6 puntos
 III.- Peritoneo y Grasa Pélvica	
- Necrosis puntiforme en número de 1 a 3 .....	2 puntos
- Necrosis puntiforme múltiple y/o necrosis única de 3 a 5 mm de diámetro.....	4 puntos
- Necrosis múltiples de 3 a 5 mm y/o necrosis única de 5 a 10 mm de diámetro.....	6 puntos
- Necrosis extendida por toda la pelvis .....	8 puntos
- Necrosis diseminada en cavidad abdominal afectando al meso intestino y zona perirrenal .....	10 puntos
 IV.- Bazo, Páncreas, Estómago	
- Necrosis puntiforme en número de 1 a 3 y/o esplenomegalia .....	2 puntos
- Necrosis puntiforme múltiple y/o necrosis única de 3 a 5 mm de diámetro.....	4 puntos
- Necrosis única de 5 a 8 mm.....	6 puntos
- Necrosis de 8 a 10 mm afectando a más de un órgano.....	8 puntos
- Necrosis de 10 de 15 mm englobando a más de un órgano.....	10 puntos
- Necrosis mayores de 15 mm que ocupan más de un órgano e interesando también a hígado y asas intestinales.....	12 puntos

---

**Tabla 2.5** Valoración de las lesiones y la mortalidad en el modelo de *T. vaginalis* (Continuación).

---

V.- Hígado (Cara visceral)	
- Necrosis puntiforme en número de 1 a 3 y/o fina capa superficial de fibrina sobre el lóbulo de Spigelio.....	2 puntos
- Necrosis de 3 a 5 mm y/o necrosis parcial del lóbulo de Spigelio o de los lóbulos ventrales derecho o izquierdo.....	4 puntos
- Necrosis de 5 a 8 mm y/o necrosis total del lóbulo Spigelio o necrosis equivalente en los lóbulos ventrales derecho o izquierdo.....	6 puntos
- Necrosis de 8 a 10 mm.....	8 puntos
- Necrosis afectando a la mayor parte de la superficie.....	10 puntos
VI.- Hígado (Cara diafragmática).	
- Necrosis puntiforme en número de 1 a 3 o fina capa superficial de fibrina y/o alteraciones en la coloración del órgano.....	2 puntos
- Necrosis de 3 a 5 mm y/o grandes alteraciones de color.....	4 puntos
- Necrosis de 5 a 8 mm y/o necrosis parcial de los lóbulos diafragmáticos izquierdo o derecho.....	6 puntos
- Necrosis de 8 a 10 mm y/o necrosis parcial de los lóbulos y/o intensa de un lóbulo.....	8 puntos
- Necrosis intensa afectando a varios lóbulos.....	10 puntos
- Necrosis extendida a todos los lóbulos e interesando a diafragma.....	12 puntos

---

### 2.3.4.3 Experimentos farmacológicos en ratones NMRI

En nuestro esquema se utilizaron 10 ratones NMRI para cada producto evaluado. Se evaluaron los compuestos: benznidazol; nihidrazona, nitrofenida que resultaron activos en los modelos de predicción y otros compuestos obtenidos por síntesis química y cuyos resultados *in vitro* han sido publicados por los autores utilizando los modelos de erección anteriormente descritos (VA5-10, VA2-25, VA7-67, VA7-69, VA8-34, VA2-38 y VA5-5b) (Marrero Ponce y col. 2005c; Meneses y col. 2005). Todos los productos fueron disueltos en carboximetilcelulosa al 2% para facilitar su mejor aplicación por vía oral a los ratones y evitar de esta forma la devolución del producto aplicado por parte de los animales. La dosis utilizada para cada producto fue de 100 mg/kg de peso (3 mg/ratón/día), realizando el tratamiento farmacológico los días 3<sup>o</sup>, 4<sup>o</sup>, 5<sup>o</sup>, 6<sup>o</sup> y 10<sup>o</sup>, 11<sup>o</sup> y 12<sup>o</sup> post infección según esquema seguido por Nogal (1999). Para cada experimento se utilizó un grupo control infectado sin tratamiento y otro grupo control infectado y tratado con metronidazol (0,75 mg/ratón/día) en 0,3 ml de carboximetilcelulosa. El esquema de tratamiento se muestra en la Tabla 2.6

**Tabla 2.6** Esquema de tratamiento en ratones NMRI infectados con *T. vaginalis*.

Grupo	n	Días								
		0	3	4	5	6	10	11	12	15
		Infeción	T. 1	T. 2	T. 3	T4	T. 5	T. 6	T. 7	Necropsia
I*	10		P	P	P	P	P	P	P	
II	10	<i>T.v</i>	-	-	-	-	-	-	-	A todos los sobreviviente
III	10		Mtz	Mtz	Mtz	Mtz	Mtz	Mtz	Mtz	

P = Productos evaluados

I\* = Los experimentos con tratamientos fueron de II y III grupos

Mtz = Metronidazol

*T.v.* = *T. vaginalis*

A todos los ratones en el experimento se pesaron antes y durante el experimento. Se valoró mediante el *t-test* si existe diferencia estadísticamente significativa entre los días 0 y 3, así como las diferencias entre el peso de los diferentes grupos tratados y controles a los 15 días post-infección mediante la prueba de U de Mann-Whitney.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Ensayos *in silico*

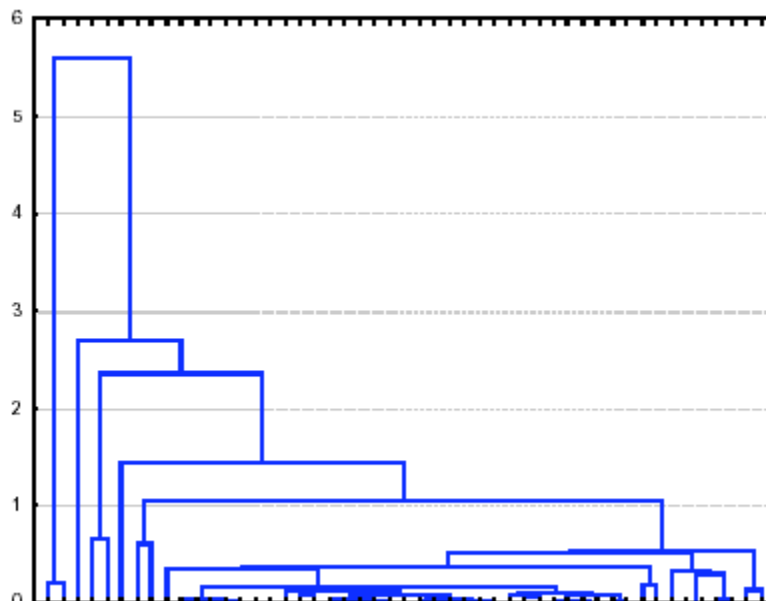
Con el objetivo de identificar compuestos con actividad frente a *T. vaginalis* fueron obtenidas funciones discriminantes sobre la base de los DMs implementados en el programa **TOMOCOMD-CARDD**. En este sentido fueron parametrizadas las estructuras moleculares haciendo uso de expresiones cuadráticas, lineales y bilineales no estocásticas y estocásticas basadas en relaciones entre núcleos atómicos y entre enlaces químicos. Dichos descriptores fueron calculados para todos los compuestos incluidos tanto en la base de datos [serie de entrenamiento (SE) y serie de predicción (SP)] extraída de la literatura como en la conformada por moléculas sintetizadas en el Instituto de Química Médica (IQM) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), el Centro de Bioactivos Químicos de la UCLV y por la Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander, Colombia.

##### 3.1.1 Construcción de la serie de entrenamiento y la serie de predicción usando análisis de cluster jerárquico y no jerárquico

Es bien conocido que la calidad de un modelo de clasificación es altamente dependiente de la calidad de los datos seleccionados. Teniendo en cuenta este planteamiento y para garantizar al mismo tiempo la selección de compuestos con la mayor variabilidad estructural posible, se efectuó el análisis de clusters jerárquico (Johnson y Wichern, 1988; McFarland y Gans, 1995) de la base de datos de 123 compuestos químicos extraídos de la literatura. Las Figuras 3.1 y 3.2 muestran las distancias entre compuestos y clusters así como el árbol de aglomeración jerárquico o dendrogramas obtenidos. En estas figuras se ilustran los resultados del *k*-NNCA (siglas de *k-nearest neighbor cluster algorithm*) desarrollados para los datos de los compuestos activos e inactivos, respectivamente. Como puede verse en ambos dendrogramas, hay un gran número de subconjuntos diferentes que demuestran la variabilidad molecular de los compuestos químicos seleccionados en la confección de la base de datos.

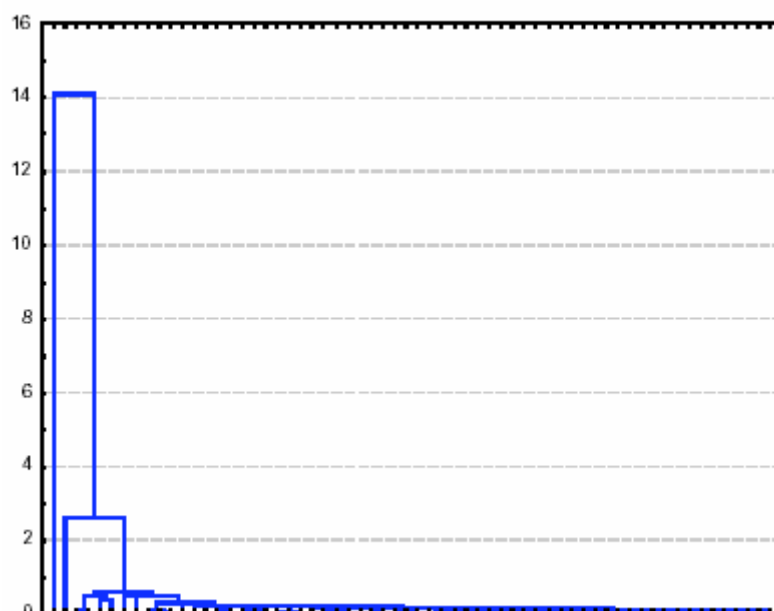


Distancia de unión



**Figura 3.1** Dendrograma de los resultados del  $k$ -NNCA jerárquico de los compuestos activos usados en la SE y predicción.

Distancia de unión



**Figura 3.2** Dendrograma de los resultados del  $k$ -NNCA jerárquico de los compuestos inactivos usados en la SE y predicción.

El análisis de clusters o conglomerados permitió seleccionar, en un segundo análisis, los compuestos que fueron utilizados en las SE y SP de una manera representativa. De esta forma cada grupo (activo e inactivo) fue dividido al azar en dos series de datos (SE y SP) mediante dos análisis de clusters del tipo  $k$ -MCA (según sus siglas en inglés *k-mean cluster*

*algorithms*) (*k*-MCA I para el grupo de activos y *k*-MCA II para los inactivos). Este procedimiento asegura que cualquier clase química (determinada por los *clusters*) se representará en ambas series de compuestos y por lo tanto, que en cada una de estas esté representado todo “el universo experimental”. Las Tablas 3.1 y 3.2 muestran a los miembros de cada *cluster* en ambos grupos. De los 123 compuestos químicos, 91 fueron seleccionados de esta forma para la SE, siendo 40 de ellos activos y 51 inactivos.

**Tabla 3.1** Resultados del *k*-MCA I (activos).

Compuestos activos	Cluster	Dist.	Compuestos activos	Cluster	Dist.	Compuestos activos	Cluster	Dist.
Lauroguadina	1	0,2	Nimorazol	5	0,07	Mepartricina A	7	0,11
Azomicina	1	0,2	Ornidazol	5	0,09	Mepartricina B	7	0,11
Acetarsona	2	0,3	Benzoilmetronidazol	5	0,05	Metronidazol	8	0,02
Glicobiarzol	2	0,32	Misonidazol	5	0,09	Nifuroxima	8	0,11
Glicarsiamidona	2	0,18	Fexinidazol	5	0,03	Secnidazol	8	0,03
Tiacetarsamida	2	0,24	Pirinidazol	5	0,08	Clomizol	8	0,05
Virustamicinaa A	3	0,41	Carnidazol	6	0,12	Isometronidazol	8	0,02
Pentamicina	3	0,41	Propenidazol	6	0,11	Ternidazol	8	0,02
Aminitrazol	4	0,08	Furazolidona	6	0,11	Gynotabs	8	0,05
2-Amino-5-nitrotiazol	4	0,21	Nifuratel	6	0,14	Moxnidazol	8	0,2
Trichomonacid	4	0,15	Fosfato de Metronidazol	6	0,25	Satranidazol	9	0,2
Lutenurina	4	0,19	Bamnidazol	6	0,15	Anisomicina	10	0,23
Abunidazol	4	0,07	Piperanitrozol	6	0,11	Cariolin	10	0,18
Imoctetrazolina	4	0,13	Metronidazol Hidrógeno succinato	6	0,13	Clioquinol	10	0,12
Forminitrazol	4	0,1	Tivanidazol	6	0,14	Clotrimazol	10	0,27
Acinitrazol	4	0,08	Azanidazol	6	0,35	Diiodohidroxiquinolina	10	0,13
Tolamizol	4	0,09						

**Tabla 3.2** Resultados del *k*-MCA II (inactivos)

Compuestos inactivos	Cluster	Dist.	Compuestos activos	Cluster	Dist.	Compuestos activos	Cluster	Dist.
Norantoína	1	0,16	Petidina	5	0,05	Basedol	9	0,13
Rolipram	1	0,09	Tartrato de tenalidina	5	0,09	Levulinato de didimio	9	0,17
<i>N</i> -Hidroxiometil- <i>N</i> -metiltiourea	1	0,03	Bamipina	5	0,19	Ciclopramina	9	0,11
Mecisteina	1	0,10	Nonaperona	5	0,14	Colestipol	9	0,14
Cirazolina	1	0,13	Acetilcolina	5	0,05	Ácido clorobenzóico	9	0,11
Zoxazolamina	1	0,09	Amitraz	5	0,11	Acetanilo	9	0,15
Tiacetazona	2	0,23	Bromuro de diponio	5	0,05	Proclonol	9	0,15
Orotosan Fe	2	0,20	Metenammina	6	0,11	Dopamina	10	0,21
Naftazona	2	0,16	Carbimazol	6	0,07	Bufeniodo	10	0,15
Ag 307	2	0,12	Etidina	6	0,12	Carazolol	10	0,21
Eticumarol	2	0,16	Cloral betaina	7	0,13	Amantadina	11	0,25
Guanazol	2	0,17	Frigen 113	7	0,11	Propamina	11	0,09
Lisergida	2	0,21	Percloroetano	7	0,03	Éter vinílico	11	0,12
Alibendol	2	0,19	Acetato de Bisoxatina	8	0,22	Hidróxido de Trimetilsulfonio	11	0,13
Tetraclorofenoltaleina	3	0,15	Besunida	8	0,35	Tetramina	11	0,13
Metocarbamol	3	0,15	Celiprolol	8	0,20	KC-8973	11	0,15
Ioduro de barbismetilo	4	0,24	Erisimina	8	0,26	Picosulfato	12	0,80
Bromuro de pancuronio	4	0,20	Peruvósido	8	0,32	Acetazolamida	12	0,58
Metioglicato magnésico	4	0,27	Asame	8	0,42	Glicondamida	12	0,48
Pirantel	5	0,03	Carbavina	9	0,11	Estreptomina	12	1,45
Remifentanilo	5	0,04	RMI 11894	9	0,10			

La gran variabilidad estructural de los datos de entrenamiento seleccionados hace posible el descubrimiento de compuestos líderes. En este sentido, 10 compuestos tricomonocidas y 22 con diferentes actividades farmacológicas (para un total de 32) fueron utilizados para la validación externa de los modelos. Estos compuestos nunca fueron utilizados para la obtención de los modelos de clasificación.

### 3.1.2 Resultados de los modelos de predicción usando índices cuadráticos no estocásticos y estocásticos basados en relaciones de átomos

#### 3.1.2.1 Desarrollo y validación de las funciones discriminantes

Una vez calculados los índices cuadráticos no estocásticos y estocásticos se procedió a la obtención de los modelos mediante análisis discriminante lineal (ADL). Esta técnica permite

encontrar una función discriminante con la habilidad de distinguir entre dos grupos de poblaciones (van de Waterbeemd, 1995a). Para obtener la función discriminante que permitió la clasificación de compuestos como posibles activos frente a *T. vaginalis*, fueron empleados como variables independientes los  $k$ -ésimos ( $k = 15$ ) índices cuadráticos totales y locales estocásticos y no estocásticos basados en relaciones de átomos no considerando y considerando átomos de hidrógenos (H) en el pseudo-grafo molecular (G), [ $q_k(\bar{x})$ ,  $q_k^H(\bar{x})$ ,  $q_{kL}(\bar{x}_E)$  y  $q_{kL}^H(\bar{x}_E)$ , respectivamente]. Estos índices fueron calculados con el programa **TOMOCOMD-CARDD** (Marrero y Romero, 2002). Los modelos obtenidos se pueden observar a continuación, junto con los parámetros estadísticos correspondientes.

$$Clasif = -5,6 + 0,034^E q_{3L}(\bar{x}_E) - 0,0066^E q_{4L}^H(\bar{x}_E) - 3,63 * 10^{-8E} q_{14L}(\bar{x}_E) + 2,54^E q_{14L}^H(\bar{x}_{E-H}) \quad (3.1)$$

$$N = 90 \quad \lambda = 0,33 \quad D^2 = 8,07 \quad F(4, 85) = 43,752 \quad p < 0,0001$$

$$Clasif = -3,83 + 0,47^{Es} q_{1L}(\bar{x}_E) - 0,76^{Es} q_{6L}^H(\bar{x}_E) + 0,45^{Es} q_{4L}(\bar{x}_E) \quad (3.2)$$

$$N = 90 \quad \lambda = 0,40 \quad D^2 = 5,94 \quad F(3, 86) = 44,999 \quad p < 0,0001$$

La ubicación de cada caso o compuesto en una de las clases se efectuó utilizando las probabilidades posteriores de clasificación. Los resultados de dicha clasificación son mostrados en las Tabla 3.3 y 3.4. Los modelos **3.1** y **3.2** clasifican correctamente el 94,44 % (88,24 %) y 86,67 % (88,24 %) de activos e inactivos en SE (SP), respectivamente (Ver exactitud en Tabla 3.5). Esta tabla también muestra los parámetros comúnmente usados en estadística médica [Sensibilidad, especificidad, falsos positivos y coeficiente de correlación de Matthews (*C*)] (Baldi y col., 2000).

**Tabla 3.3** Nombres y clasificación de los compuestos activos en las SE y SP según los modelos desarrollados para índices cuadráticos basado en relaciones de átomos.

Nombre	$\Delta P\%^a$	$\Delta P\%^b$	Nombre	$\Delta P\%^a$	$\Delta P\%^b$
SE Activos					
Anisomicina	<b>-94,39</b>	<b>-46,96</b>	Abunidazol	99,76	97,60
Virustamicina A	93,85	17,89	Imoctetrazolina	99,74	78,96
Azanidazol	100	98,92	Forminitrazol	92,63	97,64
Carnidazol	98,36	95,43	Clomizol	96,98	91,19
Propenidazol	98,51	99,35	Acinitrazol	92,39	98,69
Lauroguadina	<b>-97,87</b>	<b>-78,64</b>	Moxnidazol	100	99,94
Mepartricina A	85,44	89,65	Isometronidazol	96,21	97,90
Metronidazol	97,33	97,22	Fosfato de Metronidazol	99,44	99,96
Nifuratel	99,99	99,95	Benzoilmetronidazol	99,63	99,33
Nifuroxima	99,86	99,96	Bamnidazol	94,95	96,50
Nimorazol	99,14	99,55	Glicarsiamidona	7,70	30,38
Secnidazol	97,99	96,98	Fexinidazol	99,93	99,27
Cariolin	59,04	<b>-85,55</b>	Piperanitrozol	99,01	98,82
2-Amino-5-nitrotiazol	92,97	97,35	Gynotabs	99,70	99,43
Glicobiarzol	95,24	93,78	Pirinidazol	99,97	99,07
Clioquinol	<b>-48,10</b>	<b>-65,67</b>	Metronidazol hidrógeno succinato	98,49	99,06
Diiodohidroxiquinolina	<b>-51,66</b>	<b>-67,19</b>	Tolamizol	98,22	99,38
Ornidazol	99,86	97,45	Tiacetarsamida	<b>-54,04</b>	6,20
Trichomonacid	99,49	99,96	Tivanidazol	99,99	97,13
Lutenurina	30,12	<b>-25,97</b>			
SP Activos					
Furazolidona	99,98	99,80	Azomicina	100,00	99,11
Mepartricina B	88,10	84,70	Ternidazol	96,60	98,41
Aminitrozol	92,39	98,69	Misonidazol	99,64	99,31
Clotrimazol	<b>-4,77</b>	<b>-78,45</b>	Satranidazol	99,47	95,67

<sup>a,b</sup>Predicción de la actividad tricomonocida según ecuaciones 3.1 y 3.2, respectivamente:  $\Delta P\% = [P(\text{Activos}) - P(\text{Inactivos})] \times 100$ .

**Tabla 3.4** Nombres y clasificación de los compuestos inactivos en las SE y SP según los modelos desarrollados para índices cuadráticos basado en la matriz de adyacencia de átomos.

Nombre	$\Delta P\%^a$	$\Delta P\%^b$	Nombre	$\Delta P\%^a$	$\Delta P\%^b$
SE inactivos					
Amantadina	-99,46	-94,28	Nonaperona	-83,80	-73,33
Tiacetazona	-36,93	-26,86	Rolipram	-88,94	-44,61
Cloral betaina	-92,91	-97,44	<i>N</i> -Hidroximetil- <i>N</i> -metiltiourea	-99,85	-98,83
Carbavina	-99,64	-87,04	Ácido clorobenzóico	-95,02	-65,12
Norantoína	-90,60	-93,87	Acetanilo	-97,65	-85,89
Orotosan Fe	-97,84	-79,17	Guanazol	-99,93	-94,07
Picosulfato	-97,37	<b>98,90</b>	Tetramina	-98,98	-87,00
Naftazona	-36,37	-60,47	Mecisteina	-98,85	-98,90
Besunida	-97,70	<b>71,05</b>	Cirazolina	-76,07	-91,14
Acetazolamida	-86,07	<b>22,68</b>	Metocarbamol	-95,58	-84,82
Propamina	-99,75	-95,59	Lisergida	-74,07	-70,16
RMI 11894	-96,77	-96,29	Dopamina	-95,86	-91,45
Ag 307	-97,11	-84,64	Bufeniodo	-83,88	-74,07
Ioduro de barbismetilo	-96,02	-78,43	Celiprolol	-91,63	-22,27
Bromuro de pancuronio	-86,30	<b>22,86</b>	Erisimina	-72,66	<b>24,64</b>
Éter vinílico	-99,14	-90,83	Peruvósido	-28,13	<b>42,60</b>
Basedol	-95,23	-89,81	Amitraz	-17,99	-97,28
Carbimazol	-90,24	-90,08	Proclonol	-75,60	-77,75
Levulinato de didimio	-99,35	-85,61	Asame	-56,42	-76,53
Percloroetano	-1,64	-96,32	KC-8973	-89,34	-80,56
Pirantel	-70,33	-94,79	Etidina	-96,89	-70,92
Remifentanilo	-93,02	-68,33	Metioglicato magnésico	-95,78	-89,74
Petidina	-98,32	-71,15	Alibendol	-96,80	-69,43
Tartrato de tenalidina	-95,56	-76,40	Bromuro de diponio	-98,12	-56,84
Bamipina	-94,45	-80,78	Estreptomicina	-30,19	-72,15
Colestipol	-99,94	-96,22			
SP Inactivos					
Metenamina	-98,35	-89,82	Ciclopramina	-91,72	-90,21
Tetraclorofenoltaleina	-92,19	<b>57,12</b>	Hidróxido de trimetilsulfonio	-99,65	-81,31
Carazolol	-91,95	-79,82	Zoxazolamina	-92,49	-68,97
Frigen 113	40,47	-99,11	Acetilcolina	-99,64	-54,67
Eticumarol	-92,81	-12,52			

<sup>a,b</sup>Predicción de la actividad tricomonocida según ecuaciones 3.1 y 3.2, respectivamente:  $\Delta P\% = [P(\text{Activos}) - P(\text{Inactivos})] \times 100$ .

**Tabla 3.5** Resultados de la predicción de dos modelos QSAR basados en ADL de las SE y SP.

	<b>Coefficiente Correlación Matthews (C)</b>	<b>Exactitud 'Q<sub>Total</sub>' (%)</b>	<b>Sensibilidad 'hit rate' (%)</b>	<b>Especificidad (%)</b>	<b>Falsos Positivos 'false alarm rate' (%)</b>
<b>Índice Cuadrático tipo-Átomo No-estocástico (Ec. 3.1)</b>					
SE	0,89	94,44	87,18	100,00	8,93
SP	0,75	88,24	87,50	87,50	11,11
<b>Índice Cuadrático tipo-Átomo Estocástico (Ec. 3.2)</b>					
SE	0,73	86,67	84,62	84,62	11,76
SP	0,75	88,24	87,50	87,50	11,11

### 3.1.3 Resultados de los modelos de predicción usando índices lineales no estocásticos y estocásticos basados en relaciones de átomos

#### 3.1.3.1 Desarrollo y validación de la función discriminante

Utilizando el programa *TOMOCOMD-CARDD* para el cálculo de los índices lineales y el ADL fueron obtenidas los modelos de clasificación **3.3** y **3.4**. En este caso se emplearon como variables independientes los *k*-ésimo ( $k = 15$ ) índices lineales basados en relaciones de átomos (específicamente heteroátomos: S, N, O) no considerando y considerando átomos de hidrógenos (H) en el pseudo-grafo molecular (G), [ $f_{kL}(\bar{x}_E)$  y  $f_{kL}^H(\bar{x}_E)$ , respectivamente]. Los modelos y los parámetros estadísticos obtenidos pueden ser observados a continuación:

$$\text{Clasif} = 1,7422 + 28,0505^E f_{1L}(\bar{x}_E) - 31,1775^E f_{2L}^H(\bar{x}_E) + 6,5594^E f_{0L}(\bar{x}_E) + 2,1860^E f_{8L}^H(\bar{x}_{E-H}) \quad (3.3)$$

$$N = 90 \quad \lambda = 0,308 \quad D^2 = 8,91 \quad F(4, 85) = 47,558 \quad p < 0,0001$$

$$\text{Clasif} = -7,783 + 5,108^{Es} f_{1L}^H(\bar{x}_E) - 4,406^{Es} f_{14L}(\bar{x}_E) + 2,9609^{Es} f_{1L}^H(\bar{x}_{E-H}) - 3,60839^{Es} f_{4L}^H(\bar{x}_{E-H}) \quad (3.4)$$

$$N = 90 \quad \lambda = 0,32 \quad D^2 = 8,43 \quad F(4, 85) = 44,999 \quad p < 0,0001$$

donde N es el número de compuestos,  $\lambda$  es el estadístico Wilkis,  $D^2$  es la distancia cuadrada de Mahalanobis, F es la razón de Fisher y  $p$  es el nivel de significación.

En la Tabla 3.7 son mostrados los valores de  $\Delta P\%$  para todos los compuestos activos incluidos en la SE y SP. La misma información, pero para el caso de los compuestos inactivos es mostrada en la Tabla 3.8.

**Tabla 3.7** Nombres y clasificación de los compuestos activos en la SE y SP según los modelos desarrollados para índices lineales basado en las relaciones de átomos.

Nombre	$\Delta P\%^a$	$\Delta P\%^b$	Nombre	$\Delta P\%^a$	$\Delta P\%^b$
SE Activos					
Anisomicina	<b>-87,34</b>	<b>-96,01</b>	Abunidazol	99,91	99,59
Virustamicina A	24,23	95,00	Imoctetrazolina	99,67	87,51
Azanidazol	99,97	99,88	Forminitrazol	99,00	92,60
Carnidazol	99,55	95,88	Clomizol	99,67	90,28
Propenidazol	98,84	99,01	Acinitrazol	98,79	92,97
Lauroguadina	<b>-93,35</b>	<b>-81,49</b>	Moxnidazol	99,99	99,83
Mepartricina A	99,93	96,22	Isometronidazol	99,39	97,97
Metronidazol	99,39	97,51	Fosfato de Metronidazol	100,00	99,75
Nifuratel	99,97	99,79	Benzoilmetronidazol	98,64	99,27
Nifuroxima	100,0	99,80	Bamnidazol	93,58	24,62
Nimorazol	99,90	97,40	Glicarsiamidona	68,52	55,98
Secnidazol	99,38	98,11	Fexinidazol	99,87	99,61
Cariolin	<b>-66,78</b>	<b>-82,65</b>	Piperanitrozol	99,35	98,25
2-Amino-5-nitrotiazol	99,34	92,70	Gynotabs	99,52	99,39
Glicobiarzol	99,99	84,19	Pirinidazol	99,97	99,83
Clioquinol	19,75	<b>-61,41</b>	Metronidazol hidrógeno succinato	97,23	91,69
Diodohidroxiquinolina	15,10	<b>-52,51</b>	Tolamizol	99,16	98,69
Ornidazol	99,99	99,80	Tiacetarsamida	15,35	<b>-40,28</b>
Trichomonacid	100,0	99,99	Tivanidazol	99,94	99,98
Lutenurina	8,57	55,57			
SP Activos					
Acetarsona	80,75	56,94	Pentamicina	98,52	95,73
Furazolidona	99,91	99,51	Azomicina	99,93	96,83
Mepartricina B	99,93	95,43	Ternidazol	99,37	98,01
Aminitrozol	98,79	92,97	Misonidazol	99,69	96,76
Clotrimazol	<b>-94,25</b>	<b>-92,61</b>	Satranidazol	93,01	97,32

<sup>a,b</sup>Predicción de la actividad tricomonicida según ecuaciones 3.3 y 3.4, respectivamente:  $\Delta P\% = [P(\text{Activos}) - P(\text{Inactivos})] \times 100$ .



**Tabla 3.8** Nombres y clasificación de los compuestos inactivos en la SE y SP según los modelos desarrollados para índices lineales basados en relaciones de átomos.

Nombre	$\Delta P\%^a$	$\Delta P\%^b$	Nombre	$\Delta P\%^a$	$\Delta P\%^b$
			SP Inactivos		
Amantadita	-97,27	-99,65	Nonaperona	-84,66	-95,58
Tiacetazona	-43,43	-37,98	Rolipram	-91,31	-94,58
Cloral betaina	-83,12	-99,90	N-Hidroximetil-N-metiltiourea	-96,86	-99,73
Carbavina	-99,77	-99,74	Ácido clorobenzóico	-96,66	-95,49
Norantoína	-99,54	-99,54	Acetanilo	-97,76	-9,44
Orotansan Fe	-99,66	-99,83	Guanazol	-87,17	-99,94
Picosulfato	-81,32	-1,45	Tetramina	-92,44	-98,53
Naftazona	-91,67	-91,84	Mecisteina	-96,60	-100
Desunida	-75,73	36,06	Cirazolina	-94,13	-98,83
Acetazolamida	-59,08	-89,84	Metocarbamol	-97,25	-99,91
Propamina	-97,43	-99,85	Lisergida	-74,51	-94,29
RMI 11894	-97,74	-99,76	Dopamina	-87,09	-96,24
Ag 307	-98,18	-89,99	Bufeniodo	-4,42	-15,90
Ioduro de barbismetilo	-99,20	-99,76	Celiprolol	-88,84	-45,77
Bromuro de pancuronio	-96,72	-96,60	Erisimina	-50,18	<b>31,11</b>
Éter vinílico	-96,07	-99,86	Peruvósido	-29,66	-9,42
Basedol	-98,06	-99,17	Amitraz	-98,57	-94,92
Carbimazol	-99,28	-99,51	Proclonol	-59,31	-86,92
Levulinato de didimio	-99,15	-99,91	Asame	-93,04	-99,77
Percloroetano	-14,85	-99,58	KC-8973	-93,73	-98,80
Pirantel	-94,51	-96,81	Etidina	-98,09	-99,52
Remifentanilo	-97,43	-96,47	Metioglicato magnésico	-95,55	-98,65
Petidina	-96,37	-96,73	Alibendol	-77,09	-79,27
Tartrato de tenalidina	-78,66	-92,60	Bromuro de diponio	-97,36	-99,63
Bamipina	-91,51	-98,23	Estreptomicina	<b>75,15</b>	-59,47
Colestipol	-97,51	-99,54			
			SP Inactivos		
Metenammina	-90,02	-99,98	Ciclopramina	-85,17	-98,68
Tetraclorofenoltaleina	<b>56,34</b>	<b>91,20</b>	Hidróxido de trimetilsulfonio	-92,60	-99,56
Acetato de Bisoxatina	-97,59	-24,29	Zoxazolamina	-97,54	-96,62
Glicondamida	-84,81	<b>1,38</b>	Acetilcolina	-96,29	-99,95
Frigen 113	-62,80	-100	Carazolol	-19,93	-86,94
Eticumarol	-93,24	-63,93			

<sup>a,c</sup> Predicción de la actividad tricomonida según ecuaciones 3.3 y 3.4, respectivamente:  $\Delta P\% = [P(\text{Activos}) - P(\text{Inactivos})] \times 100$ .

El modelo 3.3 clasifica correctamente el 92,31 % (36 de 39 compuestos) y 98,04 % (50 de 51 compuestos) de los compuestos activos e inactivos, correspondientemente, de la SE. El porcentaje de clasificación global (exactitud) para esta ecuación fue de 95,56 %. El modelo 3.4 clasifica correctamente el 91,11 % de los compuestos de la SE. Específicamente, clasifica correctamente 33 de los 39 (84,62 %) compuestos tricomonidas y 49 de los 51 (96,08 %) de los compuestos inactivos, todos pertenecientes a dicha serie. Estas dos ecuaciones (3.3 y 3.4)

muestran un 90,48 % (19/21) y 85,71 % (18/21) de predictibilidad, respectivamente, en la SP externa.

**Tabla 3.9** Resultados de la predicción de dos modelos QSAR basados en ADL de las SE y SP.

	<b>Coefficiente Correlación Matthews (C)</b>	<b>Exactitud 'Q<sub>Total</sub>' (%)</b>	<b>Sensibilidad 'hit rate' (%)</b>	<b>Especificidad (%)</b>	<b>Falsos Positivos 'false alarm rate' (%)</b>
<b>Índice Lineal tipo-Átomo No-estocástico (Ec. 3.3)</b>					
SE	0,91	95,56	92,31	97,3	2,0
SP	0,81	90,48	90,00	81,82	10,0
<b>Índice Lineal tipo-Átomo Estocástico (Ec. 3.4)</b>					
SE	0,82	91,11	84,62	94,29	3,92
SP	0,72	85,71	90,00	81,82	18,88

La Tabla 3.9 muestra los valores de (exactitud, sensibilidad, especificidad y razón de falsos positivos) así como el coeficiente de correlación de Matthews (C) para ambos modelos (Baldi y col., 2000).

Aunque uno de los criterios más importantes a tomar en cuenta durante la evaluación de la calidad de un modelo discriminante se basa en la predictibilidad de la serie de prueba externa, son recomendados igualmente, los procesos de validación interna de las funciones encontradas.

**Tabla 3.10** Resultados de la validación cruzada dejando el 10 % de los casos fuera de la SE.

<b>Grupo</b>	<b>%Clasif<sup>a</sup></b>	<b><math>\lambda</math></b>	<b>D<sup>2</sup></b>	<b>F</b>	<b>%Clasif<sup>b</sup></b>	<b>%Clasif<sup>a</sup></b>	<b><math>\lambda</math></b>	<b>D<sup>2</sup></b>	<b>F</b>	<b>%Clasif<sup>b</sup></b>	
<b>Ec. 3.3 (índice lineal basado en átomo no est.)</b>						<b>Ec. 3.4 (índice lineal basado en átomo est.)</b>					
1	93,67	0,28	10,05	46,80	81,81	91,36	0,30	8,93	42,72	88,88	
2	94,94	0,28	9,83	45,76	90,90	92,59	0,28	9,84	47,04	77,77	
3	96,20	0,31	8,52	39,66	90,90	90,12	0,34	7,42	35,49	100	
4	94,94	0,28	10,20	47,01	81,81	92,59	0,30	9,12	43,60	77,77	
5	92,40	0,34	7,69	35,80	100	91,35	0,31	8,56	40,92	88,88	
6	93,67	0,31	8,46	39,38	100	90,12	0,33	7,73	36,96	100	
7	93,67	0,30	8,85	41,20	81,81	90,12	0,33	7,89	37,75	100	
8	93,63	0,31	8,41	39,42	90,90	90,12	0,31	8,87	42,00	88,88	
9	62,40	0,34	7,69	35,80	100	88,88	0,31	8,68	41,52	88,88	
10	94,94	0,28	9,83	45,76	90,90	91,46	0,32	8,27	39,18	88,88	
Media	94,05	0,30	8,95	41,66	90,90	90,87	0,31	8,52	40,72	89,99	
SD	1,2	0,02	0,96	4,37	7,43	1,20	0,02	0,72	3,45	8,20	

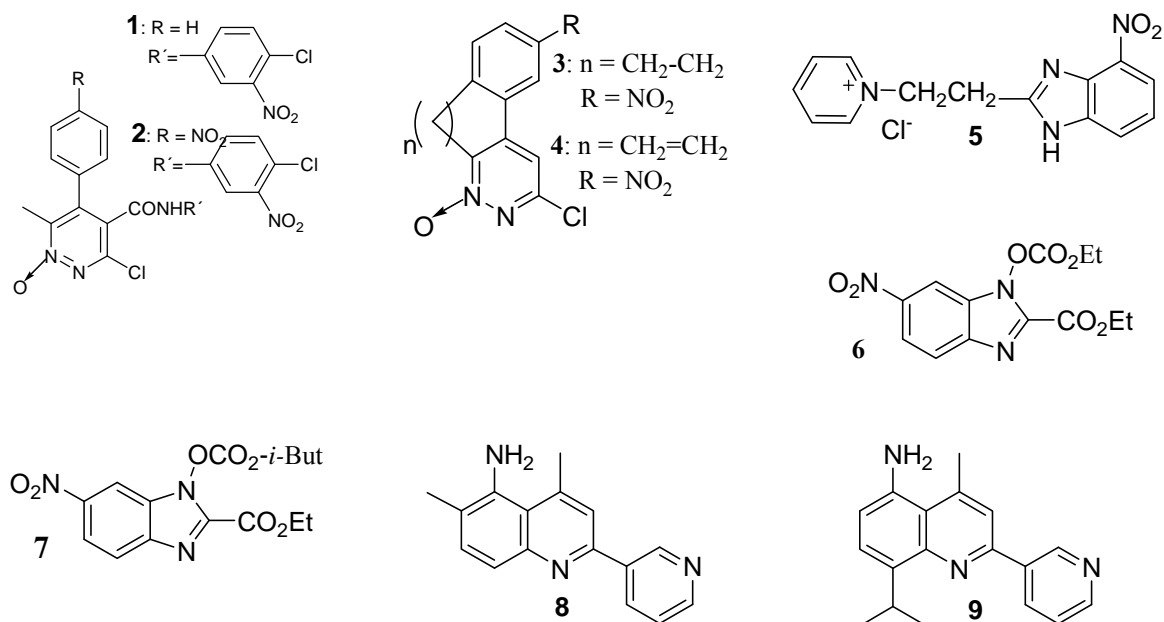
a,b Buena clasificación global para ambos modelos en SE (90 % de la *data*) y SP (10 % de la *data*), respectivamente  
 Ec. = Ecuación  
 Est. = Estocástica  
 Clasif = Clasificación

Tomando esto en cuenta y con el fin de probar la robustez de los modelos obtenidos, fue diseñado un ejercicio de validación cruzada (VC) dejando el 10 % de los compuestos fuera de la SE (*Leave-10-fold full-out*, según sus siglas en inglés); correspondiendo este 10 % a 9

compuestos retirados en cada paso (Wold y Eriksson, 1995; Rose y col., 2002). De esta forma fueron obtenidos 10 modelos dejando fuera cada vez 9 observaciones diferentes. Los resultados estadísticos de este proceso son mostrados en la Tabla 3.10.

### 3.1.3.2 Corroboración del poder predictivo de los modelos utilizando una segunda SP externa

**Tabla 3.11** Identificación de compuestos citados en la literatura como tricomonocidas usando modelos QSAR basados en ADL en ensayos de simulación virtual.



Comp. <sup>a</sup>	Ref. <sup>b</sup>	$\Delta P\%^c$	$\Delta P\%^d$	Actividad antitricomona
1	Gavini y col., 1997	100	100	MCI = 31,5 $\mu$ g/ml <sup>e</sup>
2		100	100	MCI = 12,5 $\mu$ g/ml <sup>e</sup>
3	Gavini y col., 2000	100	100	MCI = 31,3 $\mu$ g/ml <sup>e</sup>
4		100	100	MCI = 3,9 $\mu$ g/ml <sup>e</sup>
5	Alcalde y col., 1995	99,91	99,84	MCL = 50 $\mu$ g/ml <sup>f</sup> LD <sub>50</sub> = 50 $\mu$ g/ml <sup>f</sup>
6	Aguirre y col., 2004	99,91	99,99	100 $\mu$ g/ml = 71,3 <sup>g</sup>
7				10 $\mu$ g/ml = 14,4 <sup>g</sup>
				1 $\mu$ g/ml = 0,0 <sup>g</sup>
		99,90	99,99	100 $\mu$ g/ml = [87,5] <sup>g</sup>
				10 $\mu$ g/ml = 17,3 <sup>g</sup>
				1 $\mu$ g/ml = 9,6 <sup>g</sup>
8	Kounetsov y col., 2004b	26,31	-93,21	100 $\mu$ g/ml = 58,3 [82,3] <sup>h</sup>
				10 $\mu$ g/ml = 29,1 [21,6] <sup>h</sup>
				1 $\mu$ g/ml = 18,1 [6,8] <sup>h</sup>
9		21,22	-92,26	100 $\mu$ g/ml = 65,4 [73,9] <sup>h</sup>
				10 $\mu$ g/ml = 56,7 [16,7] <sup>h</sup>
				1 $\mu$ g/ml = 40,1 [0,0] <sup>h</sup>

<sup>a</sup>Las estructuras moleculares de los compuestos están respresentadas en la parte superior de la tabla. <sup>b</sup> Referencias bibliográficas de donde fueron tomados los resultados de la actividad *in vitro*. <sup>c</sup>  $\Delta P\%$  = [P(Activo) - P(Inactivo)]x100. <sup>d</sup> Predicción de la actividad tricomonocida por las Ec. 3.3 y 3.4; <sup>e</sup>MCI: Mínima concentración inhibitoria. <sup>f</sup>MCL: Mínima concentración letal usada que mata a los parásitos a las 24 horas. LD<sub>50</sub>: Mínima concentración usada que reduce los parásitos al 50 % <sup>g</sup>Porcentaje de inhibición de crecimiento de *T. vaginalis* a las 24 h. <sup>h</sup>Actividad específica frente a *T. vaginalis*.

Con el objetivo de demostrar las posibilidades de utilización de los ensayos virtuales para detectar y evaluar compuestos con actividad tricomonocida, fue seleccionada de la literatura una serie de 9 compuestos tricomonocidas cuyas estructuras aparecen en la Tabla 3.11 (Gavini y col., 1997; 2000; Aguirre y col., 2004; Kouznetsov y col., 2004b). Este experimento de simulación virtual fue efectuado con los modelos 3.3 y 3.4 y los resultados del mismo son mostrados en la Tabla 3.11.

### 3.1.4 Resultados de los modelos de predicción usando un índices bilineales no estocásticos y estocásticos basados en relaciones de átomos

#### 3.1.4.1 Desarrollo y validación de la función discriminante

Los siguientes modelos lineales fueron obtenidos empleando como variables independientes los  $k$ -ésimo ( $k = 15$ ) índices bilineales no estocásticos y estocásticos totales y locales (heteroátomos: S, N, O y halógenos: F, Cl, I y Br), considerando y no considerando átomos de hidrógenos (H) en el pseudo-grafo molecular (G), correspondientemente [(Totales:  $\mathbf{b}_k(\bar{x}, \bar{y})$  y  $\mathbf{b}_k^H(\bar{x}, \bar{y})$ ). Locales:  $\mathbf{b}_{kL}(\bar{x}, \bar{y})$  y  $\mathbf{b}_{kL}^H(\bar{x}, \bar{y})$ ]. Dichos índices tienen en cuenta las relaciones existentes entre los diferentes átomos en las moléculas. Los modelos obtenidos se muestran a continuación:

$$\begin{aligned} \text{Clasif} = & -3,37 - 0,07^{\text{MP}} \mathbf{b}_{1L}^H(\bar{x}_E, \bar{y}_E) + 0,04^{\text{ME}} \mathbf{b}_{1L}(\bar{x}_E, \bar{y}_E) + 0,10^{\text{MV}} \mathbf{b}_{0L}^H(\bar{x}_{E-H}, \bar{y}_{E-H}) \\ & + 1,39 \times 10^{-10} \text{MV} \mathbf{b}_{15L}(\bar{x}_{hal}, \bar{y}_{hal}) \end{aligned} \quad (3.5)$$

$$N = 91 \quad \lambda = 0,43 \quad D^2 = 5,07 \quad F(4,86) = 27,48 \quad p < 0,0001$$

$$\begin{aligned} \text{Clasif} = & -6,83 + 0,21^{\text{MEs}} \mathbf{b}_{1L}^H(\bar{x}_E, \bar{y}_E) - 0,20^{\text{MPs}} \mathbf{b}_{1L}^H(\bar{x}_E, \bar{y}_E) - 0,08^{\text{MEs}} \mathbf{b}_{4L}(\bar{x}_E, \bar{y}_E) \\ & + 0,05^{\text{MPs}} \mathbf{b}_{4L}(\bar{x}_E, \bar{y}_E) \end{aligned} \quad (3.6)$$

$$N = 91 \quad \lambda = 0,28 \quad D^2 = 9,90 \quad F(4,86) = 53,6 \quad p < 0,0001$$

donde N es el número de compuestos,  $\lambda$  es el estadístico Wilkis,  $D^2$  es la distancia cuadrada de Mahalanobis, F es la razón de Fisher y  $p$  es el nivel de significación.

En las Tablas 3.13 y 3.14, se exponen los resultados de clasificación en las SE y SP de compuestos activos e inactivos, respectivamente.

**Tabla 3.13** Nombre y clasificación de los compuestos activos en la SE y SP según los dos modelos desarrollados para índices bilineales basados en relaciones de átomos.

Nombre	$\Delta P\%^a$	$\Delta P\%^b$	Nombre	$\Delta P\%^a$	$\Delta P\%^b$
SE Activos					
Anisomicina	<b>-47,33</b>	<b>-97,43</b>	Abunidazol	91,72	99,98
Virustamicina A	93,52	67,64	Imoctetrazolina	71,08	92,44
Azanidazol	96,69	100,00	Forminitrazol	32,42	98,62
Carnidazol	38,54	99,36	Clomizol	81,88	98,90
Propenidazol	94,86	99,59	Acinitrazol	32,42	98,13
Lauroguadina	<b>-7,45</b>	<b>-80,17</b>	Moxnidazol	98,77	99,99
Mepartricina A	99,81	99,59	Isometronidazol	86,81	99,76
Metronidazol	86,81	99,76	Fosfato de Metronidazol	29,96	59,30
Nifuratel	84,15	99,95	Benzoilmetronidazol	91,73	99,62
Nifuroxima	97,68	100,00	Bamnidazol	95,43	98,48
Nimorazol	88,44	99,86	Glicarsiamidona	97,91	97,33
Secnidazol	86,81	99,72	Fexnidazol	21,48	99,92
Cariolin	<b>-42,76</b>	<b>-81,68</b>	Piperanitrozol	28,04	98,85
2 –Amino 5–nitrotiazol	20,56	99,31	Gynotabs	14,71	99,54
Glicobiarzol	99,94	99,97	Pirinidazol	29,16	99,95
Clioquinol	73,30	1,41	Metronidazol hidrógeno succinato	96,82	98,48
Diidodihidroxiquinolina	97,05	96,77	Tolamizol	32,42	99,38
Ornidazol	75,77	99,76	Tiacetarsamida	94,51	99,69
Trichomonacid	94,38	99,99	Tivanidazol	55,69	99,96
Lutenurina	<b>-93,16</b>	<b>-80,97</b>	Policresulen	92,49	46,69
SP Activos					
Acetarsona	97,91	97,07	Pentamicina	85,17	68,05
Furazolidona	98,14	99,93	Azomicina	83,30	99,50
Mepartricina B	99,85	99,64	Ternidazol	86,81	99,62
Aminitrozol	32,42	98,13	Misonidazol	91,72	99,84
Clotrimazol	<b>-76,05</b>	<b>-97,67</b>	Satranidazol	97,72	99,94

<sup>a,b</sup>Predicción de la actividad tricomonocida, Ec. 3.5 y 3.6, respectivamente:  $\Delta P\% = [P(\text{Activo}) - P(\text{Inactivo})] \times 100$ .

**Tabla 3.14** Nombre y clasificación de los compuestos activos en la SE y SP según los dos modelos desarrollados para índices bilineales basados en relaciones de átomos.

Nombre	$\Delta P\%^a$	$\Delta P\%^b$	Nombre	$\Delta P\%^a$	$\Delta P\%^b$
SE Inactivos					
Amantadina	-88,09	-99,23	Nonaperona	-73,42	-98,81
Tiacetazona	-85,62	-83,27	Rolipram	-77,92	-98,10
Cloral betaina	-97,74	-99,95	<i>N</i> -Hidroxiometil- <i>N</i> -metiltiourea	-99,53	-99,41
Carbavina	-71,03	-99,86	Ácido clorobenzóico	-88,49	-99,02
Norantoína	-73,34	-99,43	Acetanilo	-91,13	-99,67
Orotansan Fe	-31,51	-98,93	Guanazol	-96,22	-87,22
Picosulfato	<b>99,83</b>	-47,26	Tetramina	-92,94	-98,54
Naftazona	-11,30	-88,74	Mecisteina	-98,38	-99,40
Besunida	-7,50	-78,98	Cirazolina	-89,86	-98,50
Acetazolamida	-55,85	-75,20	Metocarbamol	-76,15	-98,79
Propamina	-96,72	-95,79	Lisergida	-88,43	-98,02
RMI 11894	-89,12	-99,67	Dopamina	-96,55	-86,50
Ag 307	-99,53	-99,12	Bufeniodo	-74,49	<b>97,42</b>
Ioduro de barbismetilo	-55,21	-98,63	Celiprolol	-80,26	-97,56
Bromuro de pancuronio	-47,42	-99,64	Erisimina	-54,17	-75,64
Éter vinílico	-89,37	-99,72	Peruvósido	-31,22	-79,67
Basedol	-98,42	-99,52	Amitraz	-90,07	-97,80
Carbimazol	-97,38	-99,93	Proclonol	-89,86	-96,32
Levulinato de didimio	-73,91	-99,90	Asame	-49,07	-97,97
Percloroetano	-99,89	-100,00	KC-8973	-68,81	-99,32
Pirantel	-99,01	-98,87	Etidina	-35,76	-99,19
Remifentanilo	-86,18	-99,44	Metioglicato magnésico	-99,97	-99,63
Petidina	-80,90	-99,59	Alibendol	-87,74	-89,15
Tartrato de tenalidina	-99,67	-99,17	Bromuro de diponio	-80,08	-99,85
Bamipina	-91,31	-98,89	Estreptomicina	-93,72	<b>98,61</b>
Colestipol	-98,01	-96,05			
SP Inactivos					
Citenazona	-99,19	-70,13	Neguvón	-99,90	-100,00
Metenammina	-88,66	-98,78	Ciclopramina	-89,12	-97,90
Penticloral	-93,91	-99,82	Litracen	-90,48	-99,26
Ferdomus	-100,00	-100,00	Hidróxido de trimetilsulfonio	-99,75	-99,60
Tetraclorofenoltaleina	<b>99,88</b>	-41,97	Norgamem	-99,06	-99,74
Acetato de Bisoxatina	-2,21	-98,52	Zoxazolamina	-88,01	-97,42
Glicondamida	<b>53,05</b>	-51,19	Acetilcolina	-80,08	-99,76
Broncolina	-98,57	-97,24	Carazolol	-93,13	-91,98
Imekhina	-92,06	-99,68	Cefazolina	-86,99	<b>99,31</b>
Frigen 113	-96,68	-100,00	Penicilina	-97,15	-99,48
Eticumarol	-20,79	-91,89	Aziromicina	-88,70	-99,57

<sup>a,b</sup> Predicción de la actividad tricomonocida, Ec. 3.5 y 3.6, respectivamente:  $\Delta P\% = [P(\text{Activo}) - P(\text{Inactivo})] \times 100$ .

La Tabla 3.15 muestra los parámetros médico-estadísticos calculados para los modelos de clasificación anteriormente mencionados.

**Tabla 3.15** Resultados de la predicción de dos modelos QSAR basados en ADL de las SE y SP.

	Coefficiente Correlación Matthews (C)	Exactitud 'Q <sub>Total</sub> ' (%)	Sensibilidad 'hit rate' (%)	Especificidad (%)	Falsos Positivos 'false alarm rate' (%)
<b>Índice Bilineal tipo-Átomo No-estocástico (Ec. 3.5)</b>					
SE	0,89	94,51	90	97	2
SP	0,79	90,63	90	82	9
<b>Índice Bilineal tipo-Átomo Estocástico (Ec. 3.6)</b>					
SE	0,87	93,41	90	95	4
SP	0,85	93,75	90	90	5

Siguiendo la estrategia de *validación interna* se procedió a realizar la VC dejando en este caso el 15 % de los compuestos fuera, retirándose los mismos sistemáticamente y construyendo nuevos modelos, con el 85 % de los compuestos en la SE. Este procedimiento fue repetido en un total de 7 veces. Los resultados obtenidos pueden ser observados en la Tabla 3.16. En todos los casos el porcentaje de clasificación global estuvo por encima del 90 % tanto para la SE como para la SP.

**Tabla 3.16** Resultados de la validación cruzada dejando el 15 % de los casos fuera de la SE.

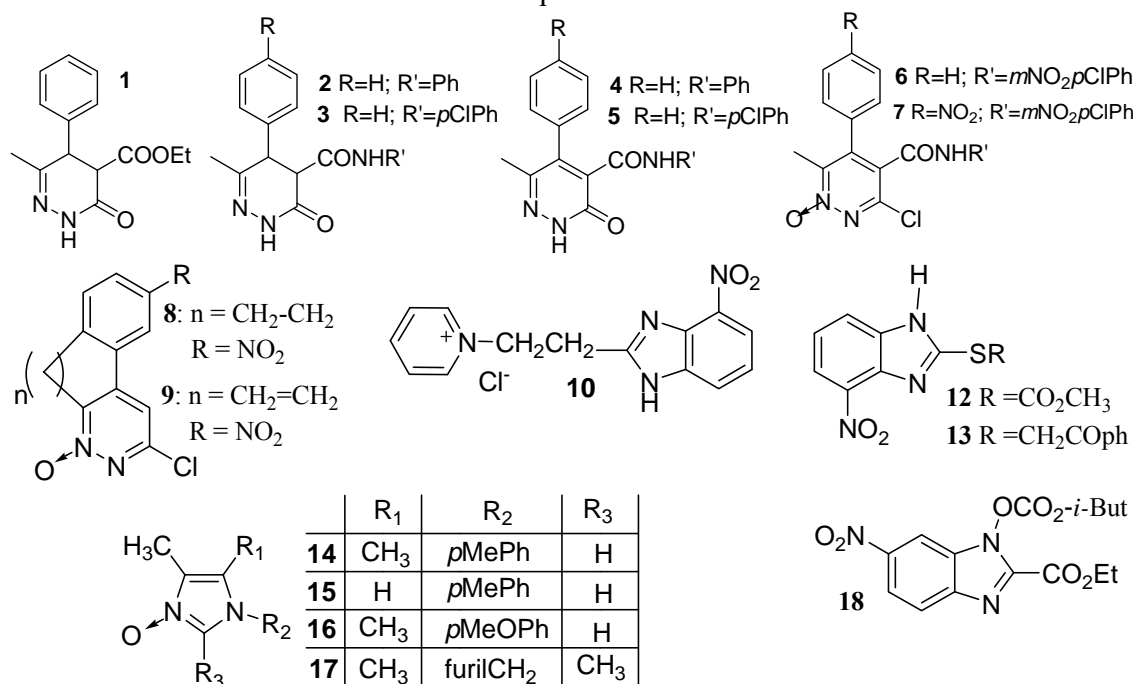
Grupo	%Clasif <sup>a</sup>	$\lambda$	D <sup>2</sup>	F	%Clasif <sup>b</sup>	%Clasif <sup>a</sup>	$\lambda$	D <sup>2</sup>	F	%Clasif <sup>b</sup>	
Ec. 3.5 (Índice bilineal basado en átomo no est.)						Ec. 3.6 (Índice bilineal basado en átomo est.)					
1	96,10	0,44	4,93	22,45	85,71	93,51	0,29	9,86	44,94	92,31	
2	94,81	0,46	4,61	20,99	100,00	93,51	0,26	11,43	52,07	92,31	
3	92,31	0,49	4,15	19,10	100,00	89,74	0,31	8,95	41,23	100,00	
4	93,59	0,45	4,88	22,48	100,00	93,59	0,28	10,23	47,11	92,31	
5	94,87	0,47	4,44	20,44	100,00	91,03	0,31	8,80	40,55	92,31	
6	97,47	0,38	6,89	30,36	83,33	93,67	0,26	11,10	51,97	83,33	
7	92,41	0,33	8,12	38,04	83,33	93,67	0,27	10,53	49,34	83,33	
Media	94,51	0,43	5,43	24,84	93,20	92,67	0,28	10,13	46,74	90,84	
SD	1,90	0,06	1,49	6,87	8,52	1,61	0,02	1,00	4,73	5,85	

a,b Buena clasificación global para ambos modelos en SE (85 % de la *data*) y SP (15 % de la *data*), respectivamente  
 Ec. = Ecuación  
 Est. = Estocástica.  
 Clasif = Clasificación

### 3.1.4.2 Corroboración del poder predictivo de los modelos utilizando una segunda SP externa

En la Tabla 3.17 se muestra los resultados de la predicción *in silico* de 18 compuestos tricomonocidas citados en la literatura (Alcalde y col., 1995; Gavini y col., 1997; 2000; Aguirre y col., 2004) utilizando las ecuaciones 3.5 y 3.6.

**Tabla 3.17** Identificación *in silico* de compuestos tricomonocidas citados en la literatura.



Comp. <sup>a</sup>	Ref. <sup>b</sup>	ΔP% <sup>c</sup>	ΔP% <sup>d</sup>	Actividad antitricomona
<b>1</b>		-17,22	-97,16	Inactivo
<b>2</b>		-22,76	-84,30	Inactivo
<b>3</b>		-18,25	-69,10	Inactivo
<b>4</b>	Gavini y col., 1997	-22,76	-65,23	Inactivo
<b>5</b>		-17,02	-37,80	Inactivo
<b>6</b>		100,00	100,00	MCI = 31,5μg/ml <sup>e</sup>
<b>7</b>		100,00	100,00	MCI = 12,5μg/ml <sup>e</sup>
<b>8</b>	Gavini y col., 2000	99,99	100,00	MCI = 31,3μg/ml <sup>e</sup>
<b>9</b>		99,99	100,00	MCI = 3,9μg/ml <sup>e</sup>
<b>10</b>		91,37	99,97	MCL = 50μg/ml <sup>f</sup> LD <sub>50</sub> = 50μg/ml <sup>f</sup>
<b>11</b>	Alcalde y col., 1995	13,03	99,82	MCL = 50μg/ml <sup>f</sup> LD <sub>50</sub> = 10-50μg/ml <sup>f</sup>
<b>12</b>		52,43	98,70	MCL = 50μg/ml <sup>f</sup> LD <sub>50</sub> = 10-50μg/ml <sup>f</sup>
<b>13</b>		32,42	99,78	MCL = 50μg/ml <sup>f</sup> LD <sub>50</sub> = 10-50μg/ml <sup>f</sup>
<b>14</b>		-59,06	31,89	Inactivo
<b>15</b>		-59,06	37,25	Inactivo
<b>16</b>		-40,75	70,88	Inactivo
<b>17</b>	Aguirre y col., 2004	-40,75	57,78	Inactivo
<b>18</b>		99,53	99,96	100μg/ml = [87,5] <sup>g</sup> 10μg/ml = 17,3 <sup>g</sup> 1μg/ml = 9,6 <sup>i</sup>

<sup>a</sup>Las estructuras moleculares de los compuestos están respresentadas en la parte superior de la tabla. <sup>b</sup> Referencias bibliográficas de donde fueron tomados los resultados de la actividad *in vitro*. <sup>c</sup> ΔP% = [P(Activo) - P(Inactivo)]x100. <sup>d</sup> Predicción de la actividad tricomonocida por las Ec. 3.5 y 3.6; <sup>e</sup> MCI: Mínima concentración inhibitoria. <sup>f</sup> MCL: Mínima concentración letal usada que mata a los parásitos a las 24 horas. LD<sub>50</sub>: Mínima concentración usada que reduce los parásitos al 50 % <sup>g</sup>Porcentaje de inhibición de crecimiento de *T. vaginalis* a las 24 h.



### 3.1.5 Resultados de los modelos de predicción usando índices cuadráticos no estocásticos y estocásticos basados en relaciones de enlace

#### 3.1.5.1 Desarrollo y validación de la función discriminante

Sobre la base de la metodología *TOMOCOMD-CARDD* fueron generados, de la misma forma que los modelos planteados hasta el momento en el presente trabajo, funciones discriminantes considerando como variables independientes los índices cuadráticos no estocásticos y estocásticos basados en las relaciones de enlaces. Dichos modelos, así como los parámetros estadísticos correspondientes, son mostrados a continuación:

$$\begin{aligned} \text{Clasif} = & -4,92 - 1,40 \times 10^{-3} q_1^M(\bar{w}) + 0,22 q_0^H(\bar{w}) + 2,01 \times 10^{-2} q_1^P(\bar{w}) - 1,44 \times 10^3 q_{0L}^V(\bar{w}_E) \\ & + 0,13 q_{0L}^E q_{1L}^H(\bar{w}_E) + 5,82 \times 10^{-2} q_{1L}^E q_{1L}^H(\bar{w}_E) \end{aligned} \quad (3.7)$$

$$N = 91 \quad \lambda = 0,44 \quad D^2 = 5,02 \quad F(6,84) = 17,71 \quad p < 0,0000$$

$$\begin{aligned} \text{Clasif} = & -5,50 + 2,78 \times 10^{-3} q_{0L}^{Ms}(\bar{w}_E) + 7,87 \times 10^{-3} q_{1L}^{Ms}(\bar{w}_E) - 1,49 \times 10^{-2} q_{3L}^{Ms}(\bar{w}_E) \\ & - 0,25 q_{1L}^{Ps} q_{1L}^H(\bar{w}_E) + 0,49 q_{3L}^{Es} q_{3L}^H(\bar{w}_E) \end{aligned} \quad (3.8)$$

$$N = 91 \quad \lambda = 0,36 \quad D^2 = 6,86 \quad F(5,85) = 29,39 \quad p < 0,0000$$

En las Tablas 3.19 y 3.20 pueden apreciarse los valores de  $\Delta P\%$  para los compuestos activos e inactivos, respectivamente.

**Tabla 3.19** Nombre y clasificación de los compuestos activos en la SE y SP según los modelos desarrollados para índices cuadrático basados en relaciones de enlaces.

Nombre	$\Delta P\%^a$	$\Delta P\%^b$	Nombre	$\Delta P\%^a$	$\Delta P\%^b$
SE Activos					
Anisomicina	<b>-29,28</b>	38,15	Abunidazol	32,45	93,47
Virustamicina A	78,19	99,40	Imoctetrazolina	35,27	<b>-36,35</b>
Azanidazol	92,53	98,84	Forminitrazol	89,57	83,54
Carnidazol	94,20	92,49	Clomizol	90,67	98,19
Propenidazol	97,42	99,67	Acinitrazol	89,22	75,81
Lauroguadina	<b>-92,30</b>	<b>-45,38</b>	Moxnidazol	99,93	99,99
Mepartricina A	91,53	98,36	Isometronidazol	68,48	91,48
Metronidazol	69,08	91,09	Fosfato de Metronidazol	90,49	71,43
Nifuratel	99,22	99,97	Benzoilmetronidazol	98,17	98,76
Nifuroxima	89,84	98,08	Bamnidazol	96,73	96,93
Nimorazol	90,55	93,45	Glicarsiamidona	<b>-34,15</b>	<b>-10,61</b>
Secnidazol	59,89	77,39	Fexinidazol	81,25	99,62
Cariolin	<b>-84,08</b>	6,12	Piperanitrozol	96,83	84,34
2-Amino-5-nitrotiazol	48,25	39,79	Gynotabs	87,94	84,24
Glicobiarzol	83,73	97,80	Pirinidazol	90,84	96,71
Clioquinol	37,59	98,07	Metronidazol hidrógeno succinato	98,96	97,36
Diidohydroxyquinoline	63,69	95,97	Tolamizol	96,88	93,24
Ornidazol	92,97	98,30	Tiacetarsamida	6,22	<b>-65,88</b>
Trichomonacid	87,66	92,43	Tivanidazol	95,85	87,49
Lutenurina	<b>-31,81</b>	51,26	Policresulen	<b>-63,25</b>	<b>-78,01</b>
SP Activos					
Acetarsona	<b>-27,20</b>	10,11	Pentamicina	<b>-96,53</b>	<b>-99,57</b>
Furazolidona	99,72	99,93	Azomicina	56,06	75,54
Mepartricina B	93,76	50,32	Ternidazol	66,21	80,99
Aminitrozol	89,22	75,81	Misonidazol	74,42	94,52
Clotrimazol	1,93	<b>-37,19</b>	Satranidazol	98,48	98,93

<sup>a,b</sup>Predicción de la actividad tricomónica, Ec. 3.7 y 3.8, respectivamente:  $\Delta P\% = [P(\text{Active}) - P(\text{Inactive})] \times 100$ .

**Tabla 3.20** Nombre y clasificación de los compuestos inactivos en la SE y SP según los dos modelos desarrollados para índices cuadrático basados en relaciones de enlaces.

Nombre	$\Delta P\%$ <sup>a</sup>	$\Delta P\%$ <sup>b</sup>	Nombre	$\Delta P\%$ <sup>a</sup>	$\Delta P\%$ <sup>b</sup>
SE Inactivos					
Amantadina	-99,81	-99,56	Nonaperona	-71,30	-95,07
Tiacetazona	-78,46	-98,10	Rolipram	-77,60	-56,38
Cloral betaina	-99,28	-99,86	<i>N</i> -Hidroximetil- <i>N</i> -metiltiourea	-98,25	-99,87
Carbavina	-89,39	-90,44	Ácido clorobenzóico	-70,71	-86,21
Norantoína	-66,14	-76,73	Acetanilo	-93,65	-98,37
Orotonsan Fe	-14,22	<b>20,01</b>	Guanazol	-98,65	-99,71
Picosulfato	<b>84,58</b>	<b>68,69</b>	Tetramina	-97,88	-99,37
Naftazona	-67,94	-85,64	Mecisteina	-98,74	-98,30
Besunida	-70,54	-85,55	Cirazolina	-87,74	-94,17
Acetazolamida	-12,85	-91,01	Metocarbamol	-25,86	-11,53
Propamina	-99,91	-99,99	Lisergida	-87,90	-87,90
RMI 11894	-99,12	-99,43	Dopamina	-98,72	-97,60
Ag 307	-94,12	-99,45	Bufenodo	<b>11,15</b>	-93,94
Ioduro de barbismetilo	-99,16	-97,44	Celiprolol	-65,72	-86,20
Bromuro de pancuronio	-96,31	-96,64	Erisimina	-40,42	-18,58
Éter vinílico	-92,23	-97,95	Peruvósido	-13,71	<b>64,09</b>
Basedol	-61,43	-79,61	Amitraz	-89,33	-93,66
Carbimazol	<b>32,19</b>	-31,10	Proclonol	-59,16	-94,61
Levulinato de didimio	-94,02	-98,80	Asame	-81,15	-97,62
Percloroetano	-99,51	-97,54	KC-8973	-51,60	-88,11
Pirantel	-93,30	-98,23	Etidina	<b>38,73</b>	<b>11,75</b>
Remifentanilo	-71,40	-96,78	Metioglicato magnésico	-76,55	-99,99
Petidina	-92,06	-90,11	Alibendol	-88,74	-50,31
Tartrato de tenalidina	-99,27	-99,91	Bromuro de diponio	-94,93	-97,04
Bamipina	-96,60	-98,94	Estreptomicina	<b>74,73</b>	<b>86,40</b>
Colestipol	-99,82	-99,91			
SP Inactivos					
Citenazona	-79,26	-99,27	Neguvón	-96,96	-78,40
Metenammina	-83,69	-90,40	Ciclopramina	-97,13	-92,79
Penticloral	-93,97	<b>73,04</b>	Litracen	-99,63	-99,09
Ferriclato doble de sodio y calcio	-100,00	-100,00	Hidróxido de trimetilsulfonio	-99,98	-100,00
Ferroceron	<b>90,05</b>	-97,27	Norgamem	-96,22	-97,12
Emodina	-76,24	-79,33	Emylcamate	-91,15	-95,42
Butanol	-99,09	-99,60	Acetilcolina	-99,40	-99,74
Espironolactona	-86,18	-93,07	Carazolol	-91,64	-96,38
Broncolina	-99,95	<b>74,90</b>	Cefazolina	<b>99,69</b>	<b>99,69</b>
Imekhina	-99,77	-99,64	Penicilina	-33,19	-52,65
Difenadiona	-70,80	-94,80	Aziomicina	-89,86	-92,22

<sup>a,b</sup>Predicción de la actividad tricomonocida Ec. 3.7 y 3.8, respectivamente:  $\Delta P\% = [P(\text{Active}) - P(\text{Inactive})] \times 100$ .

La Tabla 3.21 muestra los resultados estadísticos obtenidos para las ecuaciones 3.7 y 3.8. En esta se observa una elevada sensibilidad y especificidad para los dos modelos obtenidos, así como una baja relación de falsos positivos.

**Tabla 3.21** Resultados de la predicción de dos modelos QSAR basados en ADL de las SE y SP.

	<b>Coefficiente Correlación Matthews (C)</b>	<b>Exactitud 'Q<sub>Total</sub>' (%)</b>	<b>Sensibilidad 'hit rate' (%)</b>	<b>Especificidad (%)</b>	<b>Falsos Positivos 'false alarm rate' (%)</b>
<b>Índice Cuadrático tipo-enlace No-estocástico (Ec. 3.7)</b>					
SE	0,75	87,91	85,0	87,18	9,8
SP	0,71	87,50	80,0	80,0	9,1
<b>Índice Cuadrático tipo-enlace Estocástico (Ec. 3.8)</b>					
SE	0,78	89,01	87,5	87,5	9,80
SP	0,65	84,38	80,0	72,73	13,64

El procedimiento de VC se llevó a cabo dejando el 10 % de los compuestos fuera, correspondiendo este 10 % a 9 compuestos que se retiraron cada vez (Wold y Eriksson, 1995; Rose y col., 2002). Este procedimiento fue repetido 10 veces utilizando para ello 10 subconjuntos diferentes. Los resultados estadísticos de este experimento son mostrados en la Tabla 3.22. La media global de la clasificación correcta en la SE(SP) para este proceso y con las ecuaciones 3.7 y 3.8 fue de 87,69 % (85,64 %) y 89,03 % (87,86 %), respectivamente.

**Tabla 3.22** Resultados de la validación cruzada dejando el 10 % de los productos fuera de la SE.

Grupo	%Clasif <sup>a</sup>	$\lambda$	D <sup>2</sup>	F	%Clasif <sup>b</sup>	%Clasif <sup>a</sup>	$\lambda$	D <sup>2</sup>	F	%Clasif <sup>b</sup>	
Ec. 3.7 (Índice Cuadrático basado en enlaces no est.)						Ec. 3.8 (Índice Cuadrático basado en enlace est.)					
1	90,12	0,42	5,52	17,24	80,00	90,12	0,34	7,72	29,32	80,00	
2	87,80	0,43	5,15	16,24	88,89	89,02	0,37	6,89	26,44	77,78	
3	85,37	0,47	4,54	14,33	100,00	87,80	0,38	6,49	24,92	100,00	
4	86,59	0,47	4,43	13,98	100,00	87,80	0,39	6,16	23,63	100,00	
5	87,80	0,44	5,03	15,88	77,78	89,02	0,37	6,71	25,74	88,89	
6	87,80	0,41	5,74	18,11	88,89	90,24	0,35	7,37	28,28	77,78	
7	86,59	0,42	5,47	17,27	77,78	90,24	0,36	7,12	27,33	77,78	
8	89,02	0,44	5,09	16,07	77,78	89,02	0,36	6,96	26,72	100,00	
9	89,02	0,43	5,32	16,79	77,78	89,02	0,36	7,17	27,50	88,89	
10	86,75	0,44	5,06	16,23	87,50	87,95	0,37	6,75	26,33	87,50	
Media	87,69	0,44	5,14	16,21	85,64	89,03	0,36	6,93	26,62	87,86	
SD	1,42	0,02	0,41	1,28	8,92	0,96	0,02	0,44	1,64	9,49	

a,b Buena clasificación global para ambos modelos en SE (90 % de la *data*) y SP (10 % de la *data*), respectivamente

Ec. = Ecuación

Est. = Estocástica.

Clasif = Clasificación

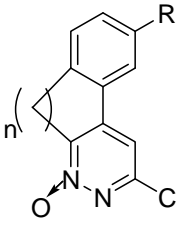
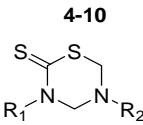
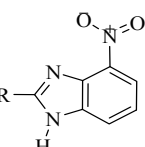
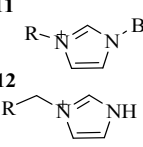
### 3.1.5.2 Corroboración del poder predictivo de los modelos utilizando una segunda SP externa

La Tabla 3.23 muestra los resultados de la evaluación virtual de una SP externa conformada por 12 compuestos cuya actividad *in vitro* frente a *T. vaginalis* ha sido demostrada (Alcalde y col., 1995; Ochoa y col., 1999; Gavini y col., 2000).

**Tabla 3.23** Identificación de compuestos citados en la literatura como tricomonocidas usando modelos QSAR basados en ADL en ensayos de simulación virtual.

	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
<b>4</b>	furfuril	(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> -COOH
<b>5</b>	furfuril	CH <sub>2</sub> -COOH
<b>6</b>	furfuril	CH(CH <sub>2</sub> Ph)-COOH
<b>7</b>	furfuril	CH <sub>2</sub> -CONH-CH <sub>2</sub> -COOH
<b>8</b>	furfuril	CH(CH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub> )-COOH
<b>9</b>	furfuril	CH[CH <sub>2</sub> -CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ]-COOH
<b>10</b>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> -COOH	(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> -COOH

 <p><b>1:</b> n = CH<sub>2</sub> R = H</p> <p><b>2:</b> n = CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub> R = H</p> <p><b>3:</b> n = CH<sub>2</sub>=CH<sub>2</sub> R = NH<sub>2</sub></p>	<p><b>4-10</b></p>   <p><b>11</b></p>  <p><b>12</b></p>
--	---

Comp. <sup>a</sup>	Ref. <sup>b</sup>	ΔP% <sup>c</sup>	ΔP% <sup>d</sup>	Actividad antitricomona
<b>1</b>		-14,70	-36,09	inactivo
<b>2</b>	Gavini y col., 2000	-18,99	-42,54	inactivo
<b>3</b>		-22,78	-24,75	inactivo
<b>4</b>		66,49	<b>-28,97</b>	100 μg/ml = 100 <sup>e</sup> 10 μg/ml = (100) <sup>f</sup> 1 μg/ml = (100) <sup>f</sup>
<b>5</b>		76,66	42,66	100 μg/ml = 100 <sup>e</sup> 10 μg/ml = (100) <sup>f</sup> 1 μg/ml = (97) <sup>f</sup>
<b>6</b>		86,39	79,25	100 μg/ml = 100 <sup>e</sup> 10 μg/ml = (18) <sup>f</sup> 1 μg/ml = (12) <sup>f</sup>
<b>7</b>	Ochoa y col., 1999	91,03	60,63	100 μg/ml = 100 <sup>e</sup> 10 μg/ml = (100) <sup>f</sup> 1 μg/ml = (73) <sup>f</sup>
<b>8</b>		87,67	83,14	100 μg/ml = 100 <sup>e</sup> 10 μg/ml = (100) <sup>f</sup> 1 μg/ml = (93) <sup>f</sup>
<b>9</b>		68,30	72,92	100 μg/ml = 100 <sup>e</sup> 10 μg/ml = (33) <sup>f</sup> 1 μg/ml = (94) <sup>f</sup>
<b>10</b>		<b>-5,25</b>	<b>-97,46</b>	100 μg/ml = 100 <sup>e</sup> 10 μg/ml = (25) <sup>f</sup> 1 μg/ml = (65) <sup>f</sup>
<b>11</b>		<b>90,34</b>	<b>83,38</b>	Inactivo
<b>12</b>	Alcalde y col., 1995	83,68	73,30	MCL <sup>g</sup> = 50 μg/ml LD <sub>50</sub> <sup>h</sup> = 50 μg/ml

<sup>a</sup>Las estructuras moleculares de los compuestos están representadas en la parte superior de la tabla. <sup>b</sup> Referencias bibliográficas de donde fueron tomados los resultados de la actividad *in vitro*. <sup>c,d</sup> Predicción de la actividad tricomonocida por las Ec. 3.7 y 3.8; ΔP% = [P(Activo) - P(Inactivo)]x100. <sup>e</sup>Porcentaje de reducción de *T. vaginalis* o actividad citocida a las 24 h. <sup>f</sup>Porcentaje de inhibición de crecimiento de *T. vaginalis* a las 24 h. MCL<sup>g</sup>: Mínima concentración letal usada que mata a los parásitos a las 24 horas. LD<sub>50</sub><sup>h</sup>: Mínima concentración usada que reduce los parásitos al 50 %

### 3.1.6 Resultados de los modelos de predicción usando índices lineales no estocásticos y estocásticos basados en relaciones de enlaces

#### 3.1.6.1 Desarrollo y validación de la función discriminante

A partir de los descriptores obtenidos mediante el software *TOMOCOMD-CARDD* fueron calculados y empleados como variables independientes los *k*-ésimo (*k* = 15) índice

lineales generados sobre la base de relaciones entre enlaces [totales y locales (heteroátomos: S, N, O; hidrógeno unido a heteroátomos: S, N, O; halógenos: F, Cl, I y Br)] no considerando y considerando átomos de hidrógenos (H) en el pseudo-grafo molecular (G) [Totales:  $f_k(\bar{w})$   $f_k^H(\bar{w})$ ; Locales:  $f_{kL}(\bar{w})$  y  $f_{kL}^H(\bar{w})$ ]. se obtuvieron los modelos de predicción que se muestran a continuación:

$$\text{Clasif} = -5,53 - 2,96 \times 10^{-5} f_{6L}^H(\bar{w}_E) - 0,07 f_{0L}^H(\bar{w}_E) - 0,05 f_{0L}^M(\bar{w}_E) - 5,29 \times 10^{-4} f_{7L}^P(\bar{w}_E) + 4,73 \times 10^{-5} f_{7L}^V(\bar{w}_E) + 0,36 f_{0L}^E(\bar{w}_E) \quad (3.9)$$

$$N = 91 \quad \lambda = 0,46 \quad D^2 = 4,54 \quad F(6,84) = 15,99 \quad p < 0,0000$$

$$\text{Clasif} = -4,93 - 0,12 f_{9L}^{Ms}(\bar{w}_E) + 0,10 f_{0L}^{Vs}(\bar{w}_E) + 1,20 f_{2L}^{Es}(\bar{w}_E) - 0,77 f_{5L}^{Es}(\bar{w}_E) \quad (3.10)$$

$$N = 91 \quad \lambda = 0,48 \quad D^2 = 4,28 \quad F(6,84) = 123,18 \quad p < 0,0000$$

donde N es el número de compuestos,  $\lambda$  es el estadístico Wilkis,  $D^2$  es la distancia cuadrada de Mahalanobis, F es la razón de Fisher y p es el nivel de significación.

En las Tablas 3.25 y 3.26 se pueden observar los valores del  $\Delta P\%$  obtenidos mediante las ecuaciones 3.9 y 3.10, mientras que en la Tabla 3.27 aparecen reflejados los parámetros estadísticos [exactitud, sensibilidad, especificidad, razón de falsos positivos y el coeficiente de correlación de Matthews (C)] para ambos modelos (Baldi y col., 2000).

**Tabla 3.25** Nombre y clasificación de los compuestos activos en la SE y SP según los modelos desarrollados para índices lineales basado en relaciones de enlace (3.9 y 3.10).

Nombre	$\Delta P\%^a$	$\Delta P\%^b$	Nombre	$\Delta P\%^a$	$\Delta P\%^b$
SE Activos					
Anisomicina	-90,67	-68,54	Abunidazol	73,86	83,90
Virustamicina A	98,26	99,72	Imoctetrazolina	63,30	93,47
Azanidazol	96,39	94,97	Forminitrazol	80,64	45,86
Carnidazol	93,99	90,28	Clomizol	85,64	84,98
Propenidazol	98,57	94,48	Acinitrazol	80,64	71,72
Lauroguadina	-43,58	58,70	Moxnidazol	99,81	97,26
Mepartricina A	82,28	91,89	Isometronidazol	45,23	46,05
Metronidazol	50,39	42,97	Fosfato de Metronidazol	73,62	67,93
Nifuratel	98,23	96,99	Benzoilmetronidazol	93,98	92,71
Nifuroxima	66,68	60,69	Bamnidazol	94,34	82,87
Nimorazol	51,98	-20,24	Glicarsiamidona	-51,91	-50,87
Secnidazol	46,88	46,04	Fexinidazol	95,09	82,59
Cariolin	50,23	-20,26	Piperanitrozol	79,08	87,64
2-Amino-5-nitrotiazol	30,56	-42,27	Gynotabs	68,15	81,93
Glicobiarzol	58,90	35,45	Pirinidazol	93,22	93,15
Clioquinol	38,35	-21,20	Metronidazol hidrógeno succinato	98,18	90,43

Diiodohydroxyquinoline	60,86	<b>-73,55</b>	Tolamizol	81,98	90,04
Ornidazol	88,14	85,11	Tiacetarsamida	32,50	2,59
Trichomonacid	77,09	68,11	Tivanidazol	98,42	99,58
Lutenurina	<b>-86,14</b>	71,53	Policresulen	<b>-50,52</b>	31,32
SP Activos					
Acetarsona	<b>-28,77</b>	<b>-22,46</b>	Pentamicina	<b>-97,52</b>	<b>-66,85</b>
Furazolidona	98,27	96,87	Azomicina	12,44	11,91
Mepartricina B	76,62	92,54	Ternidazol	50,88	53,30
Aminitrozol	80,64	71,72	Misonidazol	61,56	29,13
Clotrimazol	14,60	39,75	Satranidazol	97,86	97,50

<sup>a,b</sup>Predicción de la actividad tricomonida, Ec. 3.9 y 3.10, respectivamente:  $\Delta P\% = [P(\text{Active}) - P(\text{Inactive})] \times 100$ .

**Tabla 3.26** Nombre y clasificación de los compuestos inactivos en la SE y SP según los modelos desarrollados para índices lineales basado en relaciones de enlace (3.9 y 3.10).

Nombre	$\Delta P\%a$	$\Delta P\%c$	Nombre	$\Delta P\%a$	$\Delta P\%c$
SE Inactivos					
Amantadina	-99,63	-96,58	Nonaperona	-89,35	-91,95
Tiacetazona	-42,85	-50,91	Rolipram	-69,90	-74,67
Cloral betaina	-96,14	-98,86	<i>N</i> -Hidroximetil- <i>N</i> -metiltiourea	-95,44	-96,97
Carbavina	-80,39	-82,77	Ácido clorobenzóico	-71,36	-6,54
Norantoína	-70,13	-36,88	Acetanilo	-95,13	-91,81
Orotonsan Fe	-3,32	<b>51,99</b>	Guanazol	-99,82	-98,67
Picosulfato	<b>78,57</b>	<b>0,89</b>	Tetramina	-99,37	-99,09
Naftazona	-59,18	-35,79	Mecisteina	-97,80	-98,27
Besunida	-65,47	<b>22,10</b>	Cirazolina	-90,59	-91,89
Acetazolamida	-48,00	-45,29	Metocarbamol	-10,45	-83,39
Propamina	-99,72	-99,19	Lisergida	-89,11	-73,32
RMI 11894	-98,27	-94,42	Dopamina	-98,24	-81,00
Ag 307	-52,03	-78,33	Bufeniodo	-19,12	-18,70
Ioduro de barbismetilo	-10,56	-98,62	Celiprolol	-21,41	-41,31
Bromuro de pancuronio	-83,53	-97,69	Erisimina	<b>12,24</b>	<b>39,02</b>
Éter vinílico	-94,55	-98,59	Peruvósido	<b>8,24</b>	-7,89
Basedol	-48,72	<b>11,14</b>	Amitraz	-67,45	-74,39
Carbimazol	<b>46,85</b>	<b>55,40</b>	Proclonol	-42,09	<b>59,74</b>
Levulinato de didimio	-91,58	-95,22	Asame	-90,29	-95,41
Percloroetano	-96,30	-82,82	KC-8973	-82,47	-81,26
Pirantel	-80,54	-82,55	Etidina	<b>64,58</b>	<b>36,30</b>
Remifentanilo	-93,52	-94,42	Metioglicato magnésico	-46,45	-97,37
Petidina	-87,83	-91,89	Alibendol	-71,94	-37,14
Tartrato de tenalidina	-99,78	-98,92	Bromuro de diponio	-96,50	-97,93
Bamipina	-98,72	-98,82	Estreptomina	-90,64	<b>69,92</b>
Colestipol	-99,71	-99,76			
SP Inactivos					
Citenazona	-19,35	-28,82	Neguvón	-99,97	-95,87
Metenamina	-99,66	-99,43	Ciclopramina	-97,18	-87,45
Penticloral	-90,52	<b>25,87</b>	Litracen	-99,31	-98,95
Calcium Sodium ferriclat	-100,00	-100,00	Hidróxido de trimetilsulfonio	-99,48	-99,97
Ferromaltose	-99,06	-95,58	Norgamem	-98,23	-94,55
Arecolina	-89,49	-94,53	Zoxazolamina	<b>5,07</b>	<b>21,19</b>

Batilol	-98,18	-99,67	Acetilcolina	-96,79	-99,97
Broncolina	-99,70	-99,91	Carazolol	-94,86	-86,37
Imekhina	-57,67	-99,43	Pinaverium	-14,78	-82,60
Frigen 113	<b>68,54</b>	-31,90	Penicilina	-91,40	<b>42,04</b>
Difenadiona	-85,12	-85,68	Aziromicina	-90,04	-82,75

<sup>a,c</sup>Predicción de la actividad tricomonocida Ec. 3.9 y 3.10, respectivamente:  $\Delta P\% = [P(\text{Active}) - P(\text{Inactive})] \times 100$ .

**Tabla 3.27** Parámetros Estadísticos calculados para los modelos 3.9 y 3.10.

	<b>Coefficiente Correlación Matthews (C)</b>	<b>Exactitud 'Q<sub>Total</sub>' (%)</b>	<b>Sensibilidad 'hit rate' (%)</b>	<b>Especificidad (%)</b>	<b>Falsos Positivos 'false alarm rate' (%)</b>
<b>Índice Lineal tipo-enlace No-estocástico (Ec. 3.9)</b>					
SE	0,78	89,01	87,50	87,50	9,80
SP	0,71	87,50	80,00	80,00	9,09
<b>Índice Lineal tipo-enlace Estocástico (Ec. 3.10)</b>					
SE	0,65	82,41	82,50	78,57	17,65
SP	0,65	84,38	80,00	72,73	13,64

Con la finalidad de evaluar la robustez de los modelos, fue diseñado un experimento de VC suprimiendo el 10 % de los compuestos (Leave-10-fold full-out, según sus siglas en inglés), y obteniendo nuevos modelos sin considerar la serie sustraída (Wold y Eriksson, 1995; Rose y col., 2002). Los resultados de dicho proceso de validación son mostrados en la Tabla 3.28.

**Tabla 3.28** Resultados de la validación cruzada dejando el 10 % de los casos fuera de la SE.

Grupo	%Clasif <sup>a</sup>	$\lambda$	D <sup>2</sup>	F	%Clasif <sup>b</sup>	%Clasif <sup>a</sup>	$\lambda$	D <sup>2</sup>	F	%Clasif <sup>b</sup>	
Ec. 3.9 (Índice Lineal basado en enlaces no est.)						Ec. 3.10 (Índice Lineal basado en enlace est.)					
1	88,89	0,45	4,92	15,35	80,00	85,19	0,46	4,73	22,74	70,00	
2	89,02	0,48	4,38	13,81	77,78	82,93	0,49	4,19	20,34	77,78	
3	87,80	0,49	4,16	13,14	100,00	82,93	0,49	4,18	20,30	77,78	
4	87,80	0,48	4,35	13,73	88,89	80,49	0,49	4,10	19,94	88,89	
5	87,80	0,49	4,16	13,14	100,00	81,71	0,50	4,03	19,56	77,78	
6	89,02	0,46	4,68	14,77	88,89	81,71	0,47	4,39	21,34	77,78	
7	90,24	0,43	5,20	16,39	88,89	81,71	0,49	4,16	20,20	77,78	
8	90,24	0,44	5,13	16,19	77,78	80,49	0,48	4,25	20,66	88,89	
9	89,02	0,46	4,59	14,47	88,89	82,93	0,48	4,22	20,52	77,78	
10	89,16	0,46	4,65	14,93	87,50	81,93	0,46	4,63	22,86	87,50	
Media	88,90	0,46	4,62	14,59	87,86	82,20	0,48	4,29	20,85	80,19	
SD	0,90	0,02	0,37	1,16	7,92	1,38	0,01	0,23	1,13	6,18	

a,b Buena clasificación global para ambos modelos en SE (90 % de la data) y SP (10 % de la data), respectivamente  
 Ec. = Ecuación  
 Est. = Estocástica.  
 Clasif = Clasificación

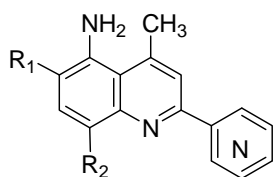
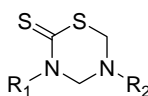
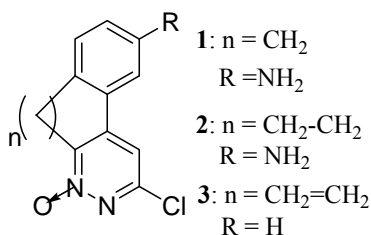


### 3.1.6.2 Corroboración del poder predictivo de los modelos utilizando una segunda SP externa

El poder predictivo de los modelos de clasificación **3.9** y **3.10** fue valorado utilizando 12 compuestos tricomonocidas seleccionados al azar de la literatura químico-médica. (Tabla 3.29). (Ochoa y col., 1999; Gavini y col., 2000; Kouznetsov y col., 2004b).

**Tabla 3.29** Identificación de compuestos citados en la literatura como tricomonocidas usando modelos QSAR basados en ADL en ensayos de simulación virtual.

	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
<b>4</b>	furfuril	CH(CH <sub>2</sub> COOH)-COOH
<b>5</b>	furfuril	CH(CH <sub>3</sub> )-COOH
<b>6</b>	furfuril	CH[(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> SCH <sub>3</sub> ]-COOH
<b>7</b>	furfuril	CH[(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ]-COOH
<b>8</b>	ciclohexil	CH <sub>2</sub> -COOH
<b>9</b>	ciclohexil	CH <sub>2</sub> -CONH-CH <sub>2</sub> -COOH



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	N Posición
<b>10</b>	CH <sub>3</sub>	H	β
<b>11</b>	CH <sub>3</sub>	H	γ
<b>12</b>	H	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	β

Comp. <sup>a</sup>	Ref. <sup>b</sup>	ΔP% <sup>c</sup>	ΔP% <sup>d</sup>	Actividad antitricomona	
<b>1</b>	Gavini y col., 2000	-22,12	<b>72,87</b>	inactivo	
<b>2</b>		-23,35	<b>76,98</b>	inactivo	
<b>3</b>		-21,91	<b>41,24</b>	inactivo	
<b>4</b>	Ochoa y col., 1999	79,96	98,60	100 μg/ml = 100 <sup>c</sup> 10 μg/ml = (100) <sup>f</sup> 1 μg/ml = (100) <sup>f</sup>	
<b>5</b>		47,53	94,28	100 μg/ml = 100 <sup>c</sup> 10 μg/ml = (100) <sup>f</sup> 1 μg/ml = (77) <sup>f</sup>	
<b>6</b>		56,49	96,15	100 μg/ml = 100 <sup>c</sup> 10 μg/ml = (100) <sup>f</sup> 1 μg/ml = (73) <sup>f</sup>	
<b>7</b>		84,64	96,83	100 μg/ml = 100 <sup>c</sup> 10 μg/ml = (13) <sup>f</sup> 1 μg/ml = (66) <sup>f</sup>	
<b>8</b>		-90,77	3,29	100 μg/ml = 100 <sup>c</sup> 10 μg/ml = (67) <sup>f</sup> 1 μg/ml = (93) <sup>f</sup>	
<b>9</b>		-79,79	78,68	100 μg/ml = 100 <sup>c</sup> 10 μg/ml = (74) <sup>f</sup> 1 μg/ml = (94) <sup>f</sup>	
<b>10</b>		Kouznetsov y col., 2004b	-78,68	-25,29	100 μg/ml = 58,3 <sup>f</sup> 10 μg/ml = 29,1 <sup>f</sup> 1 μg/ml = 18,1 <sup>f</sup>

11	-78,87	-35,17	100 µg/ml = 66,7 <sup>f</sup> 10 µg/ml = 33,9 <sup>f</sup> 1 µg/ml = 25,2 <sup>f</sup>
12	-77,55	-25,34	100 µg/ml = 65,4 <sup>f</sup> 10 µg/ml = 56,7 <sup>f</sup> 1 µg/ml = 40,1 <sup>f</sup>

<sup>a</sup>Las estructuras moleculares de los compuestos están respresentadas en la parte superior de la tabla. <sup>b</sup> Referencias bibliográficas de donde fueron tomados los resultados de la actividad *in vitro*. <sup>c</sup> <sup>d</sup>Predicción de la actividad tricomonocida por las Ec. 3.9 y 3.10;  $\Delta P\% = [P(\text{Activo}) - P(\text{Inactivo})] \times 100$ . <sup>e</sup>Porcentaje de reducción de *T. vaginalis* o actividad citocida a las 24 h. <sup>f</sup>Porcentaje de inhibición de crecimiento de *T. vaginalis* a las 24 h.

### 3.1.7 Resultados de los modelos de predicción usando índices bilineales no estocásticos y estocásticos basados en relaciones de enlaces

#### 3.1.7.1 Desarrollo y validación de la función discriminante

Con la finalidad de obtener nuevos modelos discriminantes siguiendo al estrategia predictiva del sistema *TOMOCOMD-CARDD* fueron calculados y empleados como variables independientes los *k*-ésimo ( $k = 15$ ) índice bilineales generados sobre la base de relaciones entre enlaces [totales (y locales (heteroátomos: S, N, O; hidrógeno unido a heteroátomos: S, N, O; halógenos: F, Cl, I y Br)] no considerando y considerando átomos de hidrógenos (H) en el pseudo-grafo molecular (G) [Totales:  $\mathbf{b}_k(\bar{w}, \bar{u})$   $\mathbf{b}_k^H(\bar{w}, \bar{u})$ ; Locales:  $\mathbf{b}_{kL}(\bar{w}, \bar{u})$  y  $\mathbf{b}_{kL}^H(\bar{w}, \bar{u})$ ]. Las combinaciones de las propiedades atómicas calculadas fueron las siguientes: M-P; M-V; M-E; P-V; P-E y V-E. Los modelos matemáticos obtenidos para la clasificación de compuestos como activos o inactivos, así como sus parámetros estadísticos respectivos son mostrados a continuación.

$$\begin{aligned} \text{Clasif} = & -3,32 - 0,02^{\text{MP}} \mathbf{b}_1^H(\bar{w}, \bar{u}) + 0,06^{\text{ME}} \mathbf{b}_0^H(\bar{w}, \bar{u}) + 0,12^{\text{ME}} \mathbf{b}_{1L}^H(\bar{w}_{hal}, \bar{u}_{hal}) \\ & - 0,12^{\text{ME}} \mathbf{b}_{1L}(\bar{w}_{hal}, \bar{u}_{hal}) - 1,40 \times 10^{-3} \text{MV} \mathbf{b}_0(\bar{w}, \bar{u}) - 7,59 \times 10^{-4} \text{MV} \mathbf{b}_{0L}^H(\bar{w}_E, \bar{u}_E) \end{aligned} \quad (3.11)$$

$$N = 91 \quad \lambda = 0,46 \quad D^2 = 4,51 \quad F(6,84) = 15,90 \quad p < 0,0000$$

$$\begin{aligned} \text{Clasif} = & -5,27 + 0,23^{\text{MP}} \mathbf{b}_{2L}^H(\bar{w}_E, \bar{u}_E) - 0,59^{\text{MP}} \mathbf{b}_{3L}^H(\bar{w}_E, \bar{u}_E) + 0,13^{\text{ME}} \mathbf{b}_{1L}^H(\bar{w}_E, \bar{u}_E) \\ & - 0,21^{\text{VP}} \mathbf{b}_{1L}^H(\bar{w}_E, \bar{u}_E) + 0,43^{\text{VP}} \mathbf{b}_{4L}^H(\bar{w}_E, \bar{u}_E) - 0,02^{\text{VE}} \mathbf{b}_{3L}(\bar{w}_E, \bar{u}_E) \end{aligned} \quad (3.12)$$

$$N = 91 \quad \lambda = 0,46 \quad D^2 = 4,51 \quad F(6,84) = 15,90 \quad p < 0,0000$$

Los resultados de la clasificación de los compuestos como activos o inactivos utilizando los modelos 3.11 y 3.12 pueden observarse en las Tabla 3.31 y 3.32. La ecuación 3.11 clasifica bien al 90,00 % y 90,20 % de los compuestos activos e inactivos, respectivamente, incluidos en la SE, para un PBC global de 90,11 % (Tabla 3.33). Por su parte en la SP es clasificado adecuadamente el 90,00 % y el 95,45 % de los compuestos activos e inactivos, correspondientemente (Tabla 3.31 y 3.32), para un PBC de 93,75 % (Tabla 3.33). La

sensibilidad y especificidad en ambos casos estuvo alrededor del 90 %, siendo la FAR de 9,8 % y 4,55 % para la SP y SE, respectivamente.

La ecuación **3.12** clasifica correctamente el 85 % de los casos activos y el 88,24 % de los compuestos inactivos incluidos en la SE (Tabla 3.31 y 3.32) para un PBC global de 86,81 %. En la SP un 80.0 % de los compuestos activos es correctamente clasificado, mientras que el 90,91 % de los compuestos inactivos es identificado como tal por el modelo, para un PBC de 87,5 %. En ambos casos la sensibilidad y especificidad tomo valores entre el 80 % y 85 %, siendo la FAR de 11,76 % y 9,09 % para la SE y SP, correspondientemente (Tabla 3.33).

El *C* para ambas ecuaciones se comportó entre el 70 % y el 85 %, siendo superior los valores encontrados para la ecuación **3.11**.

**Tabla 3.31** Nombre y clasificación de los compuestos activos en la SE y SP según los dos modelos *TOMOCOMD-CARDD* desarrollados para índices bilineales basados en relaciones de enlace.

Nombre	$\Delta P\%^a$	$\Delta P\%^b$	Nombre	$\Delta P\%^a$	$\Delta P\%^b$
SE Activos					
Anisomicina	26,59	<b>-53,48</b>	Abunidazol	53,14	91,70
Virustamicina A	79,95	85,07	Imoctetrazolina	5,95	95,76
Azanidazol	86,29	98,61	Forminitrazol	87,40	98,28
Carnidazol	91,60	98,03	Clomizol	99,14	98,68
Propenidazol	95,55	97,07	Acinitrazol	79,51	91,81
Lauroguadina	<b>-89,10</b>	<b>-59,23</b>	Moxnidazol	99,53	99,94
Mepartricina A	99,88	82,34	Isometronidazol	73,75	73,22
Metronidazol	73,75	70,96	Fosfato de Metronidazol	93,26	87,87
Nifuratel	99,08	99,11	Benzoilmetronidazol	96,19	97,64
Nifuroxima	96,75	88,05	Bamnidazol	94,52	96,20
Nimorazol	92,36	69,70	Glicarsiamidona	10,63	-49,70
Secnidazol	63,12	57,21	Fexinidazol	88,90	79,94
Cariolin	<b>-84,67</b>	<b>-74,51</b>	Piperanitrozol	78,40	92,84
2-Amino-5-nitrotiazol	58,06	87,06	Gynotabs	85,30	91,91
Glicobiarzol	78,61	88,86	Pirinidazol	82,21	89,66
Clioquinol	98,19	99,77	Metronidazol hidrógeno succinato	98,36	98,00
Diiodohydroxyquinoline	98,97	<b>-7,55</b>	Tolamizol	92,73	98,75
Ornidazol	93,39	97,04	Tiacetarsamida	61,21	40,58
Trichomonacid	76,92	69,38	Tivanidazol	61,30	91,23
Lutenurina	<b>-82,33</b>	<b>-18,98</b>	Policresulen	<b>-3,11</b>	2,87
SP Activos					
Acetarsona	<b>-5,17</b>	<b>-51,04</b>	Pentamicina	34,82	<b>-97,40</b>
Furazolidona	99,32	99,79	Azomicina	76,38	84,49
Mepartricina B	99,89	81,27	Ternidazol	70,49	60,77
Aminitrozol	79,51	91,81	Misonidazol	93,39	40,50
Clotrimazol	57,41	79,31	Satranidazol	93,53	99,73

<sup>a,b</sup>Predicción de la actividad tricomónica, Ec. **3.11** y **3.12**, respectivamente:  $\Delta P\% = [P(\text{Activo}) - P(\text{Inactivo})] \times 100$ .

**Tabla 3.32** Nombre y clasificación de los compuestos activos en la SE y SP según los dos modelos *TOMOCOMD-CARDD* desarrollados para índices bilineales basados en relaciones de enlace.

Nombre	$\Delta P\%^a$	$\Delta P\%^b$	Nombre	$\Delta P\%^a$	$\Delta P\%^b$
SE Inactivos					
Amantadina	-98,65	-99,24	Nonaperona	-96,29	-97,89
Tiacetazona	-44,75	-77,21	Rolipram	-34,28	-88,14
Cloral betaina	-97,98	-57,59	<i>N</i> -Hidroximetil- <i>N</i> -metiltiourea	-81,24	-95,81
Carbavina	-76,93	-87,94	Ácido clorobenzóico	-72,40	<b>20,30</b>
Norantoína	-54,69	-45,89	Acetanilo	-80,34	-97,77
Orotonsan Fe	<b>16,86</b>	<b>59,14</b>	Guanazol	-89,20	-98,14
Picosulfato	<b>94,95</b>	<b>98,22</b>	Tetramina	-88,62	-99,02
Naftazona	-27,25	-81,34	Mecisteina	-80,69	-78,02
Besunida	-40,57	-43,37	Cirazolina	-70,42	-95,18
Acetazolamida	-48,56	-63,82	Metocarbamol	<b>71,79</b>	-69,69
Propamina	-98,21	-98,66	Lisergida	-93,54	-87,22
RMI 11894	-98,43	-98,70	Dopamina	-84,53	-95,62
Ag 307	-89,68	-95,44	Bufeniodo	-96,62	-81,71
Ioduro de barbismetilo	-97,55	-99,65	Celiprolol	-76,08	-89,83
Bromuro de pancuronio	-99,03	-91,10	Erisimina	-8,80	-45,76
Éter vinílico	-65,45	-98,54	Peruvósido	<b>29,47</b>	-31,38
Basedol	-76,80	-17,97	Amitraz	-93,60	-88,41
Carbimazol	-30,82	<b>79,35</b>	Proclonol	-94,12	<b>75,78</b>
Levulinato de didimio	-68,02	-97,84	Asame	-2,16	-81,28
Percloroetano	-93,48	-96,62	KC-8973	-90,51	-97,10
Pirantel	-89,36	-98,33	Etidina	-14,30	-47,57
Remifentanilo	-78,10	-95,12	Metioglicato magnésico	-49,18	-97,39
Petidina	-79,63	-96,06	Alibendol	-14,35	-87,68
Tartrato de tenalidina	-98,56	-99,78	Bromuro de diponio	-98,01	-97,89
Bamipina	-91,02	-98,23	Estreptomina	<b>97,81</b>	<b>84,39</b>
Colestipol	-95,93	-99,71			
SP Inactivos					
Citenazona	-66,17	-46,26	Neguvón	-95,86	-71,35
Metenamina	-83,90	-91,56	Ciclopramina	-94,07	-93,12
Penticloral	-85,49	-90,23	Litracen	-97,74	-99,54
Ferriclato doble de sodio y calcio	-100	-100	Hidróxido de trimetilsulfonio	-98,96	-100
Ferroceron	-99,89	-99,88	Norgamem	-73,04	-97,19
Emodina	-19,31	-84,72	Emylcamate	-91,46	-92,70
Butanol	-94,79	-99,47	Acetilcolina	-87,52	-99,87
Espironolactona	-95,73	-96,12	Carazolol	-71,90	-93,16
Broncolina	-99,38	-99,16	Cefazolina	<b>69,40</b>	<b>99,47</b>
Imekhina	-99,71	-99,16	Penicilina	-82,42	<b>19,66</b>
Difenadiona	-17,79	-96,11	Aziromicina	-76,72	-91,26

<sup>a,c</sup>Predicción de la actividad tricomonocida, Ec. 3.11 y 3.12, respectivamente:  $\Delta P\% = [P(\text{Activo}) - P(\text{Inactivo})] \times 100$ .

**Tabla 3.33** Resultados de la predicción de dos modelos QSAR basados en ADL de las SE y SP.

	Coefficiente Correlación Matthews (C)	Exactitud 'Q <sub>Total</sub> ' (%)	Sensibilidad 'hit rate' (%)	Especificidad (%)	Falsos Positivos 'false alarm rate' (%)
<b>Índice Bilineal tipo-enlace No-estocástico (Ec. 3.11)</b>					
SE	0,80	90,11	90,00	87,80	9,80
SP	0,85	93,75	90,00	90,00	4,55
<b>Índice Bilineal tipo-enlace Estocástico (Ec. 3.12)</b>					
SE	0,73	86,81	85,00	85,00	11,76
SP	0,71	87,50	80,00	80,00	9,09

Como ejercicio de prueba de robustez, un proceso de validación cruzada fue desarrollado para ambos modelos retirando cada vez el 10 % de los compuestos (Leave-10-*fold* full-out, según sus siglas en inglés (Wold y Eriksson, 1995; Rose y col., 2002). Los resultados de la VC de los modelos 3.11 y 3.12 son mostrados en la Tabla 3.34. La media global de la clasificación correcta en la SE(SP) usando estos modelos fue de 89,63 % (86,89 %) y 87,07 % (84,39 %), respectivamente.

**Tabla 3.34** Resultados de la validación cruzada dejando el 10 % de los casos fuera de la SE.

Grupo	%Clasif <sup>a</sup>	$\lambda$	D <sup>2</sup>	F	%Clasif <sup>b</sup>	%Clasif <sup>a</sup>	$\lambda$	D <sup>2</sup>	F	%Clasif <sup>b</sup>
Ec. 3.11 (Índice Bilineal basado en enlaces no est.)						Ec. 3.12 (Índice Bilineal basado en enlace est.)				
1	88,89	0,44	5,04	15,73	80,00	87,65	0,40	6,04	18,85	80,00
2	91,46	0,45	4,86	15,33	77,78	86,59	0,42	5,43	17,12	88,89
3	89,02	0,49	4,10	12,94	88,89	86,59	0,44	4,97	15,69	88,89
4	89,02	0,46	4,64	14,65	88,89	89,02	0,40	5,92	18,68	77,78
5	90,24	0,49	4,12	13,01	88,89	86,59	0,44	5,08	16,03	100
6	90,24	0,47	4,41	13,90	77,78	86,59	0,42	5,40	17,04	77,78
7	89,02	0,45	4,81	15,17	88,89	86,59	0,39	6,26	19,74	88,89
8	89,02	0,44	4,98	15,71	88,89	87,80	0,41	5,65	17,83	77,78
9	89,02	0,47	4,40	13,89	88,89	86,59	0,43	5,15	16,24	88,89
10	90,36	0,48	4,28	13,73	100	86,75	0,41	5,79	18,56	75,00
Media	89,63	0,47	4,56	14,41	86,89	87,07	0,42	5,57	17,58	84,39
SD	0,88	0,02	0,35	1,06	6,74	0,83	0,02	0,43	1,37	7,91

a,b Buena clasificación global para ambos modelos en SE (90 % de la *data*) y SP (10 % de la *data*), respectivamente

Ec. = Ecuación

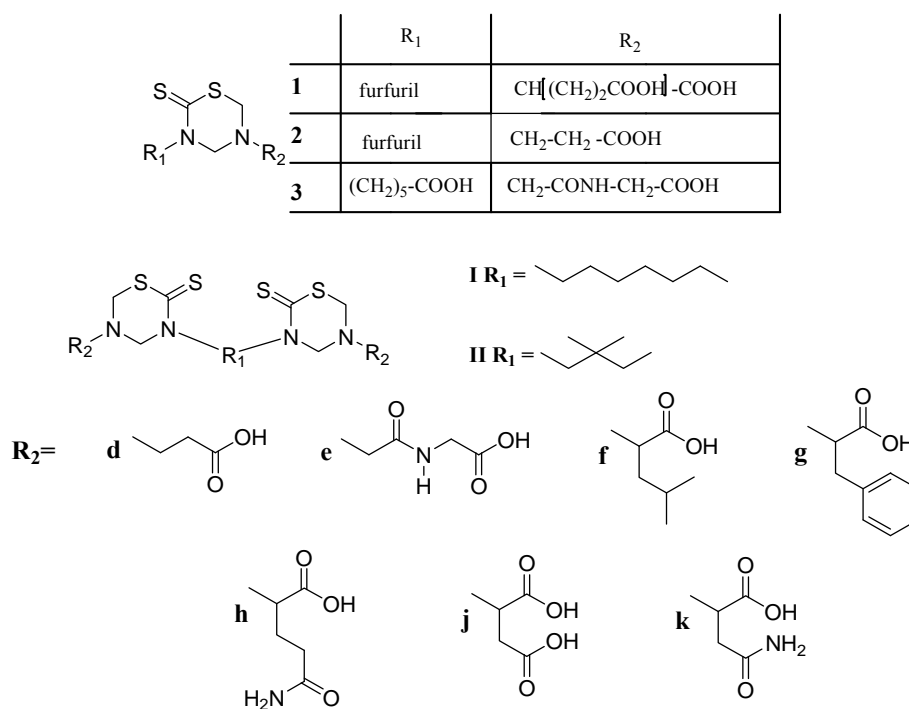
Est. = Estocástica.

Clasif = Clasificación

### 3.1.7.2 Corroboración del poder predictivo de los modelos utilizando una segunda SP externa

Una serie de 12 compuestos cuya actividad tricomocida aparece citada en la literatura (Ochoa y col., 1999; Coro y col., 2005) fue evaluada *in silico* mediante los modelos 3.11 y 3.12. Los resultados de predicción computacional pueden ser observados en la Tabla 3.35.

**Tabla 3.35** Identificación de compuestos citados en la literatura como tricomonocidas usando modelos QSAR basados en ADL en ensayos de simulación virtual.



Comp. <sup>a</sup>	Ref. <sup>b</sup>	ΔP% <sup>c</sup>	ΔP% <sup>d</sup>	Actividad antitricomona		
				μg/ml		
				<b>100</b>	<b>10</b>	<b>1</b>
<b>1</b>		76,57	79,43	100 <sup>e</sup>	100 <sup>e</sup>	(87) <sup>f</sup>
<b>2</b>	Ochoa y col., 1999	38,00	13,68	100 <sup>e</sup>	94 <sup>e</sup>	(59) <sup>f</sup>
<b>3</b>		12,46	<b>-68,36</b>	100 <sup>e</sup>	100 <sup>e</sup>	(65) <sup>f</sup>
<b>Ie</b>		63,79	30,18	95,2 <sup>e</sup>	(55,1) <sup>f</sup>	0
<b>Ig</b>		<b>-6,20</b>	4,78	100 <sup>e</sup>	88,6 <sup>e</sup>	(2,2) <sup>f</sup>
<b>Ih</b>		18,87	<b>-27,84</b>	100 <sup>e</sup>	(46,8) <sup>f</sup>	0
<b>Ij</b>		75,14	85,15	92,7 <sup>e</sup>	(30,2) <sup>f</sup>	0
<b>Ik</b>	Coro y col., 2005	31,58	37,42	100 <sup>e</sup>	(50,2) <sup>f</sup>	(15,6) <sup>f</sup>
<b>II d</b>		-71,99	-89,10	Inactivo		
<b>II e</b>		46,06	66,45	100 <sup>e</sup>	(84,0) <sup>f</sup>	(27,1) <sup>f</sup>
<b>II f</b>		<b>-92,35</b>	10,95	100 <sup>e</sup>	(64,4) <sup>f</sup>	0
<b>II g</b>		<b>-30,82</b>	54,47	100 <sup>e</sup>	(82,2) <sup>f</sup>	(38,8) <sup>f</sup>

<sup>a</sup>Las estructuras moleculares de los compuestos están representadas en la parte superior de la tabla. <sup>b</sup> Referencias bibliográficas de donde fueron tomados los resultados de la actividad *in vitro*. <sup>c</sup> Predicción de la actividad tricomonocida por las Ec. 3.11 y 3.12; ΔP% = [P(Activo) - P(Inactivo)]x100. <sup>e</sup> Porcentaje de reducción de *T. vaginalis* o actividad citocida a las 24 h. <sup>f</sup> Porcentaje de inhibición de crecimiento de *T. vaginalis* a las 24 h.

### 3.1.8 Resultados de la predicción virtual de compuestos con otros usos farmacológicos

Utilizando los 12 modelos de clasificación descritos anteriormente (3.1; 3.2; 3.3; 3.4; 3.5; 3.6; 3.7; 3.8; 3.9; 3.10; 3.11 y 3.12), se realizó la predicción virtual de **174 compuestos** seleccionados de la literatura, los cuales poseen algún tipo de actividad antiprotozoaria; pero

no señalada frente a *T. vaginalis*. **Otros 297** compuestos citados por poseer acciones diferentes a la antiprotozoaria y a la tricomonicida, y los 73 “inactivos” incluidos en la SE y SP utilizadas en la generación de los modelos, fueron igualmente preparados para el cribado virtual frente a *T. vaginalis*. A todos ellos les fueron calculados los índices cuadráticos, lineales y bilineales no estocásticos y estocásticos, basados en relaciones tanto de átomos como de enlaces mediante el software **TOMOCOMD-CARDD**. Posteriormente, cada caso fue evaluado por los modelos de clasificación a través de su inclusión en los ficheros de trabajo del programa de procesamiento **STATISTICA**. En los Anexos 3 y 4 se muestra los valores de  $\Delta P\%$  obtenidos con cada modelo para cada compuesto, es decir, la probabilidad con la que cada modelo predice la acción frente a *T. vaginalis* en cada caso. Para los compuestos que tienen algún tipo de actividad frente a otros protozoos, fue tomado como valor de corte en el cribado virtual. Para el resto de los compuestos, fue considerado como valor mínimo de probabilidad 70 %. Con el fin de determinar que compuestos resultaban más prometedores, a la evaluación positiva por cada modelo se le asignó valor de 1 punto, resultando que para aquellos compuestos seleccionados como activos (según el criterio de  $\Delta P\%$  correspondiente) por todos los modelos, se tendrían 12 puntos de actividad, considerándose los mismos como los más promisorios. De los 174 productos con alguna actividad frente a protozoos, 15 resultaron activos según los 12 modelos por poseer valores de  $\Delta P\% > 80 \%$ . Otros 12 compuestos fueron evaluados como positivos por 11 modelos y 7 por 10 modelos (Anexo 3). Del grupo de 370 compuestos con otros usos farmacológicos, 5 fueron clasificados por los 12 modelos como activos ( $\Delta P\% > 80 \%$ ), uno por 11 modelos y 5 por 10 modelos. Es de destacar que 237 de estos 370 casos no resultaron activos por ninguno de los 12 modelos evaluados, y 30 compuestos por un solo modelo, representando más del 70 % del total.

A partir de estos resultados virtuales, se seleccionaron 9 compuestos para ensayos *in vitro* siguiendo el criterio de disponibilidad y factibilidad económica de su adquisición. Dos correspondían al grupo de inactivos (troxerutina y nitrodan) (Anexo 4) y 7 del grupo de los activos frente a otros parásitos (nitromida, benznidazol, nihidrazona, nitrofural, nitrofenida, nifurtimox, mefloquina) (Anexo 3). A estos 9 compuestos seleccionados se les determinó la actividad *in vitro* frente a la cepa ATCC JH de *T. vaginalis* (ver punto 3.2.3.3 Cribados farmacológicos de los productos con actividad *in silico* frente a *T. vaginalis*). Los compuestos con mejores resultados *in vitro* fueron seleccionados para ser evaluados *in vivo* en un modelo de infección intraperitoneal en ratón NMRI (ver puntos 3.4.2.3. Experimento 3 y 3.4.2.4. Experimento 4).

Debe ser apuntado, que de uno de los productos evaluados por los modelos virtuales (tenonitrazol), sólo conocíamos al inicio del estudio, su acción antifúngica. La acción frente a *T. vaginalis* de dicho compuesto fue predicha por 11 de los 12 modelos empleados en el cribado virtual. Posteriormente conocimos de su acción frente a *T. vaginalis* publicada por Viossat y col., (1991), por lo que no le fueron repetidos los ensayos *in vitro* frente al parásito. Este resultado corrobora las potencialidades de nuestro sistema de modelos para la identificación (selección) de nuevos compuestos líderes tricomonocidas.

## **3.2 Ensayos *in vitro***

### **3.2.1 Cribados farmacológicos de los productos con actividad *in silico* frente a *T. vaginalis***

Una vez realizado la corroboración experimental de todos los modelos utilizando los compuestos de síntesis, se procedió a evaluar *in vitro*, aquellos compuestos que le fue calculada la predicción mediante métodos virtuales por los 12 modelos no estocásticos y estocásticos descritos en el apartado 3.1.

Los compuestos para cribados *in vitro* fueron escogidos teniendo en cuenta en primer lugar, todos aquellos que tuvieron una predicción acumulada en 9 ó más de los 12 modelos evaluados, su existencia física en el laboratorio de Parasitología de la Facultad de Farmacia de la UCM, así como su factibilidad económica y/o fácil obtención por síntesis química, quedando por evaluar una gran cantidad de compuestos los cuales mostraron una predicción elevada, lo que resulta un potencial de trabajo para futuras investigaciones.

En la Tabla 3.38 se puede observar los resultados del cribado *in vitro* de los productos escogidos con buena predicción virtual frente a *T. vaginalis*. De los 9 compuestos evaluados, 8 mostraron actividad citocida a la concentración de 100 µg/ml y tres (benznidazol; nihidrazona y nitrofenida) mantienen esta actividad a la concentración de 10 µg/ml.



**Tabla 3.38** Resultados de la actividad *in vitro* de los compuestos con buenos resultados de predicción frente a *T. vaginalis* en ensayos virtuales.

Número	Producto	Actividad en Modelos	% Act Citost (% Red) 24 h			% Act Citost (% Red) 48 h		
			100	10	1	100	10	1
1	Nitromida	12	<b>95,72</b>	71,39	45,99	<b>98,67</b>	28,27	18,63
2	Benznidazol	11	<b>100,00</b>	<b>88,85</b>	11,49	<b>100,00</b>	<b>88,38</b>	16,17
3	Nihidrazona	11	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>	82,35	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>	68,95
4	Nitrofurafural	11	<b>99,28</b>	38,94	2,23	<b>100,00</b>	32,93	0,00
5	Nitrofenida	11	<b>100,00</b>	<b>97,11</b>	49,20	<b>100,00</b>	<b>98,87</b>	17,56
6	Nifurtimox	10	<b>100,00</b>	86,21	21,44	<b>100,00</b>	60,72	14,37
7	Mefloquina	10	<b>100,00</b>	40,03	0,00	<b>100,00</b>	30,60	0,27
8	Nitrodan	12	<b>99,25</b>	68,98	39,04	<b>99,49</b>	32,55	25,48
9	Troxerutina	12	8,40	0,00	0,00	32,63	5,09	0,00
MTz	Metronidazol	12	<b>(100)</b>	<b>(99,1)</b>	<b>(98,0)</b>	<b>(100)</b>	<b>(100)</b>	<b>(99,5)</b>

Leyenda: Actividad farmacológica de los compuestos ensayados, los cuales fueron añadidos a los cultivos a las concentraciones de 100, 10 y 1µg/ml: % Act Citost # = Actividad citostática (24 ó 48 horas) y (% Red)# = Actividad citocida (24 ó 48 horas). Mtz = Metronidazol (concentraciones de 2, 1 y 0.5 µg /ml, respectivamente)

### 3.3 Ensayos *in vivo*

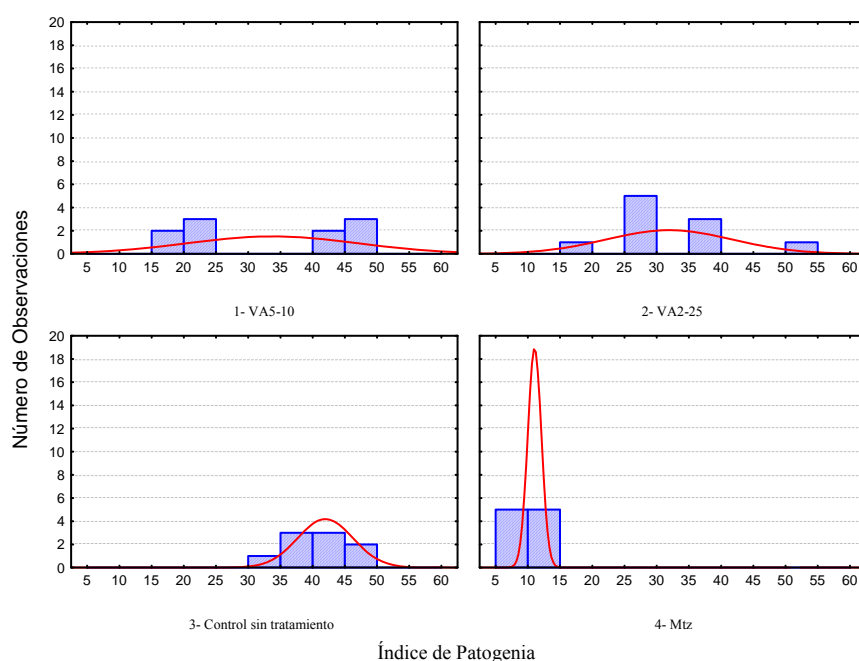
#### 3.3.2 Ensayos *in vivo* utilizando el modelo de infección intraperitoneal con *T. vaginalis* en ratones NMRI

Se realizaron 4 experimentos *in vivo* donde se determinó la actividad de diferentes compuestos que resultaron activos por los modelos *in silico* e *in vitro*. Se utilizaron ratones NMRI, los cuales se infectaron por vía intraperitoneal con la cepa ATCC C1NIH de *T. vaginalis*. Para cada compuesto probado se utilizó un grupo de 10 ratones. En cada experimento se utilizaron controles de infección y de tratamiento con metronidazol. A todos los ratones se les determinó el Índice de patogenia (IP) y se les controló el peso antes y durante el tratamiento.

##### 3.3.2.1 Experimento 1

En este experimento se formaron 6 grupos de 10 ratones cada uno y distribuidos de forma aleatoria. Dos de estos grupos fueron tratados con los productos de síntesis (VA5-10 y VA2-25), los restantes 4 grupos se utilizaron como control de infección, control de tratamiento con metronidazol, control inoculado con medio por vía intraperitoneal y control de peso sin infectar.

A los animales muertos durante el transcurso del experimento se les determinó el IP, puntuando mortalidad y lesiones de acuerdo al baremo del apartado 3.3.4.2. Los ratones que no murieron fueron sacrificados a los 15 días, valorándose la presencia de las lesiones, según la Tabla 3.15. El mayor IP encontrado fue el del grupo control con  $35 \pm 8.34$  puntos, (Anexo 5), siendo el órgano más afectado el hígado por su cara diafragmática, con una media de 9.8 de 12 puntos posibles. Ninguno de los grupos de ratones tratados con los productos de síntesis mostró una mejoría significativa con respecto al grupo control de infección, siendo el IP para los compuestos VA5-10 y VA2-25 de  $33 \pm 8.65$  y  $25.2 \pm 3.43$ , respectivamente. Teniendo en cuenta que los datos no tienen una distribución normal (Figura 3.10), se compararon los grupos mediante la prueba de Kruskal-Wallis, encontrándose diferencias altamente significativas ( $P < 0.01$ ) entre los grupos.



**Figura 3.10** Histograma de frecuencia absoluta del índice de patogenia de ratones infectados con *T. vaginalis* y tratamientos aplicados.

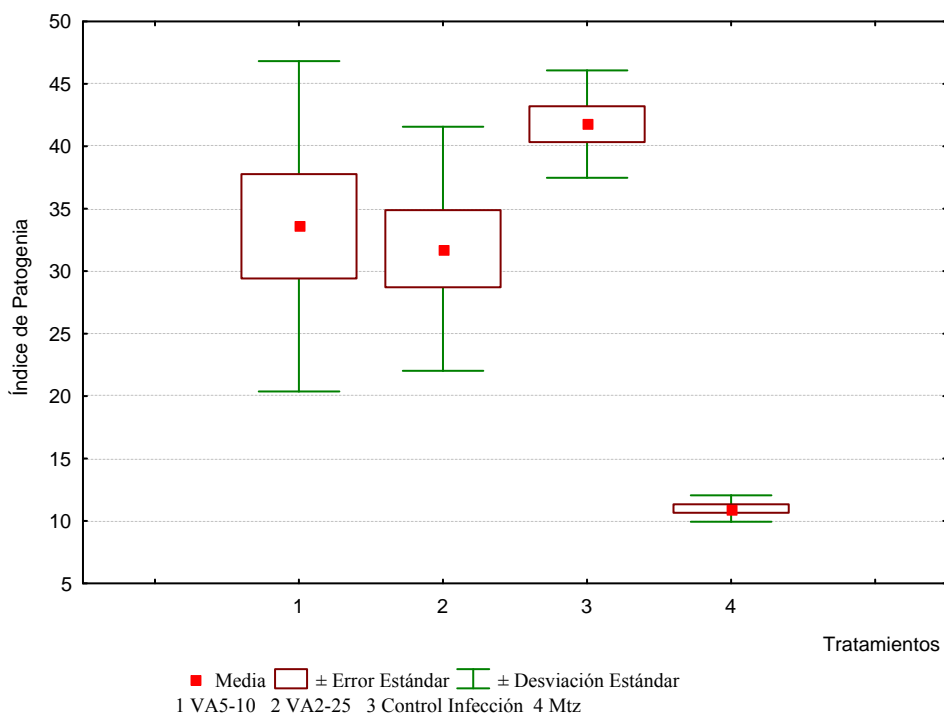
Para conocer que grupos se diferenciaban estadísticamente, se realizó la prueba de comparaciones múltiples para distribuciones libres, encontrándose diferencias altamente significativas ( $P < 0.01$ ) entre los grupos control de infección y tratado con metronidazol, el cual tuvo un IP de  $1.6 \pm 1.84$  (Tabla 3.45). Los ratones tratados con metronidazol también se diferenciaron de los que recibieron los productos VA5-10 y VA2-25, no encontrándose en estos casos resultados favorables para estos compuestos. Los grupos control de peso e inoculado con medio por vía intraperitoneal, no mostraron ninguna lesión.

**Tabla 3.45** Resultados del índice de patogenicidad de los ratones infectados por vía intraperitoneal y tratados por vía oral con diferentes tratamientos. Experimento 1.

	Producto Evaluado	M	LA.	P y GP	BPE	H (CV)	H (CD)	IP
<chem>O=[N+]([O-])c1ccc2c(c1)nc(CN3C=CC=CC3)c2=O</chem> <b>VA5-10</b>	Media	1.2	1	4.8	7.6	8.2	10.2	33 <sup>a</sup>
	Desv. Stad.	2.53	2.16	1.40	1.58	1.99	1.14	8.65
<chem>O=[N+]([O-])c1ccc2c(c1)nc3c(c2)N4CCCCC4n3</chem> <b>VA2-25</b>	Media	0	0	1	7.2	7.2	9.8	25.2 <sup>ab</sup>
	Desv. Stad.	0.00	0.00	1.05	1.40	2.15	1.48	3.43
<b>Control de Infección</b>	Media	2	1.4	4.2	8.8	8.8	9.8	35 <sup>b</sup>
	Desv. Stad.	4.62	2.12	2.39	2.15	1.69	1.75	8.34
<chem>CN1C=CC=C1C(=O)O</chem> <b>Metronidazol</b>	Media	0.00	0.00	0.60	0.20	0.80	0.00	1.60 <sup>c</sup>
	Desv. Stad.	0.00	0.00	0.97	0.63	1.03	0.00	1.84

Letras iguales (a,a) (b,b) no difieren estadísticamente ( $P > 0.05$ )

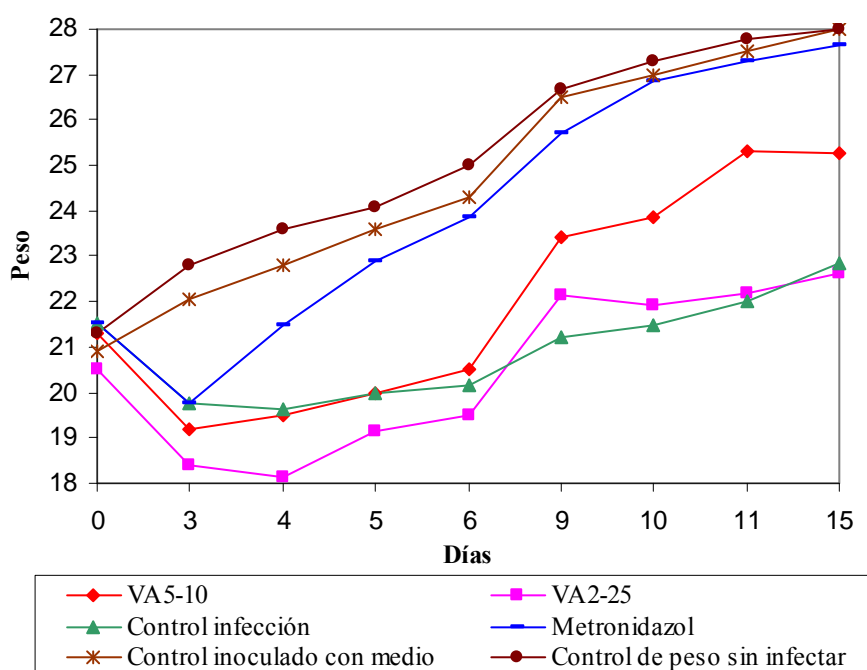
Letras diferentes (a,b,c) difieren estadísticamente ( $P < 0.01$ )



**Figura 3.11** Media y Variabilidad del índice de patogenicidad de los ratones infectados con *T. vaginalis*. Experimento 1.

En esta Figura 3.11 se observan esquemáticamente las medias de los IP de los grupos tratados (1; 2; 4) y control sin tratamiento (grupo 3), además del error y la desviación estándar. En este gráfico se puede valorar más claramente las diferencias entre cada uno de los grupos.

Otros de los aspectos valorados en los ratones infectados con *T. vaginalis* fue el peso vivo y su comportamiento durante el experimento. Todos los ratones fueron pesados antes de infectarlos (tiempo cero) y se distribuyeron aleatoriamente para cada grupo, no existiendo diferencias significativas ( $P>0.05$ ) mediante la prueba de Kruskal-Wallis en cuanto al peso de los ratones de cada uno de los grupos formados (Figura 3.12). Nuevamente, fueron pesados antes de proceder al tratamiento y al final del experimento (3, 4, 5, 6, 9, 10, 11 y 15 días post infección). En los resultados se pudo comprobar que los ratones infectados habían disminuido de peso al tercer día post infección con respecto al peso inicial y con respecto a los ratones controles que no fueron infectados, existiendo una diferencia altamente significativa ( $P<0.01$ ) entre el peso de los ratones en el tiempo cero y a las 72 horas (Figura 3.12) y entre el peso de los ratones infectados y no infectados. Esta prueba se determinó mediante *t-test* para dos muestras dependientes.



**Figura 3.12** Seguimiento del peso de los ratones infectados con *T. vaginalis* por vía intraperitoneal y con diferentes tratamientos.

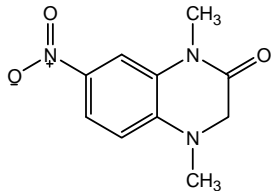
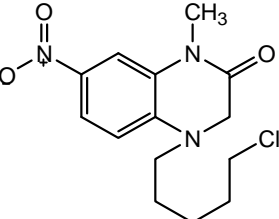
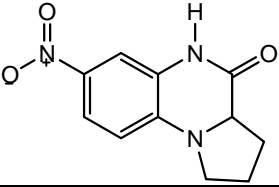
La diferencia del peso al final del experimento fue marcada entre el grupo tratado con metronidazol y los grupos control de infección y el tratado con VA5-10, existiendo diferencias

estadísticas significativas entre ellos ( $P < 0.01$ ) al comparar los pesos mediante Análisis de Varianza y la prueba de Diferencias Significativas Mínimas (LSD). No existió diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) entre los grupos control sin tratar y el tratado con VA5-10, comportándose su peso de forma similar.

### 3.3.2.2 Experimento 2

En este experimento se formaron tres grupos para tratamientos con productos de síntesis, los cuales tuvieron buena predicción *in silico* y corroboración experimental *in vitro*. Se utilizaron además dos grupos controles, uno sin tratamiento y otro tratado con metronidazol. Los productos ensayados en los tres primeros grupos fueron el VA7-67, el VA7-69 (quinoxalin-2-onas 1,4-disustituidas) y el VA8-34 (quinoxalin-2-ona condensada).

**Tabla 3.46** Resultados del índice de patogenicidad de los ratones infectados por vía intraperitoneal y tratados por vía oral con diferentes tratamientos. Experimento 2.

	Producto Evaluado	M	LA.	P y GP	BPE	H (CV)	H (CD)	IP
	Media	0,00	0,20	4,00	4,40	4,00	7,20	19,8 <sup>a</sup>
	Desv. Stad.	0,0	0,6	1,9	2,1	1,3	1,4	3,3
	Media	0,00	0,20	2,60	3,20	3,00	5,60	14,6 <sup>a</sup>
	Desv. Stad.	0,0	0,6	1,9	1,0	1,7	2,5	3,7
	6,80	1,80	4,60	9,00	4,60	9,60	36,4 <sup>b</sup>	6,80
	9,0	2,4	2,3	1,4	2,1	2,5	11,1	9,0
<b>Control de Infección</b>	Media	1,60	2,20	7,60	9,80	8,20	11,00	40,4 <sup>bc</sup>
	Desv. Stad.	3,4	2,2	1,3	1,8	1,8	1,1	6,5
<b>Metronidazol</b>	Media	0,00	0,00	0,67	0,44	0,44	0,00	1,56 <sup>d</sup>
	Desv. Stad.	0,0	0,0	1,0	0,9	0,9	0,0	1,7

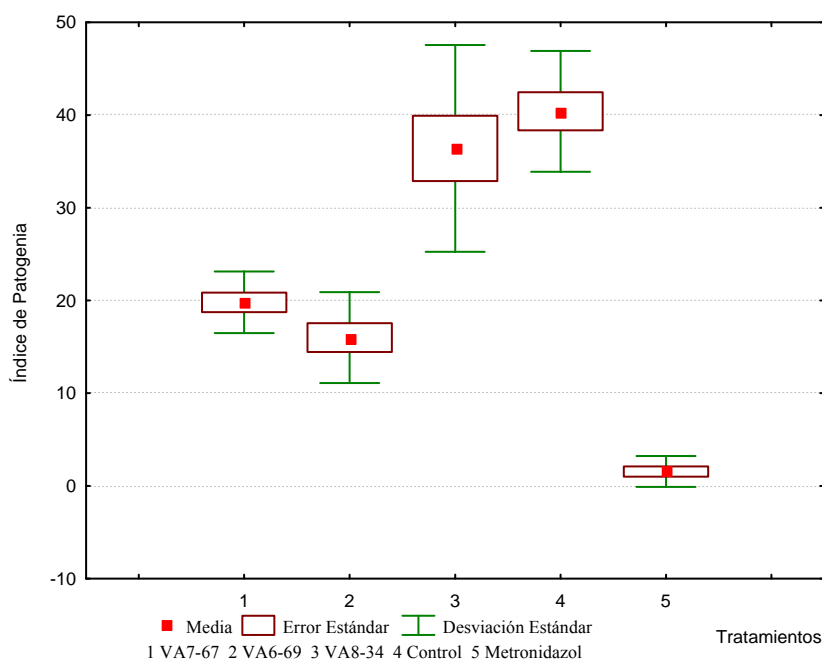
Letras iguales (a,a) (b,b) no difieren estadísticamente ( $P > 0,05$ )

Letras diferentes (a,b,c,d) difieren estadísticamente ( $P < 0,01$ )

Al comparar los IP (Tabla 3.46) mediante la prueba de Kruskal-Wallis se comprobó que existen diferencias altamente significativas entre los grupos de la investigación ( $P < 0,01$ ). Los

mejores resultados se obtuvieron con la quinoxalinona que tiene un sustituyente metil y cloropentil en las posiciones 1 y 4, respectivamente (VA7-69) cuyo IP fue de  $14,6 \pm 3,7$ . A este resultado, le siguió el de la quinoxalinona que tiene dos sustituyentes metil en posición 1,4 (VA7-67), el cual mostró un IP de  $19,8 \pm 3,3$ . En estos dos grupos tratados no hubo muertes en los 15 días que duró el experimento. La prueba de comparaciones múltiples para distribuciones libres evidenció que entre las dos quinoxalinonas no existió diferencias significativas ( $P > 0,05$ ). Sin embargo, sí se encontraron diferencias altamente significativas ( $P < 0,01$ ) con respecto al control de infección y al grupo tratado con metronidazol ( $IP = 1,56 \pm 1,7$ ); teniendo este último mejor resultado que los productos de síntesis ensayados.

Los resultados del IP obtenido en los ratones tratados con la pirroloquinoxalinona (VA8-34) difieren de los obtenidos con los productos anteriormente analizados, en este caso de obtuvo un  $IP = 36,4 \pm 11,1$ , el cual no difiere estadísticamente del control de infección ( $IP = 40,4 \pm 6,5$ ). El grupo tratado con metronidazol tuvo una diferencia altamente significativa ( $P < 0,01$ ) del resto de los grupos tratados con productos de síntesis y control de infección. En la Figura 3.13 se observa esquemáticamente la media del IP de los grupos tratados (1, 2, 3) y control sin tratamiento y metronidazol (grupos 4 y 5), además del error y desviación estándar.

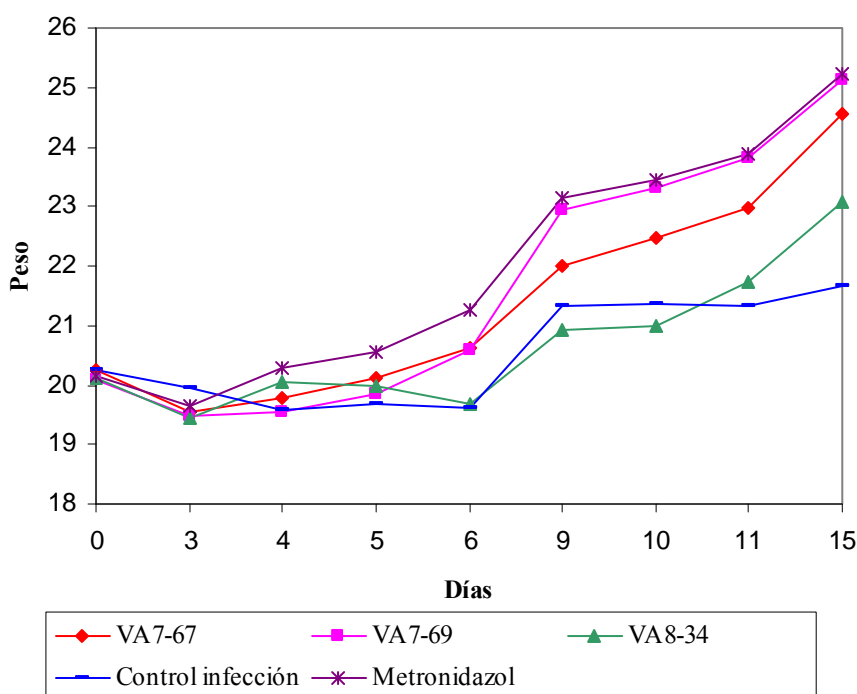


**Figura 4.13** Media y Variabilidad del índice de patogenia de los ratones infectados con *T. vaginalis*. Experimento 2.

En este experimento también se valoró el comportamiento del peso de todos los animales tratados y controles, comprobándose que hubo una disminución significativa a las 72 h post-infección con respecto al peso inicial de todos los ratones Figura 3.14. Para los cálculos

estadísticos, se utilizó el peso de los ratones de todos los grupos al inicio y a las 72 horas, realizándole el análisis estadístico de *t de student* para dos muestras dependientes.

El incremento del peso fue significativo para los grupos tratados con metronidazol, VA7-67 y VA7-69, no existiendo diferencias significativas entre ellos ( $P>0,05$ ) a los 15 días post-infección. El peso de los ratones en estos tres tratamientos sí tuvo una diferencia altamente significativa ( $P<0.01$ ) con respecto al peso de los ratones del grupo control de infección. También mediante la prueba de U Mann-Whitney se determinó que no existe diferencias significativas entre el peso de los ratones del grupo tratado con VA8-34 y el control de infección ( $P>0,05$ ), siendo esta diferencia desfavorable para este tratamiento (Figura 3.14).



**Figura 3.14** Comportamiento del peso de todos ratones infectados con *T. vaginalis* por vía intraperitoneal en el tiempo cero y antes del primer tratamiento.

### 3.3.2.3 Experimento 3

En el experimento 3 se formaron 6 grupos de ratones NMRI e infectados con la cepa ATCC C1NIH de *T. vaginalis*. Se utilizaron dos grupos para el tratamiento con los productos de síntesis VA2-38 y VA5-5b y dos para el tratamiento con benznidazol a una dosis de 100 mg/Kg/día, diferenciándose en la duración del tratamiento: 4 y 7 días para los grupos 3 y 4, respectivamente. Los grupos 5 y 6 se utilizaron para el control de infección y el tratamiento con metronidazol, respectivamente. El benznidazol resultó activo en los modelos de

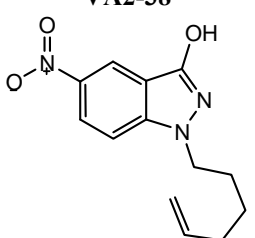
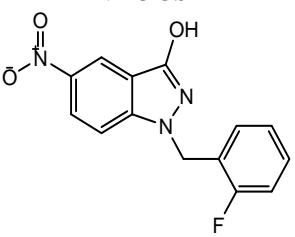
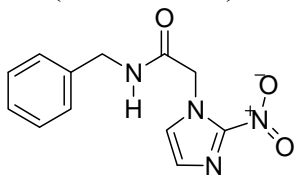
predicción virtual y posteriormente mostró actividad en los ensayos *in vitro* frente a la cepa ATTC JH31 A#4 de *T. vaginalis*.

Los ratones infectados y sin tratamiento tuvieron un IP de  $41,78 \pm 4,3$ ; siendo la diferencia altamente significativa con respecto a los ratones tratados con metronidazol (IP de  $10 \pm 1,9$ ). El 66.6 % de los ratones murió antes de los 15 días post-infección en el grupo control de infección, no muriendo ninguno de los ratones tratados con metronidazol (Tabla 3.47).

Los mejores resultados con los grupos tratados se obtuvieron con el benznidazol (100 mg/kg/día), no existiendo diferencias significativas entre el IP de los dos grupos tratados con este fármaco (4 y 7 tratamientos) y el grupo control con metronidazol ( $P > 0.05$ ), al realizarle el análisis estadístico U Mann-Whitney. Los dos productos derivados de indazoles evaluados, VA2-38 y VA5-5b, tuvieron un IP menor ( $33,6 \pm 13,2$  y  $31,8 \pm 9,8$ ; respectivamente) que el grupo control de infección, mostrando diferencias estadísticas ( $P < 0.05$ ) con este control solamente el grupo tratado con VA5-5b. El IP obtenido por ambos grupos, tuvo una diferencia altamente significativa ( $P < 0.01$ ) con el IP alcanzado por los grupos tratados con metronidazol y benznidazol (Figura 3.15).



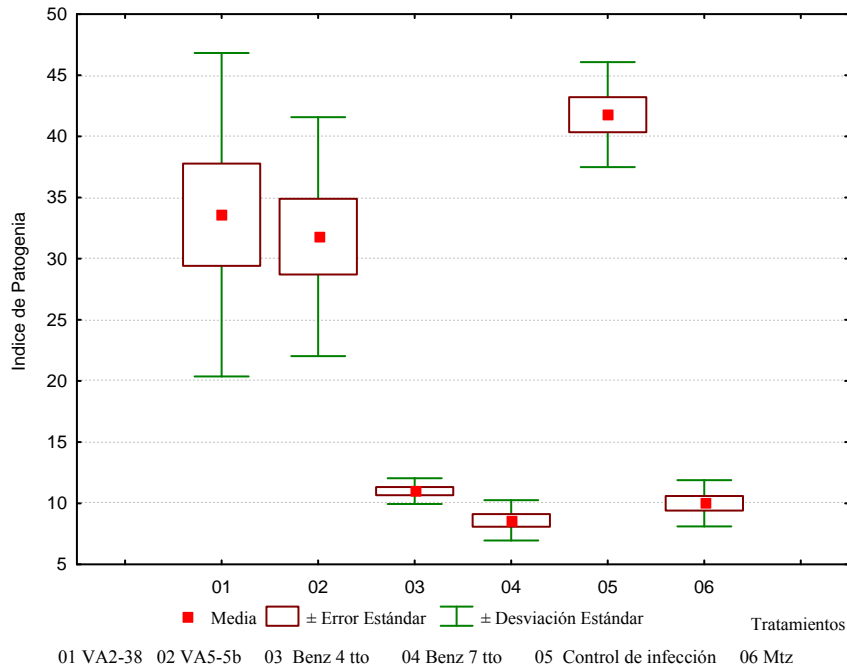
**Tabla 3.47** Resultados del índice de patogenicia de los ratones infectados por vía intraperitoneal con *T. vaginalis* y tratados por vía oral con diferentes tratamientos.

	Producto Evaluado	M	LA.	P y GP	BPE	H (CV)	H (CD)	IP
<b>VA2-38</b> 	Media	2,40	0,20	7,80	8,80	6,60	7,80	33,6 <sup>a d</sup>
	Desv. Stad.	4,2	0,6	2,2	3,0	3,0	3,9	13,2
<b>VA5-5b</b> 	Media	1,80	0,40	5,20	8,60	8,00	7,80	31,8 <sup>a</sup>
	Desv. Stad.	4,0	0,8	3,4	2,7	2,3	2,2	9,8
<b>Benznidazol (4 tratamientos)</b> 	Media	0,00	0,00	3,40	3,00	2,40	2,20	11,0 <sup>b</sup>
	Desv. Stad.	0,0	0,0	1,3	1,1	0,8	0,6	1,1
<b>Benznidazol (7 tratamientos)</b>	Media	0,00	0,00	3,40	2,00	2,00	1,20	8,6 <sup>b</sup>
	Desv. Stad.	0,0	0,0	1,3	0,9	0,0	1,0	1,6
<b>Control de Infección</b>	Media	9,60	0,20	6,40	8,60	5,80	8,80	41,7 <sup>d</sup>
	Desv. Stad.	10,4	0,6	2,8	2,1	2,9	3,0	4,3
<b>Metronidazol</b>	Media	0,00	0,00	3,00	2,60	2,60	1,80	10 <sup>c b</sup>
	Desv. Stad.	0,0	0,0	1,1	1,9	1,0	0,6	1,9

Letras iguales (a,a) (b,b) no difieren estadísticamente  $P > 0,05$

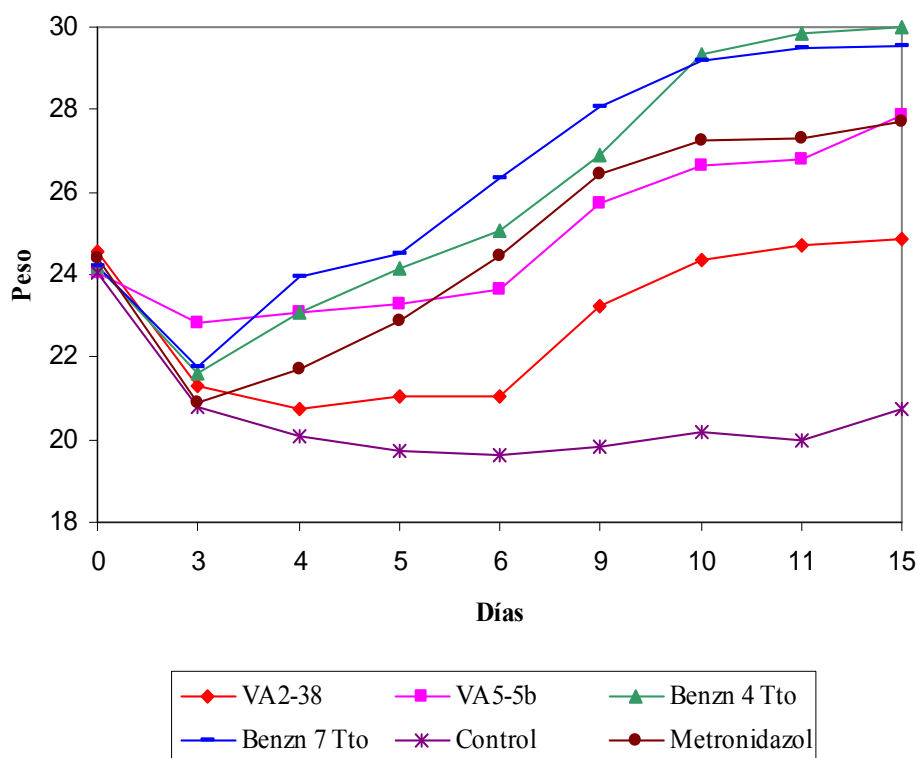
Letras diferentes (a,b,c,d) tienen diferencia estadística  $P < 0,05$

En la Figura 3.15 se observa esquemáticamente el comportamiento del IP de todos los grupos tratados y controles con y sin tratamiento.



**Figura 3.15** Media y Variabilidad del índice de patogenicidad de los ratones infectados con *T. vaginalis*. Experimento 3.

El comportamiento del peso fue similar al de los dos experimentos anteriores. En el momento inicial del experimento, todos los animales mostraron un peso similar, con una media general de 24,2 g de peso vivo para todos los grupos (Figura 3.16), no mostrando diferencias significativas ( $P > 0.05$ ). Al tercer día post-inoculación, y antes de iniciar el primer tratamiento, todos los ratones habían disminuido de peso, obteniéndose una media para todos los grupos de 21.5 g. Todos los grupos mostraron diferencias significativas entre el peso al inicio y las 72 h después de la infección ( $P < 0.05$ ). El grupo control de infección no tuvo un incremento del peso vivo, contrario a todos los grupos tratados, siendo marcada esta diferencia ( $P < 0.01$ ) entre los grupos tratados con benznidazol, metronidazol y VA5-5b a los 15 días de iniciado el experimento, tiempo en el que fueron sacrificados todos los animales.



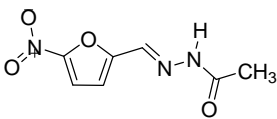
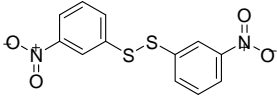
**Figura 3.16** Comportamiento del peso de los ratones infectados con *T. vaginalis* por vía intraperitoneal y con diferentes tratamientos.

### 3.3.2.4 Experimento 4

En el experimento 4 se evaluaron otros dos compuestos que resultaron activos por los modelos de predicción y por la corroboración experimental *in vitro*. En total se utilizaron cuatro grupos de ratones NMRI de 10 animales cada uno, los dos primeros correspondieron a los productos nihidrazona y nitrofenida, un tercer grupo correspondió al control de infección y el último al control de tratamiento con metronidazol.

Durante el desarrollo del experimento 5 ratones del grupo control de infección murieron antes de los 15 días, alcanzando este grupo un IP de  $47,20 \pm 9,7$  al final del experimento. Los grupos tratados con los compuestos problemas no tuvieron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) con el grupo control de infección, alcanzando un IP de  $44,60 \pm 9,6$  y  $51,0 \pm 9,8$ , para los compuestos nihidrazona y nitrofenida, respectivamente. Estos tres grupos sí tuvieron diferencias altamente significativas ( $P < 0.01$ ) con el grupo control con metronidazol, el cual obtuvo un IP de  $7,60 \pm 1,8$  (Tabla 3.48).

**Tabla 3.48** Resultados del índice de patogenicidad de los ratones infectados por vía intraperitoneal con *T. vaginalis* y tratados por vía oral con diferentes tratamientos.

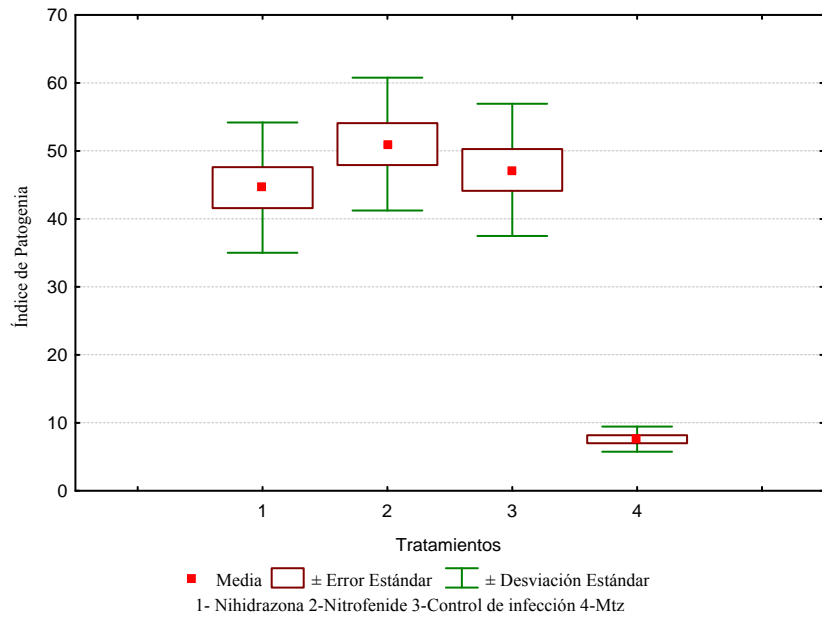
	Producto Evaluado	M	LA.	P y GP	BPE	H (CV)	H (CD)	IP	
	<b>Nihidrazona</b>	Media	6,00	1,00	8,40	9,20	9,40	10,60	44,6 <sup>a</sup>
		Desv. Stad.	9,1	1,4	1,6	1,0	1,0	1,3	9,6
	<b>Nitrofenida</b>	Media	12,60	1,80	7,20	8,80	9,60	11,00	51 <sup>a</sup>
		Desv. Stad.	12,7	1,8	1,4	1,0	0,8	1,4	9,8
	<b>Control de infección</b>	Media	9,20	1,40	7,40	9,20	9,40	10,60	47,2 <sup>a</sup>
		Desv. Stad.	11,6	1,6	1,0	1,4	1,3	1,3	9,7
	Metronidazol	Media	0,00	0,00	1,60	1,00	2,80	2,20	7,6 <sup>b</sup>
		Desv. Stad.	0,0	0,0	0,8	1,1	1,0	0,6	1,8

Letras iguales (a,a) no difieren estadísticamente  $P > 0,05$

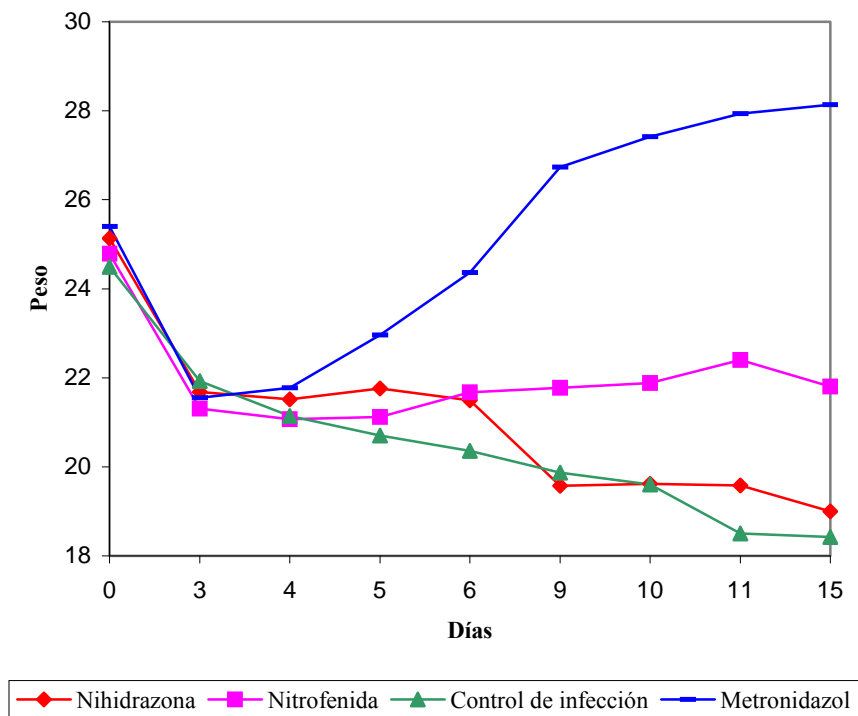
Letras diferentes (a,b,) tienen diferencia estadística  $P < 0,01$

En la Figura 3.17 se observa esquemáticamente el comportamiento del IP de los grupos tratados y controles con y sin tratamiento.

De forma general el peso de los ratones durante los tres primeros días de infectados, se comportó de forma similar a los experimentos 1; 2 y 3, disminuyendo marcadamente durante este tiempo. Al hacer un análisis estadístico entre el peso de todos los ratones a las 0 h y a las 72 h, encontramos diferencias altamente significativas (Figura 3.17). Durante el tratamiento el peso de los animales tratados con los productos nihidrazona y nitrofenida, no se diferenció del peso de los animales del grupo control de infección, no existiendo diferencias significativas entre ellos ( $P < 0,05$ ). El peso de los ratones de estos tres grupos, sí se diferenció del grupo control con metronidazol, el cual tuvo un incremento significativo a partir del día 2 de tratamiento (día 4 post infección) y hasta el final del mismo.



**Figura 3.17** Media y variabilidad del índice de patogenia de los ratones infectados con *T. vaginalis*. Experimento 4.



**Figura 3.18** Comportamiento del peso de los ratones infectados con *T. vaginalis* por vía intraperitoneal y con diferentes tratamientos.

## 4. DISCUSIÓN

### 4.1 Ensayos *in silico*

#### 4.1.1 Modelos de predicción. Desarrollo y validación de las funciones discriminantes

Como resultado del estudio teórico fueron generados 12 modelos de predicción con el objetivo de identificar nuevas entidades moleculares activas frente a *T. vaginalis*. Estos modelos de clasificación se obtuvieron a partir de los índices cuadráticos, lineales y bilineales calculados con el programa *TOMOCOMD-CARDD* (Marrero y Romero, 2002). En todos los casos se utilizó el análisis discriminante lineal (ADL) como metodología (van de Waterbeemd, 1995a) para obtener las funciones discriminantes (ecuaciones 3.1 - 3.12) y discriminar entre las dos poblaciones de moléculas activas e inactivas. Este tipo de modelo de clasificación permite seleccionar racionalmente los candidatos más promisorios de los compuestos menos potentes o inactivos.

El poder predictivo de los modelos, así como la robustez de los mismos, fueron validados mediante series de predicción externa o usando procedimientos de validación interna. Así mismo fueron calculados los parámetros utilizados comúnmente en la estadística médica tales como sensibilidad, especificidad, falsos positivos y coeficiente de correlación de Matthews (*C*) (Baldi y col., 2000). En este contexto, la sensibilidad no es más que la probabilidad de predecir un ejemplo positivo correctamente, mientras que la especificidad es la probabilidad de que una predicción positiva es correcta. A su vez, *C* cuantifica la fuerza de la relación lineal entre los descriptores moleculares y las clasificaciones, y puede proporcionar a menudo una evaluación mucho más equilibrada de la predicción que, por ejemplo, los porcentajes de clasificación correcta.

Los primeros 6 modelos de clasificación corresponden a los resultados de las variables obtenidas para índices cuadráticos (3.1 y 3.2), lineales (3.3 y 3.4) y bilineales (3.5 y 3.6) basados en las relaciones de adyacencia entre los átomos que conforman las moléculas de la serie de entrenamiento (SE) y serie de predicción (SP). Con las dos primeras de estas ecuaciones (3.1 y 3.2) se obtuvo un *C* de 0,89 (0,75) y 0,73 (0,75) para las SE (SP), respectivamente. Los modelos obtenidos, para las ecuaciones 3.3 y 3.4, mostraron un *C* elevado de 0,91 (0,81) y 0,82 (0,72), para las SE (SP), correspondientemente, mientras que para las ecuaciones 3.5 y 3.6 el *C* fue de 0,89 (0,79) y 0,87 (0,85), en las SE (SP), respectivamente. Como puede observarse todos los *C* sobrepasan el 0,75 % para la SE excepto

para el modelo **3.2** (0,73); mientras que para la SP el **C** más bajo obtenido fue para la ecuación **3.4**.

Los siguientes 6 modelos corresponden a los resultados obtenidos para índices cuadráticos (**3.7** y **3.8**), lineales (**3.9** y **3.10**) y bilineales (**3.11** y **3.12**) basados en este caso en las relaciones de adyacencia entre enlaces. Las ecuaciones para los modelos **3.7** y **3.8** alcanzan un **C** de 0,75 (0,71) y 0,78 (0,65), respectivamente para las SE (SP). En las ecuaciones **3.9** y **3.10** tuvieron un **C** fue de 0,78 (0,71) y 0,65 (0,65) para las SE (SP), correspondientemente, mientras que las ecuaciones **3.11** y **3.12** obtuvieron un **C** de 0,8 (0,85) y 0,73 (0,71), para las SE (SP), respectivamente. En sentido general, los modelos basados en las relaciones de átomos obtuvieron un **C** más elevado que para los modelos basado en las relaciones de enlace.

El porcentaje de buena clasificación o exactitud fue superior al 80% en todos los modelos tanto para la SE como para la SP, al igual que la sensibilidad y especificidad, con excepción del modelo **3.10** que posee la más baja especificidad de todos los modelos (78,57% y 72,73%, para la SE y SP, respectivamente) (Tabla 3.27). La “razón de falsa alarma” (**FAR**) revela la probabilidad de seleccionar un compuesto negativo (no tricomonocida) como positivo (tricomonocida). El cálculo de este parámetro estadístico se realizó tanto para las SE como para las SP por cada uno de los modelos obtenidos. En la mayoría de los casos la **FAR** se comportó por debajo del 12%, siendo superado este valor solamente por 3 modelos y de estos solamente uno para la SE, correspondiendo los demás casos para la SP (modelos **3.4** y **3.8** con **FAR** > 12 % para la SP y el modelo **3.10** con **FAR** > 12% tanto para la SE como para la SP). En los tres casos esta **FAR** superior al 12% corresponde a ecuaciones basadas en índices estocásticos. Teniendo en cuenta la cantidad de compuestos químicos que existen en la actualidad (<http://www.cas.org/>) a los cuales no se les han realizado ensayos frente a microorganismos patógenos, es preferible obtener una **FAR** lo más baja posible, pues de esta manera no estaremos evaluando compuestos que los modelos lo describen como positivo, siendo realmente negativos.

La validación cruzada (VC) fue considerada como metodología para probar la robustez de los modelos obtenidos. Dicha VC consistió en retirar grupos de compuestos de la SE, volviendo a repetir los modelos con la base de datos reducida, hasta que todos los compuestos fueron retirados una vez (Wold y Eriksson, 1985; Rose y col., 2002). Se realizaron 5 VCs en el desarrollo de todos los modelos, dejando en 4 de estas el 10 % de los compuestos fuera (*Leave-10-fold full-out*, según sus siglas en inglés) y en un caso (índices bilineales basado en relaciones de átomos) el 15% de los compuestos. En este último caso se utilizó un 15% debido

a que la SE utilizada para el ajuste de estos modelos con los índices bilineales fue mayor que las SE utilizadas en los ajustes de los modelos con los restantes índices, Este proceder está en concordancia con lo referido en la literatura internacional para este tipo de procedimiento donde se plantea que los grupos deben diseñarse con una dimensión entre el 10 y el 20% de los datos (Wold y Eriksson, 1985; Rose y col., 2002). En los resultados se obtuvo que el promedio resultante de dicho proceso de validación fue superior al 90% para los modelos **3.3**; **3.4**; **3.5** y **3.6**, correspondiendo en este caso a los modelos obtenidos para los índices basado en las relaciones de adyacencia entre átomos. Solamente en el caso particular de la ecuación **3.3** uno de los modelos obtenidos alcanza un porcentaje de clasificación por debajo de 70 % para la SE, sin embargo con este mismo modelo se alcanza un 100% de clasificación para la SP. El resto de los modelos obtenidos para índices basados en las relaciones de adyacencia entre enlaces, alcanzan valores medios en la VC entre 80% y 90% tanto en la SE como en la SP.

Con el propósito de corroborar aún más el poder predictivo de los modelos, se llevó a cabo una validación de los modelos obtenidos utilizando una segunda SP externa. Los compuestos seleccionados para conformar dichas series aparecen citados en la literatura con la actividad resultante de pruebas *in vitro* frente a *T. vaginalis* (Alcalde y col., 1995; Gavini y col., 1997; Ochoa y col., 1999; Gavini y col., 2000; Aguirre y col., 2004; Kouznetsov y col., 2004b; Coro y col., 2005). Esta actividad, tanto negativa como positiva obtenida frente a *T. vaginalis*, nos sirvió para corroborar la calidad predictiva de los diferentes modelos. Aunque los distintos autores plantean varias formas de determinar la actividad frente al parásito, se puede plantear que existió correspondencia en la mayoría de los casos entre la predicción *in silico* con la actividad experimental publicada, considerando siempre como activos aquellos compuestos que mostraron acción a la máxima concentración evaluada.

Como puede ser visto en los resultados, los modelos **3.3** y **3.4** clasifican correctamente la mayoría de los 9 compuestos seleccionados (Gavini y col., 1997; 2000; Aguirre y col., 2004; Kouznetsov y col., 2004b). En el segundo caso, (ecuación **3.4**) solamente dos compuestos fueron seleccionados como falsos inactivos (clasificación correcta de 77,77%), mientras que con el modelo **3.3**, la predicción fue del 100 %, obteniéndose actividad para todos los compuestos. Este resultado, conjuntamente al obtenido en la SP, es la validación más importante de los modelos desarrollados, pues se ha podido corroborar la predicción *in silico*, en un ejercicio simulado de cribado virtual con compuestos evaluados experimentalmente y referidos en la bibliografía.



Empleando los modelos **3.5** y **3.6** fueron evaluados igualmente compuestos con actividad frente a *T. vaginalis* según Alcalde y col., (1995); Gavini y col., (1997); Gavini y col., (2000); Aguirre y col., (2004). En todos los casos se observó correspondencia entre los resultados teóricos y la actividad descrita por los distintos autores.

En este caso, la ecuación **3.7** tiene un poder predictivo sobre estos compuestos del 83,33%, clasificando mal 2 compuestos (un falso positivo y un falso negativo) de los 12 evaluados. Por otra parte, el modelo **3.8** clasificó inadecuadamente un total de 3 compuestos (75% de buena clasificación). Dos de los mal predichos fueron falsos negativos y uno un falso positivo.

El modelo **3.9** falló al clasificar erróneamente dos compuestos, los cuales mostraron actividad *in vitro* (Ochoa y col., 1999) a la máxima concentración evaluada (100 µg/ml). En este caso el modelo mostró un 83,33% de buena clasificación. La ecuación **4.20** predijo como activos a tres compuestos planteados como inactivos por Gavini y col., (2000). El porcentaje de buena clasificación para este modelo fue del 75% en esta serie externa.

El modelo **3.11** tiene un PBC del 75 %, prediciendo 3 compuestos como falsos negativos al ser comparados con los resultados publicados por Ochoa y col., (1999) y Coro y col., (2005). Un mejor resultado fue encontrado empleando el modelo **3.12**, el cual sólo predice incorrectamente dos compuestos activos como falsos negativos para un 83,33 % de PBC.

Con estos resultados queda demostrado que se pueden utilizar los modelos anteriormente mencionados para detectar compuestos con posible actividad tricomonocida, considerando un margen de error razonable (menor del 30 %).

#### **4.2 Ensayos *in vitro* e *in vivo***

Por falta de un sistema de prueba adecuado, se ha ensayado un gran número de modelos de infección ectópicas para evaluar el valor terapéutico de sustancias de prueba, en ratones, ratas y cobayos con *T. vaginalis* aisladas de humanos o de animales. Todos estos modelos poseen la desventaja que la sustancia no actúa en su sitio natural, sino en tejido subcutáneo, abdomen o en tejidos intramusculares. En los diferentes modelos las sustancias pueden mostrar variados efectos en dependencia de su comportamiento farmacocinético (Meinsgassner y col., 1975).

El modelo animal de *T. vaginalis* utilizando ratones NMRI también se ha utilizado para valorar el comportamiento de 52 aislamientos de este protozoo (Rojas y col., 2004). Estos experimentadores utilizaron ratones NMRI machos con un peso entre 20 y 22 g, los cuales fueron inoculados con los distintos aislamientos para determinarles el IP. También utilizaron grupos controles no inoculados e inoculados con medio sin suero. Ninguno de los animales de estos grupos controles mostraron signos de alteraciones o daños en sus órganos, por lo que todas las lesiones encontradas en los demás grupos donde son producto de la acción del protozoo y no del medio utilizado como vehículo.

En el experimento 1 realizado por nosotros, no se encontraron lesiones de los órganos en los animales de los grupos controles sin inocular y control inoculado con medio. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Rojas y col., (2004). Además de la valoración de las lesiones, evaluamos el comportamiento del peso de los ratones durante la duración del experimento. Los ratones de estos dos grupos controles, mantuvieron el incremento del peso vivo hasta el día 15 en que fueron sacrificados, contrario a lo que ocurre con los ratones infectados de los 4 experimentos realizados que disminuyen marcadamente de peso hasta el tercer día, comportándose posteriormente en dependencia de la actividad del tratamiento aplicado a cada grupo. Teniendo en cuenta los resultados de los grupos controles sin inocular e inoculado con medio, no se volvieron a utilizar en los experimentos 2; 3 y 4. En todos los experimentos sí se utilizó el grupo control de infección y el de tratamiento con metronidazol.

El inóculo de *T. vaginalis* utilizado en los experimentos fue de  $1 \times 10^7$  por ratón en un volumen final de 0,6 ml por vía intraperitoneal. Inóculo similar fue empleado por Gold (1993), con la diferencia de que ellos sacrifican los animales al séptimo día de iniciado el experimento. Posteriormente Nogal (1999), hace un estudio de tres inóculos distintos ( $10^6$ ;  $5 \times 10^6$  y  $10^7$ ) y diferentes tiempos de duración de los experimentos (15 y 30 días), recomendando  $10^7$  *T. vaginalis*/ratón como el inóculo ideal para lograr un mejor IP en los animales infectados y 15 días para sacrificar a los ratones y valorar las lesiones. Este mismo autor plantea que la cepa consanguínea BALB/c muestra el mayor IP al compararla con otra cepa consanguínea (C57Bl/10J) y las no consanguíneas NMRI y CD-1. En nuestros experimentos se utilizó la cepa no consanguínea NMRI, alcanzando en todos los casos un IP adecuado en los ratones infectados, lo que nos permitió poder utilizar esta cepa para la evaluación *in vivo* de los productos que resultaron activos en los modelos de predicción y posteriormente en los ensayos *in vitro*. Según Nogal (1999), la actividad tricomocida de los productos de síntesis se valora en función de la reducción de la mortalidad y las lesiones

abdominales de los ratones tratados al compararlos con un grupo control no tratado. El procedimiento empleado fue el descrito por Toyos (1974) y modificada por Escario (1985).

En total fueron evaluados 9 productos *in vivo* utilizando el modelo de ratón infectado por vía intraperitoneal. De los 9 productos, 6 son productos de síntesis y 3 compuestos ya utilizados como medicamentos con otros usos farmacológicos y que no tienen actividad planteada frente a *T. vaginalis*. De los productos de síntesis ensayados, 2 son indazolinonas, 2 quinoxalinonas y los otros 2 indazoles. Los mejores resultados se obtuvieron con las quinoxalinonas (VA7-67 y VA7-69), no siendo estos comparables a los obtenidos con el metronidazol.

Los tres productos ensayados con otros usos farmacológicos fueron benznidazol, nihidrazona y nitrofenida (Corti y Yampolsky, 2006). Estos tres productos fueron predichos por los diferentes modelos como activos frente a *T. vaginalis*. Los mismos fueron posteriormente evaluados *in vitro* frente a la cepa ATCC JH31 A#4 de este parásito. Teniendo en cuenta los resultados *in silico* e *in vitro* se evaluaron estos tres compuestos en el modelo *in vivo* utilizando ratones NMRI infectados con *T. vaginalis*. El mejor resultado se obtuvo con el benznidazol, el cual mostró un IP similar al metronidazol, incluso con la aplicación de una pauta de tratamiento igual a la del fármaco de referencia. El IP del benznidazol fue menor que el alcanzado por el grupo tratado con metronidazol, aunque no se encontraron diferencias significativas entre ellos. Resultados similares se encontraron con el grupo de ratones donde se aplicaron 4 tratamientos por vía oral con benznidazol, siendo el IP ligeramente superior al del metronidazol. Contrariamente los otros dos compuestos (nihidrazona y nitrofenida) no tuvieron ningún efecto curativo en los ratones infectados.

A pesar de este resultado negativo en dos compuestos, somos del criterio que el procedimiento utilizado de selección virtual y corroboración experimental de aquellos productos con mayores posibilidades de ser activos frente a *T. vaginalis*, es importante para el desarrollo acelerado de nuevos medicamentos. Actualmente en los campos de la bioinformática y síntesis molecular, están surgiendo numerosos proyectos para el estudio y diseño de nuevos agentes terapéuticos que puedan hacer frente a diferentes enfermedades ampliamente extendidas. Por esta vía se pueden obtener resultados positivos a muy corto plazo, si tenemos en cuenta que la cantidad de ensayos es mucho menor que la capacidad de síntesis de nuevos compuestos a nivel mundial (Venkatesh y Lipper, 2000). La aplicación de la tecnología computacional para la síntesis dirigida durante el descubrimiento y desarrollo de nuevos medicamentos ofrece un potencial considerable de la reducción del número de

estudios experimentales requeridos para la selección e identificación de nuevos principios activos (Boobis y col., 2002)

El resultado encontrado con el compuesto benznidazol avala estos procedimientos de búsqueda de nuevos y viejos principios activos con actividad frente a un determinado patógeno. En la bibliografía consultada no se encontró referida la actividad de este medicamento frente a *T. vaginalis* y sí frente a otros parásitos como *Trypanosoma cruzi* (OPS y OMS, 1998). En trabajos recientes realizados por Rolón, (2005), no se le encontró actividad citotóxica frente a cultivos de macrófagos a ninguna de las tres concentraciones ensayadas.

El benznidazol fue desarrollado por Roche en 1974; pero producto de la escasa financiación para la producción y comercialización, a pesar de la alta demanda en 21 países de Latinoamérica, se está realizando una transferencia de tecnología para un pequeño laboratorio público de Brasil. A menudo este fármaco no está incluido en las Listas Nacionales de Medicamentos Esenciales (LNME) a pesar de ser la terapia de una enfermedad endémica en los países de América Latina y de estar incluido en la lista de medicamentos esenciales de la OMS (Uranga y Herranz, 2003).

## 5. CONCLUSIONES

De los resultados presentados y la discusión de los mismos se derivan las siguientes conclusiones:

1. Se logró desarrollar 12 modelos *QSAR* con un adecuado poder predictivo utilizando los índices cuadráticos, lineales y bilineales (tanto totales como locales) no estocásticos y estocásticos basados en las relaciones entre átomo y enlaces, obtenidos mediante el programa *TOMOCOMD-CARDD* que permiten la discriminación de la actividad antiprotozoaria frente a *T. vaginalis*.
2. La actividad *in vitro* frente a *T. vaginalis* de varios compuestos con otros usos farmacológicos fue ensayada, obteniéndose una adecuada concordancia entre los resultados *in silico* y la actividad *in vitro*.
3. Los productos que mostraron mayor actividad *in silico* e *in vitro* fueron evaluados en ensayos *in vivo*, en donde el producto Benznidazol mostró la mejor actividad

## 6. RECOMENDACIONES

En la continuación de la presente investigación es importante se consideren las siguientes recomendaciones:

1. Utilizar otras familias de nuevos descriptores moleculares tridimensionales (3D) implementados computacionalmente en el programa *TOMOCOMD-CARDD* en la modelación de la actividad trichomonocida.
2. Continuar con las evaluaciones de los compuestos que mostraron actividad por los modelos *in silico*.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

### A

Adad, A.J.; Vaz, L.R.; Tannous, E.S.; Gobo, S.M.; Azniv, H.M.; Saldanha, J.C. Frequency of *Trichomonas vaginalis*, *Candida sp.* and *Gardnerella vaginalis* in cervical-vaginal smears in four different decades. *Sao Paulo Med. J.* 2001; 119(6): 200-5.

### B

Boobis, A.; Gundert-Remy, U.; Kremers, P.; Macheras, P.; Pelkonen, O. *In silico* prediction of ADME and pharmacokinetics. Report of an expert meeting organised by COST B15. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2002; 17: 183-93.

Casañola, M.G.; Khan, M.T.H.; Marrero-Ponce, Y.; Ather, A.; Sultankhodzhaev, M. N.; Torrens, F. New tyrosinase inhibitors selected by atomic linear indices-based classification models. *Bioorg. Med. Chem. Letter.* 2006; 16: 324-30.

Castillo-Garit, J. A.; Marrero-Ponce, Y.; Torrens, F. Atom-based 3D-chiral quadratic indices: 2. Prediction of the corticosteroid-binding globulin binding affinity of the thirty-one benchmark steroids data set. *Bioorg. Med. Chem.* 2006; 14: 2398-408.

Corti, M.; Yampolsky, C. Prolonged survival and immune reconstitution after chagasic meningoencephalitis in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2006; 39(1): 85-8.

### D

Diamond, L. The establishment of various Trichomonads of animals and man in axenic cultures. *J. Parasitol.* 1957; 43: 488-90.

Diamond, L.; Cunnick, C.A. Serum-free, partly defined medium PDM-805 for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 and other *Entamoeba*. *J. Protozool.* 1991; 38(3): 211-6.

Díaz, B.O. Evaluación del estado de la técnica sobre el tratamiento de vaginitis. COMPITEC. Oficina Cubana de la Propiedad Industrial. Monografía. La Habana. Cuba. Marzo. 2001.

### E

Egan, M.E.; Lipsky, M. Diagnosis of vaginitis. *Am. Fam. Phy.* 2000; 62: 1095-104.

Estrada, E.; Uriarte, E.; Montero, A.; Teijeira, M.; Santana, L.; De Clercq, E.A. A Novel approach for the virtual screening and rational design of anticancer compounds. *J. Med. Chem.* 2000; 43: 1975.

Estrada, E.; Uriarte, E. Recent advances on the role of topological indices in drug discovery research. *Curr. Med. Chem.* 2001; (13):1573-88.

Escario, J.A. Actividad antiprotozoaria de moléculas de nueva síntesis. Tesis doctoral. Departamento de Parasitología. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. España. 1985.

### F

Fernández, C.A.; Fernández, C.M. El pH vaginal y su importancia clínica. *Ginecol. Obstet. Clín.* 2004; 5(2): 75-80.

## H

Hobbs, M.M.; Kazembe, P.; Reed, A.W.; Miller, W.C.; Nkata, E.; Zimba, D.; Daly, C.C.; Chakraborty, H.; Cohen, M.S.; Hoffman, I. *Trichomonas vaginalis* as a cause of urethritis in Malawian men. *Sex. Transm. Dis.* 1999; 26(7): 388-9.

Hook, E.W. *Trichomonas vaginalis* no longer a minor STD. *Sex. Transm. Dis.* 1999; 26: 288-389.

## L

Lister, N.A.; Smith, A.; Tabrizi, S.N.; Garland, S.; Fairley, C.K. Re-infection of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* infections among men who have sex with men. *Int. J. STD. AIDS.* 2006; 17(6): 415-7.

## M

Marrero-Ponce, Y.; Romero, V. *TOMOCOMD* software. Central University of Las Villas. 2002. *TOMOCOMD* (TOPOlogical MOlecular COMputer Design) for Windows, version 1.0 is a preliminary experimental version; in future a professional version will be obtained upon request to Y. Marrero: [yvanimp@qf.uclv.edu.cu](mailto:yvanimp@qf.uclv.edu.cu); [ymarrero77@yahoo.es](mailto:ymarrero77@yahoo.es)

Marrero-Ponce, Y. Total and local quadratic indices of the molecular pseudograph's atom adjacency matrix: Applications to the prediction of physical properties of organic compounds. *Molecules* 2003; 8: 687-726.

Marrero-Ponce, Y. Linear Indices of the "Molecular Pseudograph's Atom Adjacency Matrix": Definition, significance-interpretation and application to QSAR analysis of flavone derivatives as HIV-1 integrase inhibitors. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 2004a; 44: 2010-26.

Marrero-Ponce, Y. Total and local (atom and atom-type) molecular quadratic indices: Significance-interpretation, comparison to other molecular descriptors and QSPR/QSAR applications. *Bioorg. Med. Chem.* 2004b; 12: 6351-69.

Marrero-Ponce, Y.; Cabrera, M.A.; Romero, V.; Ofori, E.; Montero, L.A. Total and local quadratic indices of the "Molecular Pseudograph's Atom Adjacency Matrix". Application to prediction of caco-2 permeability of drugs. *Int. J. Mol. Sci.* 2003; 4: 512-36.

Marrero-Ponce, Y.; Castillo-Garit, J.A.; Olazábal, E.; Serrano, H.Z.; Morales, A.; Castañedo, N.; Ibarra-Velarde, F.; Huesca-Guillen, A.; Jorge, E.; del Valle, A.; Torrens, F.; Castro, E. *TOMOCOMD-CARDD*, a novel approach for computer-aided "rational" drug design: I. Theoretical and experimental assessment of a promising method for computational screening and *in silico* design of new anthelmintic compounds. *J. Comput. Aided Mol. Des.* 2004a; 18: 615-33.

Marrero-Ponce, Y.; González-Díaz, H.; Romero-Zaldivar, V.; Torrens, F.; Castro, E. 3D-Chiral quadratic indices of the "Molecular Pseudograph's Atom Adjacency Matrix" and their application to central chirality codification: Classification of ACE inhibitors and prediction of  $\sigma$ -receptor antagonist activities. *Bioorg. Med. Chem.* 2004b; 12: 5331-42.

- Marrero-Ponce, Y.; Cabrera, M.A.; Romero, V.; González, D.H.; Torrens, F. A new topological descriptors based model for predicting intestinal epithelial transport of drugs in caco-2 cell culture. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 2004c; 7: 186-99.
- Marrero-Ponce, Y.; Castillo-Garit, J.A.; Torrens, F.; Romero-Zaldivar, V.; Castro, E. Atom, atom-type and total linear indices of the “Molecular Pseudograph’s Atom Adjacency Matrix”: Application to QSPR/QSAR studies of organic compounds. *Molecules* 2004d; 9: 1100-23.
- Marrero-Ponce, Y.; Nodarse, D.; González-Díaz, H.; Ramos de Armas, R.; Romero-Zaldivar, V.; Torrens, F.; Castro, E. Nucleic acid quadratic indices of the “Macromolecular Graph’s Nucleotides Adjacency Matrix”. Modeling of footprints after the interaction of paromomycin with the HIV-1  $\Psi$ -RNA packaging region. *Int. J. Mol. Sci.* 2004e; 5: 276-93.
- Marrero-Ponce, Y.; Medina, R.; Castro, E.; de Armas, R.; González, H.; Romero, V.; Torrens, F. Protein quadratic indices of the “Macromolecular Pseudograph’s  $\alpha$ -Carbon Atom Adjacency Matrix”. 1. Prediction of arc repressor alanine-mutant’s stability. *Molecules* 2004f; 9: 1124-47.
- Marrero-Ponce, Y.; Castillo-Garit, J.A.; Olazábal, E.; Serrano, H.Z.; Morales, A.; Castañedo, N.; Ibarra-Velarde, F.; Huesca-Guillen, A.; Jorge, E.; Sánchez, A. M.; Torrens, F.; Castro, E. Atom, atom-type and total molecular linear indices as a promising approach for bioorganic and medicinal chemistry: theoretical and experimental assessment of a novel method for virtual screening and rational design of new lead anthelmintic. *Bioorg. Med. Chem.* 2005a; 13: 1005-20.
- Marrero-Ponce, Y.; Iyarreta, M.; Montero, A.; Romero, C.; Brandt, C.A.; Avila, P.E.; Kirchgatter, K. A.; Machado, Y. Ligand-based virtual screening and *in silico* design of new antimalarial compounds using non-stochastic and stochastic total and atom-type quadratic maps. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 2005b; 45: 1082-100.
- Marrero-Ponce, Y.; Machado, Y.; Montero, D.; Escario, J.A.; Nogal, J.J.; Ochoa, C.; Arán, V.J.; Martínez-Fernández, A.R., García, R.N.; Montero, A.; Torrens, F.; Meneses, A. A computer-based approach to the rational discovery of new trichomonacidal drugs by atom-type linear indices. *Curr. Drug Discov. Technol.* 2005c; 2(4): 245-65.
- Marrero-Ponce, Y.; Huesca-Guillen, A.; Ibarra-Velarde, F. Quadratic indices of the “Molecular Pseudograph’s Atom Adjacency Matrix” and their stochastic forms: A novel approach for virtual screening and *in silico* discovery of new lead paramphistomicide drugs-like compounds. *J. Theor. Chem. (Theochem)* 2005d; 717: 67-79.
- Marrero-Ponce, Y.; Montero, A.; Romero-Zaldivar, C.; Iyarreta-Veitía, I.; Mayón P.M.; García, R. Non-stochastic and stochastic linear indices of the “Molecular Pseudograph’s Atom Adjacency Matrix”: Application to “*in silico*” studies for the rational discovery of new antimalarial compounds. *Bioorg. Med. Chem.* 2005e; 13: 1293-304.
- Marrero-Ponce, Y.; Medina, R.; Torrens, F.; Martínez, Y.; Romero-Zaldivar, V.; Castro, E.A. Atom, atom-type, and total non-stochastic and stochastic quadratic fingerprints: A promising approach for modeling of antibacterial activity. *Bioorg. Med. Chem.* 2005f; 13: 2881-99.
- Marrero-Ponce, Y.; Medina, R.; Castillo-Garit, J.A.; Romero-Zaldivar, V.; Torrens, F.; Castro, E.A. Protein linear indices of the “Macromolecular Pseudograph’s  $\alpha$ -Carbon Atom Adjacency Matrix”



- in bioinformatics. Part 1. Prediction of protein stability effects of a complete set of alanine substitutions in arc repressor. *Bioorg. Med. Chem.* 2005g, 13: 3003-15.
- Marrero-Ponce, Y.; Castillo-Garit, J.A.; Nodarse, D. Linear indices of the “Macromolecular Graph’s Nucleotides Adjacency Matrix” as a promising approach for bioinformatics studies. 1. Prediction of paromomycin’s affinity constant with HIV-1  $\Psi$ -RNA packaging region. *Bioorg. Med. Chem.* 2005h; 13: 3397-404.
- Marrero-Ponce, Y.; Cabrera, M.A.; Romero-Zaldivar, V.; Bermejo, M.; Siverio, D.; Torrens, F. Prediction of intestinal epithelial transport of drug in (caco-2) cell culture from molecular structure using ‘*in silico*’ approaches during early drug discovery. *Internet Electronic J. Mol. Des.* 2005i; 4: 124-50.
- Marrero-Ponce, Y.; Medina, R.; Martinez, Y.; Torrens, F.; Romero-Zaldivar, V.; Castro, E.A. Non-stochastic and stochastic linear indices of the molecular pseudograph’s atom adjacency matrix: A novel approach for computational -*in silico*- screening and “rational” selection of new lead antibacterial agents. *J. Mol. Mod.* 2006; 12: 255–71.
- Marrero-Ponce, Y.; Khan, M.T.H.; Casañola-Martin, G.M.; Ather, A.; Sultankhodzhaev, M.N.; Torrens, F. Atom-based 2D quadratic indices in drug discovery of novel tyrosinase inhibitors. Results of *in silico* studies supported by experimental results. *QSAR Comb. Sci.* 2006. Aceptado para su publicación.
- Marrero-Ponce, Y.; Meneses, A.; Machado, Y.; Escario, J. A.; Gómez-Barrio, A.; Montero, D.; Nogal, J. J.; Arán, V. J.; Martínez-Fernández, A.R.; Torrens, F.; Rotondo, R. Predicting antitrichomonal activity: A computational screening using atom-based bilinear indices and experimental proofs. *Bioorg. Med. Chem.* 2006. Aceptado para su publicación.
- Marrero-Ponce, Y.; Torrens, F. Bond-based global and local (bond and bond-type) quadratic indices and their applications to computer-aided molecular design. 1. QSPR studies of octane isomers. *J. Comput. Aided Mol. Des.* 2006. Aceptado para su publicación.
- Marrero-Ponce, Y.; Torrens, F. Bond, bond-type, and total linear indices of the non-stochastic and stochastic edge adjacency matrix. 1. Theory and QSPR studies. *J. Phy. Chem.* Sometido para su publicación.
- Marrero-Ponce, Y.; Torrens, F. Bond-extended non-stochastic and stochastic bilinear indices. 1. QSPR applications to the description of physicochemical properties of octane isomers. *J. Theor. Chem. (THEOCHEM)*. Sometido para su publicación.
- Marrero-Ponce, Y.; Khan, M.T.H.; Casañola-Martin, G.M.; Ather, A.; Sultankhodzhaev, M.N.; Torrens, F.; Rotondo, R. TOMOCOMD-CARDD descriptors-based virtual screening of tyrosinase inhibitors. 1. Evaluation of different classification model combinations using group, atom-type and total bilinear indices. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* Sometido para su publicación.
- Meneses, A.; Marrero-Ponce, Y.; Machado, Y.; Montero, A.; Montero, D.; Escario, J.A.; Nogal, J.J.; Ochoa, C.; Arán, V.J.; Martínez-Fernández, A.R., García, R.N. A linear discrimination analysis based virtual screening of trichomonacidal lead-like compounds. Outcomes of *in silico* studies supported by experimental results. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2005; 17: 3838-43.

Montero, A.; Vega, M.C.; Marrero-Ponce, Y.; Rolón, M.; Gómez-Barrio, A.; Escario, J.A.; Arán, V.J.; Martínez-Fernández, A.R.; Meneses, A. A novel non-stochastic quadratic fingerprints-based approach for the “*in silico*” discovery of new antitrypanosomal compounds. *Bioorg. Med. Chem.* 2005; 13: 6264–75.

Montero, A.; García, R.N.; Marrero-Ponce, Y.; Machado, Y.; Nogal, J.J.; Martínez-Fernández, A.R.; Arán, V.J.; Ochoa, C.; Meneses, A.; Torrens, F. Non-stochastic quadratic fingerprints and LDA-based QSAR models in hit and lead generation through virtual screening: Theoretical and experimental assessment of a promising method for the discovery of new antimalarial compounds. *Eur. J. Med. Chem.* 2006; 41: 483–93.

Mosqueira, T.A. Fundamentos del Diseño de Medicamentos. (Monografía). Ed. Farmaindustria. 1994.

## N

Nanda, N.; Michel, R.G.; Kurdgelashvili, G.; Wendel, K.A. Trichomoniasis and its treatment. *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.* 2006; 4(1): 125-35.

Nogal, J.J. Modelo experimental de *Trichomonas vaginalis*: Estudio de quimiosensibilidad, patogenia e inmunomodulación. Tesis doctoral. Departamento de Parasitología. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. 1999. España. Disponible en: URL: <http://www.ucm.es/eprints/3865/>

## O

Organización Mundial de la Salud. (OMS). Salud sexual y reproductiva. Washington, DC. OPS.OMS. 1995. Comunicación para la salud (8): 17-8.

Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud (OPS/OMS). Tratamiento etiológico de la enfermedad de Chagas. OPS/HCP/HCT/140/99. Conclusiones de una consulta técnica. Fundación Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil. 23-25 de abril de 1998. <http://www.paho.org/Spanish/AD/DPC/CD/chagas.pdf>.

## P

Petrin, D.; Delgaty, K.; Bhatt, R.; Garber, G. Clinical and Microbiological Aspects of *Trichomonas vaginalis*. *Clin. Microbiol. Rev.* 1998; 11: 300-17.

## R

Rein, M.F. Trichomoniasis. En: Goldsmith, R.; Heyneman, D., editores. *Parasitología y Medicina Tropical*. 1<sup>ra</sup> ed. México-Santafé de Bogotá: El Manual Moderno; 1995.

Rolón, M. Aplicación del ensayo de resaruzina al cribado farmacológico sobre *Trypanosoma cruzi*. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. 2005.

## S

Seifert, M.; Wolf, K.; Vitt, D. Virtual high-throughout *in silico* screening. *Biosilico*. 2003; 1(4): 143-9.

## T

Tollman, P.A. Revolution in R&D. How genomic and genetics are transforming the biopharmaceutical industry. The Boston Consulting Group. 2001.

Townson, S.M.; Boreham, P.F.L.; Upcroft, P.; Upcroft, J.A. Resistance to the nitroheterocyclic drugs.

## U

Upcroft, J.A.; Dunn, L.A.; Wright, J.M.; Benakli, K.; Upcroft, P.; Vanelle, P. 5-Nitroimidazole drugs effective against metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis* and *Giardia duodenalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006; 50(1): 344-7.

## V

Vázquez, F.; García, M.J.; Pérez, F.; Palacio, V. *Trichomonas vaginalis*: tratamiento y resistencia a nitroimidazoles. *Enf. Inf. Microbiol. Clin.* 2001; 19(3): 114-24.

Vega, M.C. *Trypanosoma cruzi*: Nuevos métodos colorimétricos de criado y alternativas terapéuticas. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. 2005.

Vega, M.C.; Montero, A.; Marrero-Ponce, Y.; Rolón, M.; Gómez-Barrio, A.; Escario, J.A.; Arán, V.J.; Nogal, J.J.; Meneses, A.; Torrens, F. New ligand-based approach for the discovery of antitrypanosomal compounds. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2006. 16: 1898-904.

Vega, R.; Guerra, I. Evaluación del potencial irritante dérmico del G-1 0,15% ungüento. Queratofural. Ciudad de La Habana: Registro de medicamentos de uso Veterinario; 1993. Serie de Informes Técnicos: 211.

Vega, R.; Guerra, I. Evaluación del potencial irritante dérmico del Dermofural 0,15% ungüento. Informe técnico. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM). C. de La Habana. Cuba. 1999.

Venkatesh, S.; Lipper, R.A. Role of the development scientist in compound lead selection and optimization. *J. Pharm. Sci.* 2000; 89(2): 145-54.