

# UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Parasitología



## TESIS DOCTORAL

**Tamizaje farmacológico en la búsqueda de potenciales fármacos antimaláricos integrando nuevos modelos *in silico* y corroboración experimental**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Yanetsy Machado Tugores**

Directores

Alicia Gómez Barrio  
Alfredo Meneses Marcel  
Yovani Marrero Ponce

**Madrid, 2014**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE FARMACIA**  
**Departamento de Parasitología**



**Tamizaje farmacológico en la búsqueda de  
potenciales fármacos antimaláricos integrando  
nuevos modelos *in silico* y corroboración  
experimental**

***MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR***  
***Presentada por***

**Yanetsy Machado Tugores**

***Directores***

**Dra. D<sup>a</sup> Alicia Gómez Barrio**

**Dr. Alfredo Meneses Marcel**

**Dr. Yovani Marrero Ponce**

**Madrid, 2013**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE FARMACIA**  
**Departamento de Parasitología**

**Tamizaje farmacológico en la búsqueda de  
potenciales fármacos antimaláricos  
integrando nuevos modelos *in silico* y  
corroboración experimental**



**TESIS DOCTORAL**

**Yanetsy Machado Tugores**

**MADRID 2013**

*"Quien no haya experimentado la irresistible atracción de la ciencia, no  
podrá comprender su tiranía"*

Mary Wollstonecraft Shelley

# *Dedicatoria*

---

*A mi hija Lorena que ha sido mi inspiración.*

*A mis padres sin los que hubiera sido imposible este trabajo.*

*A todos los que confiaron en mí.*

# *Agradecimientos*

---

*Durante estos años he contado con el apoyo, la confianza y la amistad de muchas personas, sin las que no hubiera sido posible alcanzar esta meta.*

A mi director **Alfredo Meneses Marcel** por animarme cada vez que lo necesitaba, por ser guía y ejemplo...por su amistad.

A mi director **Yovani Marrero Ponce** por su optimismo, intransigencia, sabiduría y alegría.

A mi directora **Alicia Gómez Barrio** por su apoyo, confianza, valiosos y oportunos consejos.

A **José Antonio Escario** por recibirme en su laboratorio, brindarme su apoyo y confianza y abrir las puertas para la colaboración entre nuestros Centros.

A mis chicas, **Alexandra (Sandra) y Cristina (Kis)** que han sido mi apoyo emocional, mi compañía más preciada, mis confidentes y cómplices. Quiero agradecer la alegría que me transmitieron día a día, por ayudarme a levantarme en cada uno de mis tropiezos; simplemente por hacerme sentir que el laboratorio era el sitio donde quería estar todos los días y transformar el trabajo en placer.

A **Vega, Juan, Patri, Pablito y todos los chicos del departamento**, por su amistad, compañía, palabras de ánimo y sus risas.

A **Jorge** por ofrecer su colaboración en la obtención de resultados.

A **Juanjo y Mercedes** por el aporte de sus valiosas muestras de sangre, consejos, tiempo y su amistad.

A **Juan García y Paco Ponce** por los cafés, buen humor y caballerosidad.

A **Ines y Manoli**, por su alegría y amabilidad.

A **Judit** por su risa y atenciones.

A **Javier** por su alegría y capacidad para solucionar problemas.

A **Rory** por enseñarme a trabajar con *Plasmodium*, brindarme su experiencia y amistad.

A **Vicente Arán** por sus valiosos consejos, sabiduría y simpatía.

A todos los **compañeros de departamento**, con los que he compartido el día a día y de los que, por supuesto, he aprendido. A **Maruxi, Paco Bolás, Carmen, Marta, Katina**.

A **MIS PADRES** por estar siempre cubriéndome las espaldas, cuidar de mi hija en mi ausencia, animarme y confiar en mí, por todos los valores que me han enseñado y que me han hecho crecer.

A **MI NIÑA**, mi princesa, por creer en mí a pesar de sus pocos años, entender que este logro es importante para las dos y por no dejar de repetirme que está orgullosa de mí.

A todos mis **compañeros del Centro de Bioactivos Químicos**, que no puedo nombrar porque son muchos y todos muy queridos. A todos muchas gracias...

A **tí**...

# *Abreviaturas*

---

## ABREVIATURAS

---

2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
5HT2B	Receptores triptamina D
GPI	Glucosil-fosfatidil-inositol
AC	Análisis de clúster
ADL	Análisis discriminante lineal
ADME	Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AM	Antimalárico
ARN	Ácido ribonucleico
BD	Base de datos
$b_k(x,y)/b_{kl}(x,y)$	$k$ -ésimo Índice bilineal total/local de la matriz de adyacencia entre vértices de un pseudografo molecular
<b>C</b>	Coefficiente de correlación de Matthews
<b>CARDD</b>	<i>Computational-Aided Rational Drug Design</i>
CQ	Cloroquina
CV	Cribado virtual
CVBL	Cribado virtual basado en ligando
DHFR	Dihidrofolato reductasa
DHODH	Dihidroorotato deshidrogenasa
DM	Descriptor molecular
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOXP	1- deoxi-D-xilulosa 5-fosfato
DP	Perfil de decisión
DPHS	Dihidropterato sintetasa
E	Electronegatividad en la escala de Pauling
FDA	Agencia de Alimentos y Medicamentos del gobierno de los Estados Unidos
$f_k(x)/f_{kl}(x)$	$k$ -ésimo Índice lineal total/local de la matriz de adyacencia entre vértices de un pseudografo molecular
G6PD	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
Gral NS-SS	Índices General estocásticos- no estocásticos
GSK	GlaxoSmithKline
Hb	Hemoglobina
HRP-2	Proteína rica en histidina 2 ( <i>Histidine Rich Protein</i> )
HTS	Cribados automatizados de alto rendimiento ( <i>Automated high-throughput screening</i> )
IB	Índices bilineales

---

## ABREVIATURAS

---

IBNS-Gral	Índices bilineales no estocásticos General
IBNS-MK	Índices bilineales no estocásticos de Masa atómica-Electronegatividad en la escala de Mulliken
IBNS-MP	Índices bilineales no estocásticos de Masa atómica-Polarizabilidad
IBNS-MV	Índices bilineales no estocásticos de Masa atómica-Volumen de van der Waals
IBNS-PK	Índices bilineales no estocásticos Polarizabilidad- Electronegatividad en la escala de Mulliken
IBNS-PV	Índices bilineales no estocásticos de Polarizabilidad-Volumen de van der Waals
IBNS-VK	Índices bilineales no estocásticos de Volumen de van der Waals-Electronegatividad en la escala de Mulliken
IBSS-Gral	Índices bilineales estocásticos General
IBSS-MK	Índices bilineales estocásticos de Masa atómica-Electronegatividad en la escala de Mulliken
IBSS-MP	Índices bilineales estocásticos de Masa atómica-Polarizabilidad
IBSS-MV	Índices bilineales estocásticos de Masa atómica-Volumen de van der Waals
IBSS-PK	Índices bilineales estocásticos Polarizabilidad- Electronegatividad en la escala de Mulliken
IBSS-PV	Índices bilineales estocásticos de Polarizabilidad-Volumen de van der waals
IBSS-VK	Índices bilineales estocásticos de Volumen de van der Waals-Electronegatividad en la escala de Mulliken
IC <sub>50</sub>	Concentración Inhibitoria 50
IL	Índices lineales
ILNS-Gral	Índices lineales no estocásticos General
ILNS-K	Índices lineales no estocásticos de Electronegatividad en la escala de Mulliken
ILNS-M	Índices lineales no estocásticos de Masa atómica
ILNS-P	Índices lineales no estocásticos de Polarizabilidad
ILNS-V	Índices lineales no estocásticos de Volumen de van der Waals
ILSS-Gral	Índices lineales estocásticos General
ILSS-K	Índices lineales estocásticos de Electronegatividad en la escala de Mulliken
ILSS-M	Índices lineales estocásticos de Masa atómica
ILSS-P	Índices lineales estocásticos de Polarizabilidad
ILSS-V	Índices lineales estocásticos de Volumen de van der Waals
INS-Gral	Índices General no estocásticos
IQ	Índices cuadráticos
IQNS-Gral	Índices cuadráticos no estocásticos General
IQNS-K	Índices cuadráticos no estocásticos de Electronegatividad en la escala de Mulliken

---

## ABREVIATURAS

---

IQNS-M	Índices cuadráticos no estocásticos de Masa atómica
IQNS-P	Índices cuadráticos no estocásticos de Polarizabilidad
IQNS-V	Índices cuadráticos no estocásticos de Volumen de van der Waals
IQSS-Gral	Índices cuadráticos estocásticos General
IQSS-K	Índices cuadráticos estocásticos de Electronegatividad en la escala de Mulliken
IQSS-M	Índices cuadráticos estocásticos de Masa atómica
IQSS-P	Índices cuadráticos estocásticos de Polarizabilidad
IQSS-V	Índices cuadráticos estocásticos de Volumen de van der Waal
ISS-Gral	Índices General estocásticos
K	Electronegatividad en la escala de Mulliken
KAHRP	<i>knob</i> -proteínas ricas en histidina ( <i>knob-associated histidine rich protein</i> )
<i>k</i> -MCA	Análisis de clúster de <i>k</i> -Medias
<i>k</i> -NNCA	Algoritmo de clúster de <i>k</i> -Vecinos más Próximos
LGO	<i>Leave Group Out</i> (Dejar-grupos-fuera)
<i>LogP</i>	Coefficiente de partición octanol/agua
<i>logS</i>	Solubilidad acuosa
$M_i$	Modelo de clasificador <i>i</i>
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
<i>MW</i>	Peso molecular
NAC	Naranja de acridina NAC
<i>nHBAC</i>	Número de aceptores de puente de hidrógeno
<i>nHBDON</i>	Número de dadores de puente de hidrógeno
<i>nRotB</i>	Número de enlaces rotables
OCDE	Organización para Desarrollo y Cooperación Económica
OMS	Organización Mundial de la Salud
P	Polarizabilidad atómica
PBS	Tampón fosfato salino ( <i>Phosphate buffered saline</i> )
PDR	Pruebas de diagnóstico rápido
<i>PfEMP-1</i>	Proteína 1 de la membrana del eritrocito de <i>P. falciparum</i> ( <i>P. falciparum</i> erythrocyte membrane protein 1)
<i>PfNDH2</i>	NADH quinona oxidoreductasa de <i>P. falciparum</i>
PIB	Producto interno bruto
pLDH	Lactato deshidrogenasa de <i>Plasmodium</i>
Plm I	Plasmepsina I
Plm II	Plasmepsina II
PP	Promedio de las probabilidades
PSA	Área superficie polar
<i>Q</i>	Exactitud total
$q_{k(x)}/q_{kl(x)}$	<i>k</i> -ésimo Índice cuadrático total/local de la matriz de adyacencia entre vértices de un pseudografo molecular

---

## ABREVIATURAS

---

QSAR	<i>Quantitative Structure Activity Relationships</i>
RFA	Razón de falsa alarma
Ro5	Regla de los cinco de Lipinski
SE	Serie de entrenamiento
Sens	Sensibilidad
SMC	Sistema multclasificador
SP	Serie de predicción
Spec	Especificidad
TCA	Terapias combinadas con Artemisina
TNF- $\alpha$	Factor de Necrosis Tumoral $\alpha$
<b><i>TOMOCOMD</i></b>	<i>TOpological MOlecular COMputer Design</i>
V	Volumen de van der Waals
VC	Validación cruzada

---

# *Resumen*

---

## RESUMEN

La malaria es un problema de salud pública en más de 90 países, habitados por un total de 2.400 millones de personas que representa el 40% de la población mundial. Las cifras de prevalencia y mortalidad de la malaria superan las de cualquier otra enfermedad transmisible, existiendo una urgente necesidad de descubrir nuevas alternativas terapéuticas para su tratamiento. La presente Tesis está orientada a la búsqueda de nuevos compuestos antimaláricos, para lo cual se propone una estrategia de trabajo, que incluye modelos *in silico* para el cribado computacional de bases de datos, así como la posterior corroboración *in vitro* de la actividad predicha. El protocolo de cribado virtual diseñado está constituido por diferentes filtros computacionales, en los que inicialmente se utilizan filtros *drug likeness* con el fin de optimizar simultáneamente la potencia y la farmacocinética de los compuestos. En segundo lugar, se pudiera emplear un filtro de similitud molecular, que permite enfocar la biblioteca recuperada, a las estructuras de los fármacos usados como referencia. A continuación, se obtienen nuevos modelos matemáticos **QSAR** utilizando descriptores moleculares **TOMOCOMD-CARDD** y la técnica de Análisis Discriminante Lineal. Estos modelos se utilizan por primera vez en la confección de sistemas multclasificadores, cuya ventaja es una mayor exactitud en la identificación virtual de compuestos antimaláricos. Posteriormente se lleva a cabo una validación externa con una base de datos de 13.410 compuestos con actividad antimalárica (GlaxoSmithKline), lográndose una exactitud en la predicción del 91,73%. Según la metodología propuesta, el paso final consiste en efectuar un análisis de clúster, seleccionando compuestos según la diversidad estructural. Utilizando el protocolo propuesto se cribaron 24.938 compuestos de diferentes colecciones y se seleccionaron 37 *hit virtuales*, que fueron evaluados *in vitro* frente a *Plasmodium falciparum* para la determinación de su actividad. Se identificaron 12 compuestos con actividad *in vitro* frente a las dos cepas utilizadas (3D7 y Dd2), que no mostraron actividad citotóxica a la mayor concentración evaluada (50  $\mu\text{M}$ ) en el ensayo de citotoxicidad inespecífica frente a macrófagos. En el ensayo del test de inhibición de la biomineralización de la ferriprotoporfirina IX, solo un compuesto mostró actividad significativa y dos presentaron actividad moderada. La estrategia de cribado farmacológico propuesta resulta satisfactoria, pudiendo ser utilizada por cualquier institución nacional o internacional interesada en la búsqueda de nuevos fármacos antimaláricos.

## ABSTRACT

Malaria remains a serious public health problem in more than 90 countries, with a total of 2.400 million inhabitants, representing 40% of the world's population. The prevalence and mortality incidence exceed those of any other transmissible disease. These data reflects the urgent need for searching new therapeutic alternatives for treatment, as available drugs show limited benefits and high levels of resistance. Virtual screening has recently become a useful complement to experimental high-throughput screening for large libraries of compounds. The main aim of this thesis has been the search for new antimalarial compounds, showing a new strategy work, including *in silico* models for computational screening of database, with subsequent *in vitro* corroboration of the predicted activity. According to the proposed methodology, new mathematical models using *TOMOCOMD-CARDD* molecular descriptors have been obtained and subsequently validated. The virtual screening protocol designed is constituted by different computational filters. The first *drug likeness* filter optimizes the potency and pharmacokinetics simultaneously. Then, QSAR/ADL studies are performed for the development of multi-classifier systems enabling the virtual identification of antimalarial compounds. In this way, an external validation of a 13.410 antimalarial compounds database (GlaxoSmithKline) was carried out, achieving a prediction accuracy of 91.73%. According to the current methodology, an additional filter based on molecular similarity can be used in virtual screening process for obtaining the final cluster analysis. According to the described protocol, 24.938 compounds were screened and 37 virtual hit were detected and subsequently ~~which were~~ evaluated *in vitro* against *P. falciparum* to determine its activity. Only 12 compounds showed *in vitro* activity against the two strains tested (3D7 y Dd2). No cytotoxic activity was observed at the highest concentration tested (50 uM) in unspecific cytotoxicity assay against macrophages. The ferriprotoporphyrin (FP) IX biocrystallization inhibition test (FBIT) was also performed. Only one compound showed significant activity and two molecules moderate activity. The current results suggest the usefulness of the pharmacological screening strategy proposed in this research for the identification of new antimalarial compounds. In this sense, this methodology could be used by any national or international institution interested in the search for new antimalarial drugs.

# Índice

---

---

## ÍNDICE

---

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>Problema científico</b>	1
<b>Hipótesis</b>	4
<b>Objetivo General</b>	4
<b>Objetivos específicos</b>	4
<b>2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	6
<b>2.1. Malaria</b>	6
<b>2.1.1. Historia de la enfermedad</b>	6
<b>2.1.2. Etiología</b>	7
<b>2.1.3. Epidemiología</b>	8
<b>2.1.4. Impacto económico de la Malaria</b>	10
<b>2.1.5. Morfología del parásito</b>	11
<b>2.1.6. Ciclo biológico</b>	12
<b>2.1.7. Invasión celular. Cambios en la membrana del eritrocito infectado</b>	14
<b>2.1.8. Fisiopatología del paludismo</b>	16
<b>2.1.9. Clínica del paludismo</b>	17
Receptores de membrana en eritrocitos	17
Tipos de Hb	17
Deficiencias enzimáticas	18
Paludismo no complicado	18
Paludismo grave o complicado	19
Paludismo y embarazo	19
Paludismo en la infancia	19
<b>2.1.10. Historia de los fármacos antipalúdicos</b>	20
<b>2.1.11. Tratamiento</b>	21
Clasificación de los fármacos antipalúdicos	21
Fármacos antimaláricos de uso tradicional	22
Nuevas estrategias y perspectivas en el desarrollo de antimaláricos	29
<b>2.1.12. Resistencia a fármacos antipalúdicos</b>	32
<b>2.2. Métodos <i>in silico</i> para cribado de fármacos</b>	34
<b>2.2.1. Cribado virtual basado en ligandos (CVBL)</b>	35
Filtros <i>drug-likeness</i>	35
Búsqueda de similitud	36
Estudios de Relaciones Cuantitativas Estructura-Actividad (QSAR, por sus siglas en inglés, <i>Quantitative Structure-Activity Relationships</i> )	37
Regulaciones de los métodos QSAR	38
Técnicas de clasificación	38
Sistemas de multclasificadores (SMC)	39
<b>2.2.3. Análisis de conglomerados (AC)</b>	40
<b>2.2.4. Cribado virtual en el desarrollo de antimaláricos</b>	41

---

---

2.3. Técnicas de cribado <i>in vitro</i> frente a <i>Plasmodium</i>	42
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	45
3.1. Método <i>in silico</i>	45
3.1.1 Construcción de la base de datos	45
3.1.2. Cálculos de descriptores moleculares	45
3.1.3. Diseño de series de entrenamiento y predicción	46
3.1.4. Desarrollo y validación de los modelos QSAR	46
3.1.5. Sistemas multclasificadores-ensamblados-basados en modelos QSAR	48
3.2. Protocolo de CVBL integrado por diferentes filtros	51
3.2.1 Filtros <i>drug-likeness</i>	53
3.2.2. Búsqueda de similitud molecular	53
3.2.3. Estudio QSAR/ADL	54
3.2.4. Análisis de clúster y selección final por diversidad molecular	54
3.3. Métodos <i>in vitro</i>	54
3.3.1. Evaluación de la actividad antimalárica. Microtest <i>in vitro</i> basado en fluorescencia	55
3.3.2. Citotoxicidad inespecífica en macrófagos	56
3.3.3. Evaluación de la actividad antimalárica <i>in vitro</i> en el test de inhibición de la biomineralización de la FPIX (FBIT)	57
<b>4. RESULTADOS</b>	59
4.1. Introducción	59
4.2. Métodos <i>in silico</i>	59
4.3 Protocolo CVBL integrado por diferentes filtros	67
4.4. Métodos <i>in vitro</i>	69
<b>5. DISCUSION</b>	73
5.1 Métodos <i>in silico</i>	73
5.2. Protocolo de CVBL para la identificación de AMs a partir de bases de datos	80
5.3 Métodos <i>in vitro</i>	82
<b>6. CONCLUSIONES</b>	89
<b>7. RECOMENDACIONES</b>	91
<b>8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	92
<b>ANEXOS</b>	

---

# *Introducción y Objetivos*

---

## 1. INTRODUCCIÓN

"Detrás de las estadísticas y gráficas se esconde una tragedia grande e innecesaria: la Malaria, una enfermedad completamente prevenible y tratable, todavía arrebatada la vida de un niño africano cada minuto" (World Malaria Report: 2012).

Dentro de las enfermedades parasitarias, el paludismo o malaria es la más importante si tenemos en cuenta el número de individuos que enferman anualmente y su impacto socioeconómico [1]. La prevalencia se estima en unos 300-500 millones de casos clínicos y la mortalidad en 1-2 millones de personas anuales [2], cifras que superan las de cualquier otra enfermedad transmisible [1]. La malaria es una enfermedad infecciosa, producida por un protozoo intracelular del género *Plasmodium*. Existen 5 especies que pueden infectar al hombre, *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* y, recientemente, se ha descubierto que *P. knowlesi* (originario de los primates), puede infectar también a humanos, especialmente en la zona de Malasia y Borneo [3, 4]. Durante la pasada década, las inversiones realizadas en la prevención y control de esta enfermedad han tenido un impulso sin precedentes que han salvado más de un millón de vidas. Sin embargo, todavía existe transmisión de malaria en 99 países y solamente en 2010, la enfermedad causó un estimado de 655.000 muertes en África Subsahariana, principalmente en niños menores de cinco años de edad [5].

Los parásitos se transmiten por la picadura de la hembra del mosquito *Anopheles* y la forma más frecuente y grave de la enfermedad se debe a *P. falciparum*. De forma general, las manifestaciones clínicas consisten en escalofríos y palidez cutánea, que se alterna con sensación de calor y rubefacción cutánea, sequedad e hipertermia. Frecuentemente, el paroxismo febril se acompaña de cefalea, mialgias, hepatoesplenomegalia y anemia [6]. La infección por *P. falciparum* puede complicarse con un cuadro de malaria grave, caracterizada por una anemia importante (hematocrito <20%), hiperparasitemia (>5%), hipoglucemia, afectación renal, afectación cerebral con alteración de la conciencia y coma [6]. Las infecciones causadas por otras especies cursan de forma más leve, además *P. vivax* y *P. ovale*, pueden originar formas latentes en el hígado, hipnozoitos, responsables de recidivas al abandonar la zona endémica. En el caso de *P. malariae*, puede originar episodios febriles muchos años más tarde y asociarse a un síndrome nefrótico [3].

La transmisión de la malaria varía entre regiones, incluso en un mismo país; depende de la especie del parásito, sus propiedades y las de los vectores, las condiciones ecológicas que intervienen en la transmisión de la parasitosis y factores socioeconómicos [5]. La diversidad genética le confiere a *Plasmodium* la capacidad para evadir la respuesta inmune del hospedador y producir variantes resistentes a medicamentos y vacunas, siendo esto en gran parte, responsable del éxito de la supervivencia de este parásito en la historia evolutiva, así como del fracaso de las medidas empleadas con el objetivo de erradicarlo [7].

El tratamiento ha sido posible durante muchos años gracias a la existencia de un número restringido de fármacos presentando cada uno de ellos una serie de limitaciones de tipo farmacológico, aunque el mayor problema es la aparición de resistencias [8]. Los fármacos de mayor utilización como la cloroquina (CQ) y la asociación de sulfadoxina + pirimetamina presentan beneficios limitados y en determinados casos son de una eficacia cuestionable debido a los fenómenos de resistencia [9-11]. Se han descubierto indicios de resistencia también a las artemisininas en cuatro países de la subregión del Gran Mekong: Camboya, Myanmar, Tailandia y Vietnam [5]. Todo esto pone de manifiesto la imperiosa necesidad mundial de desarrollar nuevos antimaláricos (AMs) y el importante desafío que supone esta empresa [3].

Así mismo el desarrollo y lanzamiento de un nuevo fármaco al mercado requiere a la industria farmacéutica una media de 12 años, pudiendo llegar a 20, y unos costes de aproximadamente 850 millones de euros [12]. En la actualidad se han realizado grandes esfuerzos para lograr más eficiencia en la selección de compuestos antimaláricos. Tal es el caso de la utilización de cribados automatizados de alto rendimiento (HTS, por sus siglas en inglés) sobre la colección de productos de GlaxoSmithKline (GSK), a través de los cuales se han identificado más de 13.000 compuestos activos en cepas de *P. falciparum* [13]. Estos resultados son solamente la punta del "iceberg" y requieren inversiones sustanciales para que esto consolide [14], ya que muchos de los compuestos analizados pueden no tener las condiciones necesarias para llegar a ser fármacos.

El descubrimiento de nuevos usos para fármacos ya existentes, conocido como "*drug repositioning*" o reutilización, ha aumentado su popularidad en los últimos años sobre todo para las compañías farmacéuticas, ya que se extiende a los mercados para un compuesto con un menor riesgo financiero y por consiguiente menos tiempo. El análisis de la literatura refleja varios ejemplos del uso de HTS, para medicamentos aprobados

por la FDA (siglas en inglés de Agencia de Alimentos y Medicamentos del gobierno de los Estados Unidos), que son activos frente a otras dianas, incluyendo enfermedades olvidadas como tripanosomiasis africana, enfermedad de Chagas, tuberculosis y malaria. Sin embargo, hay pocos ejemplos de la utilización previa de los métodos *in silico* con este propósito [14]. Dentro de estas técnicas, el cribado virtual (CV) tiene la ventaja de ser más económica (ahorro en compra de reactivos y robotización), rápida, y permite tener en cuenta una cantidad de compuestos del orden de billones, cifra impensable experimentalmente [12]. Todo esto mejora la eficiencia y aporta racionalidad a la búsqueda de nuevos AMs.

El CV puede aplicarse siguiendo un protocolo que contiene diferentes pasos de filtrado, de manera que logre una reducción del número de compuestos candidatos a ser examinados experimentalmente. Dichos filtros se aplican de forma secuencial de acuerdo con el nivel de requerimientos computacionales que utiliza cada una de las técnicas (de menor a mayor coste de cálculo) y la complejidad de la información necesaria para cada una de ellas [12]. De esta forma, primeramente, a partir del análisis de las estructuras de los compuestos en estudio, se seleccionan las moléculas que poseen propiedades de fármaco (*drug likeness*), de interés con el fin de optimizar simultáneamente la potencia y la farmacocinética. Después, pueden aplicarse modelos de similitud para seleccionar compuestos focalizados hacia un tipo de estructura (s) concreta (s) [12].

Por otra parte los estudios de Relaciones Cuantitativas Estructura-Actividad (QSAR, por sus siglas en inglés) se han utilizado ampliamente en el modelización de disímiles propiedades moleculares de naturaleza física, química y biológica, siendo actualmente, el enfoque más utilizado en el diseño de fármacos [15]. Este tipo de análisis es muy útil y generalmente es utilizado como principal herramienta en la selección de compuestos durante el protocolo de CV. Existen muchas técnicas que describen bien la actividad biológica, pero el Análisis Discriminante Lineal (ADL) se destaca por su simplicidad, y además su uso ha sido ampliamente descrito para la clasificación de compuestos químicos [15, 16]. De igual forma los sistemas multclasificadores (SMCs) son otra potente herramienta en la modelización de la actividad biológica y en la recuperación temprana de compuestos bioactivos a través del cribado virtual basado en ligando (CVBL) [17-23]. Después de todo este protocolo de

CV, quedan seleccionados un grupo relativamente pequeño de compuestos para los ensayos *in vitro*.

Protocolos de CVBL en forma de "cascada" secuencial, como la descrita anteriormente, se han utilizado para el estudio de compuestos anti-VIH [12], así como para inhibidores de la enzima tirosinasa [15]; sin embargo, no se ha descrito una metodología de este tipo para la identificación de nuevos AMs.

Por todo lo anterior se plantean los siguientes aspectos:

**Problema científico:**

No se conoce una estrategia de cribado farmacológico que integre métodos *in silico* e *in vitro* fiables, rápidos y económicos para el descubrimiento de nuevos compuestos que contribuyan al tratamiento de la malaria, la cual es la enfermedad parasitaria de mayor morbilidad e impacto socioeconómico.

**Hipótesis:**

Es posible identificar compuestos con actividad antimalárica utilizando un protocolo de cribado virtual compuesto por varios filtros, computacionales, en donde el modelo QSAR y el sistema multclasificador, constituya el principal "interruptor" del proceso de decisión multicriterial; así como la corroboración experimental de la actividad predicha, mediante ensayos *in vitro*.

**Objetivo General:**

Proponer una nueva estrategia de tamizaje farmacológico para el descubrimiento de potenciales fármacos antimaláricos, a través del empleo jerárquico de nuevos "filtros" *in silico* e *in vitro*, que permitan el cribado de bases de datos de compuestos químicos y la posterior corroboración experimental de dicha actividad, para los candidatos más prometedores.

**Objetivos específicos:**

- ✓ Desarrollar y validar modelos QSAR predictivos que permitan la discriminación de la actividad antimalárica utilizando descriptores moleculares **TOMOCOMD-CARDD** (Diseño Computacional Topológico Molecular, módulo de Diseño

Racional de Fármacos asistido por Ordenador), y **ADL**(Análisis Discriminante Lineal).

- ✓ Obtener un sistema multclasificador ensamblado a partir de los modelos QSAR obtenidos considerando la diversidad entre los clasificadores.
- ✓ Realizar CV de cuatro bases de datos siguiendo un protocolo "*paso a paso*" para identificación de compuestos con posible actividad antimalárica.
- ✓ Determinar la actividad de los compuestos seleccionados por el protocolo de CV frente a *P. falciparum*, mediante el microtest *in vitro* basado en fluorescencia usando SYBR-green I.
- ✓ Determinar la citotoxicidad inespecífica en macrófagos de la línea J774 de aquellos compuestos que mostraron actividad *in vitro* frente a *P. falciparum*.
- ✓ Evaluación de la actividad antimalárica *in vitro* en el test de inhibición de la biomineralización de la ferriprotoporfirina IX (FPIX).

La **novedad científica** de este trabajo se fundamenta en la obtención de nuevos modelos matemáticos y la propuesta de una nueva estrategia de tamizaje farmacológico para el descubrimiento de potenciales fármacos AMs.

El **aporte teórico** de esta investigación está dado, fundamentalmente, en el descubrimiento de nuevos compuestos con actividad antimalárica, tanto de origen natural, sintético, semisintético; así como a partir de fármacos con otros usos.

El **aporte práctico** de la Tesis radica, principalmente, en la propuesta de un nuevo método de CVBL que puede ser utilizado por cualquier institución nacional o internacional interesada en la búsqueda de nuevos fármacos AMs. Además, se conformó, por primera vez, una base de datos heterogénea de compuestos químicos y productos naturales con actividad antimalárica, la cual puede ser utilizada por investigadores interesados en esta actividad, como material de referencia o soporte para la generación de nuevos modelos QSAR.

El **aporte metodológico** se basa en que con la utilización de una filosofía de trabajo similar a la empleada en la presente investigación se pueden desarrollar nuevas estrategias de cribado farmacológico para el descubrimiento de fármacos con otras actividades biológicas integrando modelos *in silico* e *in vitro*.

# *Revisión Bibliográfica*

---

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Malaria

#### 2.1.1. Historia de la enfermedad

Las fiebres palúdicas fueron descritas por Hipócrates 400 años antes de J.C. No solamente se diagnosticaba la enfermedad sino que se realizaban pronósticos acerca de su evolución a pesar del desconocimiento de su etiología. Los términos empleados más comúnmente, malaria y paludismo, también conservaban algunas imprecisiones. Al igual que la palabra malaria (mal aire) resultaba incorrecta al señalar como origen de la enfermedad la transmisión por el aire, el término paludismo (de “palus”, terreno pantanoso) podía hacer pensar que sólo se producía en aguas estancadas [17].

Al paludismo se le atribuyeron varios orígenes que van desde el origen telúrico relacionándolo con la insalubridad de las aguas pantanosas al considerar que el aire estaba cargado de partículas nocivas culpables de las fiebres. Otros autores atribuyeron que era el suelo con materia orgánica en descomposición y agua subterránea el que facilitaba la existencia de la enfermedad [18].

Para algunos naturalistas, el agente causal del paludismo eran protistas que incluía infusorios, animales, bacterias, diatomeas y hongos [19]. La teoría bacteriana del paludismo apareció a raíz de las investigaciones de Klebs y Tommasi-Crudeli que describieron el "*Bacillus malariae*" en 1879 [20]. Ellos observaron ciertos bacilos y filamentos muy largos en cultivos con agua y tierra procedente de las palúdicas Lagunas Pontinas italianas, así como en la sangre de conejos inoculados y en enfermos de malaria [21]. Las ansias por describir la etiología de la enfermedad, el éxito de la Bacteriología y las dificultades para explicar la transmisión del paludismo, contribuyeron a que esta hipótesis fuese aceptada durante varios años.

El protozoo fue descrito por primera vez en la sangre de un paciente por Charles Laveran en 1880, que observó al parásito en un frotis sin teñir de sangre fresca [22]. Charles Alphonse Laveran (1845-1922) por sus trabajos recibió en 1907 el Premio Nobel de Fisiología y Medicina. La asignación de rango taxonómico al hematozoo fue costosa. Laveran lo denominó *Oscilaria malariae* y *Hematozoon malariae*. Osler, lo nombró *Hematomonas malariae*. Labbé lo denominó *Haemamoeba laverani* y Mestschnikoff en 1887 *Haematophyllum malariae*. Los italianos Golgi, Grassi y Feletti admitieron cinco especies pertenecientes al género *Haemamoeba* sp: *Haemamoeba*

*malariae*, *H. vivax*, *H. precoz*, *H. immaculata* y otra perteneciente al género *Laverania* sp: *Laverania malariae*. Definitivamente Marchiafava y Celli, en 1885 aceptaron el nombre de *Plasmodium malariae* [18].

Una vez demostrada la existencia de una especie de protozoo causante del paludismo los malariólogos se sumieron en un nuevo dilema. Laverán sostenía que sólo una especie del hematozoo causaba los distintos tipos de paludismo, admitiéndose esta hipótesis en Francia. En otros países como Italia, Inglaterra, Alemania y Estados Unidos eran más partidarios de la existencia de varias especies [18].

### 2.1.2. Etiología

La enfermedad en el hombre está causada principalmente por cuatro especies de *Plasmodium*: *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* y *P. malariae*. De ellas, *P. falciparum* es el responsable del 95% de las muertes, pero la especie más prevalente es *P. vivax*. En cuanto a la distribución geográfica, *P. falciparum* y *P. malariae* se encuentran especialmente en Asia y África, *P. ovale* se encuentra de forma casi exclusiva en África y *P. vivax* predomina en Latinoamérica, India, Pakistán, Oceanía y, más raramente, en África [6].

Recientemente, *P. knowlesi*, una especie que se encuentra naturalmente en *Macaca fascicularis* y *Macaca nemestrina* ha demostrado ser capaz de provocar la infección en seres humanos. La infección por *P. knowlesi* es frecuente en el sureste de Asia aunque se han descrito casos importados en los países europeos debido a programas de ecoturismo en las zonas boscosas de la región [23-25]. Debido a su elevado potencial para replicarse rápidamente con un desarrollo de la fase eritrocítica de 24 h, *P. knowlesi* ha aumentado la preocupación en la comunidad médica. Este parásito muestra una tasa de mortalidad que es comparable, si no superior, a la de la malaria por *P. falciparum* y la gravedad de la infección se asocia significativamente con alta parasitemia. No obstante, no son frecuentes casos de malaria por *P. knowlesi* con valores de hiperparasitemia, excepto en Borneo, Malasia [25, 26].

La identificación microscópica de *P. knowlesi* se dificulta para muchos laboratorios debido a la similitud morfológica con *P. falciparum* y *P. malariae*.

### 2.1.3. Epidemiología

Actualmente, la malaria representa la enfermedad parasitaria de mayor importancia mundial al generar entre 300-500 millones de casos/año en todo el mundo y cerca de 2 millones de muertes en el mundo [2]. Estas cifras explican el hecho por el cual, el producto interno bruto (PIB) de los países donde la malaria es prevalente, se haya reducido en 50% durante los últimos 20 años, comparado con el de los países no maláricos [27, 28].

Según el índice de parasitemia, podemos clasificar la geografía mundial en:

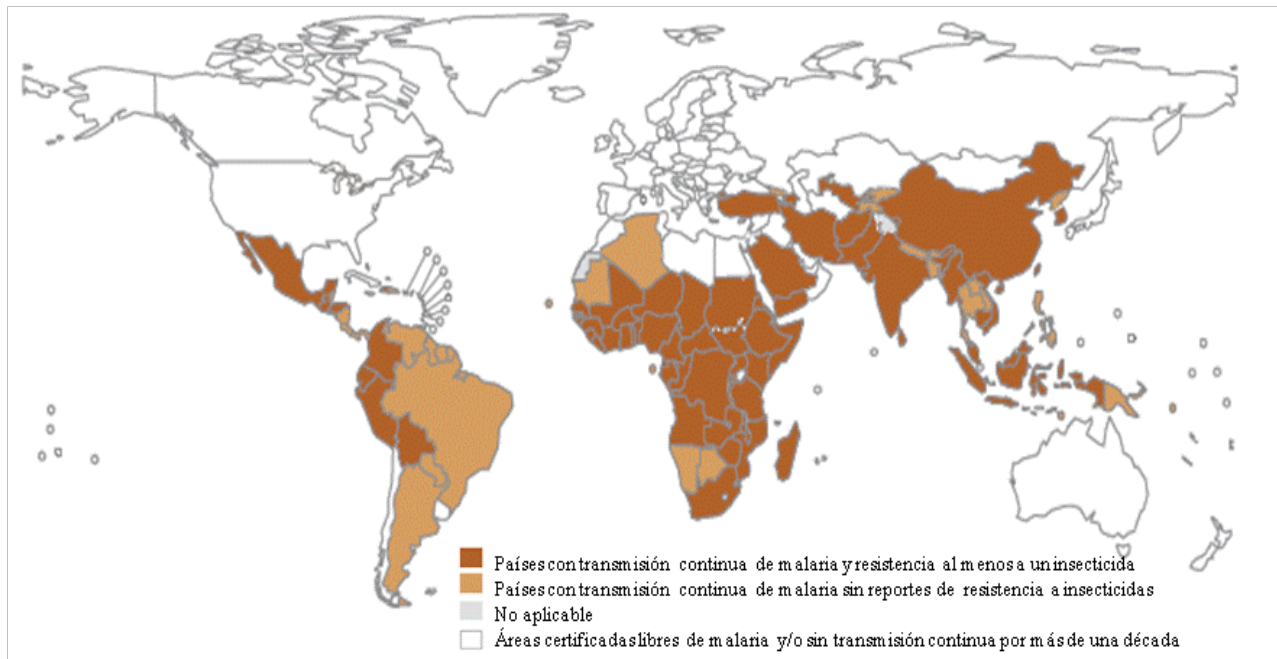
- *Áreas Hipoendémicas*: en ellas, menos de un 10% de la población se ve afectada.

- *Áreas Mesoendémicas*: entre un 11 y un 50% de afectación.

- *Áreas Hiperendémicas*: las cifras alcanzan entre un 51 y un 75%.

- *Áreas Holoendémicas*: más de un 75%. En ellas, un ser humano puede ser picado por un mosquito más de una vez al día. Es típica la presencia de parásitos en sangre periférica sin síntomas, y se asocia a anemia crónica y secuestro en la microcirculación placentaria [22].

*P. falciparum* es la especie de mayor abundancia global y el que provoca una mayor gravedad de la enfermedad, sin embargo *P. vivax* es el parásito más frecuente en el continente americano, siendo Brasil y Colombia los países que presentan la mayor incidencia de malaria. *P. vivax* genera alrededor de 70-100 millones de casos clínicos que representan alrededor del 20% de la malaria mundial, pero ha tenido una expansión sostenida los últimos 30 años y ha comenzado a mostrar resistencia a los tratamientos estandarizados [22]. Adicionalmente esta especie se caracteriza por recidivas debido a la permanencia crónica del parásito en forma de hipnozoitos, en el tejido hepático [29, 30].



**Figura 1.** Países con transmisión de malaria, donde se ha identificado resistencia a insecticidas al menos en uno de sus principales vectores.

Editado de: World Malaria Report: 2012, WHO Global Malaria Programme

La resistencia del parásito a los fármacos antipalúdicos sigue siendo un peligro real y siempre presente para los avances conseguidos hasta ahora. Un medio para contener la emergencia y la propagación de la resistencia a los fármacos antipalúdicos consiste en proporcionar pruebas de diagnóstico a todos los pacientes con sospecha clínica de paludismo y administrar el tratamiento antipalúdico únicamente a quienes tengan confirmada la infección por *Plasmodium* spp. [5].

Otra grave preocupación concierne al rápido aumento de la resistencia a los insecticidas. Actualmente, existe dependencia de los piretroides, ya que son los insecticidas más usados para tratar las redes mosquiteras y para la fumigación intradomiciliaria. Se ha informado resistencia a estos en 27 países africanos y en 41 de todo el mundo. Si no se gestiona de un modo adecuado, esta resistencia constituye una amenaza potencial para futuros avances en el control del paludismo [22].

En un número creciente de países del sureste asiático se ha observado resistencia a la artemisinina, un componente fundamental de algunos de los fármacos utilizados en el tratamiento del paludismo producido por *P. falciparum* [22].

En España, el paludismo dejó de ser una enfermedad endémica en 1964, fecha en la que España recibió el certificado oficial de erradicación. Desde entonces, su patrón epidemiológico ha cambiado, presentándose en forma de casos importados de viajeros a países endémicos, con un incremento debido el aumento de los viajes a países tropicales. En los últimos años se han detectado en torno a 300 casos anuales según el registro de Enfermedades de Declaración Obligatoria [6].

#### **2.1.4. Impacto económico de la Malaria**

El paludismo produce pérdidas económicas importantes, que, a largo plazo, han llevado a diferencias considerables entre los valores del PIB de los países con y sin paludismo (sobre todo en África). Los costos sanitarios de esta enfermedad incluyen gastos tanto personales como públicos en prevención y tratamiento. En algunos países con gran carga de paludismo, la enfermedad es responsable de: [22]

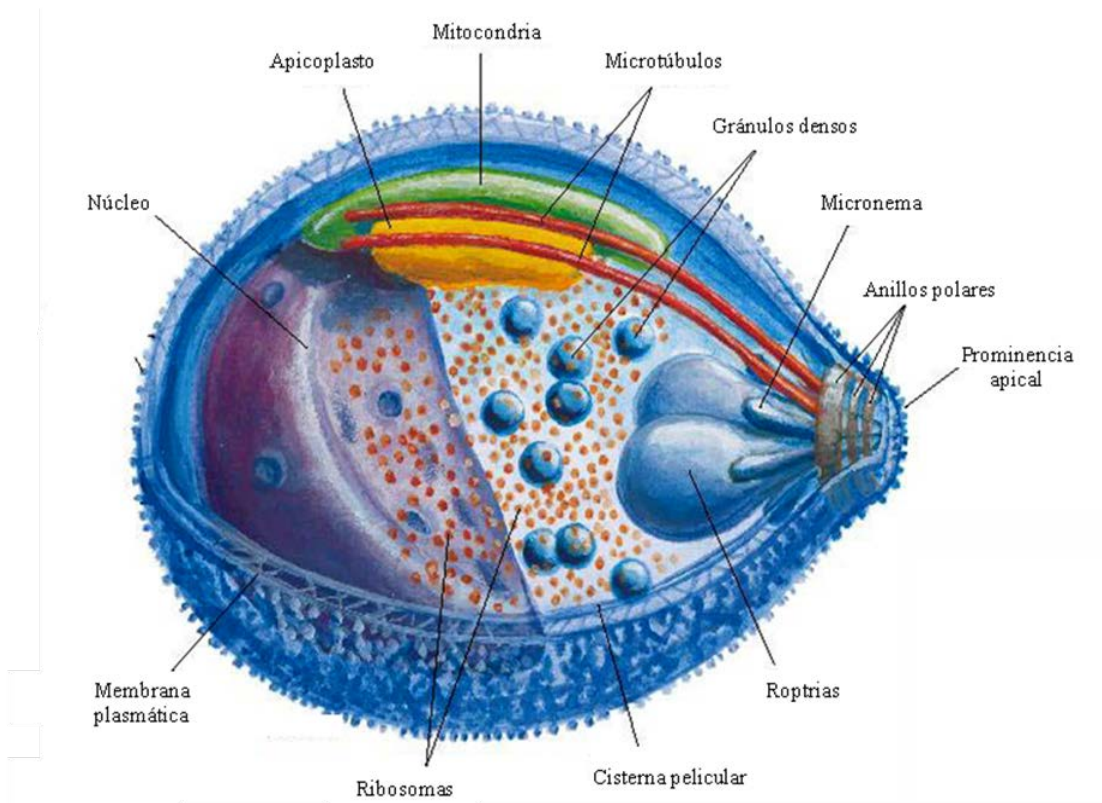
- Hasta un 40% del gasto sanitario público.
- Un 30% a 50% de los ingresos en hospitales.
- Hasta un 60% de las consultas ambulatorias.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) describe que se necesita un estimado de US\$ 5.100 millones por año entre 2011 y 2020 para alcanzar el acceso universal a las intervenciones en malaria y actualmente, solo hay disponibles US\$ 2.300 millones [5].

En la actualidad el gasto en el tratamiento de la enfermedad es muy superior al de las pruebas de diagnóstico rápido (PDR), pero se espera que disminuya por la estrategia de ampliar la prueba parasitológica a todos los casos sospechosos de malaria antes de usar el tratamiento. Con los precios actuales de las PDR y las terapias combinadas con artemisina (TCA) (0,50 dólares para las PDR y 1,40 dólares para la combinación de arteméter-lumefantrina), y el estricto cumplimiento del protocolo de tratamiento, el ahorro en materias primas podría llegar a 68 millones de dólares en el sector público de la región africana [5]. De igual manera el acceso universal a las redes mosquiteras tratadas con insecticida en África en 2015, podría reducir entre 31 y 48 millones el número de casos de paludismo que acuden a centros de salud pública [31].

### 2.1.5. Morfología del parásito

Los miembros del género *Plasmodium*, son parásitos intracelulares de eritrocitos y de otras células (hepatocitos), que pertenecen al phylum *Apicomplexa* y se caracterizan morfológicamente, por la presencia del complejo apical, integrado por: anillos polares, las roptrias, los micronemas, la prominencia apical y los microtúbulos subpeliculares (Figura 2). El mismo, en algunas de las fases parásitas, guarda estrecha relación con la invasión celular e inicio de la división, como se ha demostrado mediante el microscopio electrónico, en el oocineto y el esporozoíto, que pertenecen al ciclo sexual, así como en el merozoíto [32].



**Figura 2.** Morfología del merozoíto del género *Plasmodium*.

Editado de: *Parasitology Today*, 2000, 16, 427-433.

De las cuatro especies principales del género *Plasmodium* que parasitan al hombre, tres de ellas pertenecen al subgénero *Plasmodium*: *Plasmodium (Plasmodium) vivax*, *P.(P.) malariae* y *P. (P.) ovale*; mientras que uno pertenece al subgénero *Laverania*: *Plasmodium (Laverania) falciparum* [1].

### 2.1.6. Ciclo biológico

*Plasmodium* es un protozoo con un ciclo de vida bastante complejo que comprende una fase asexual o esquizogonia en el hospedador humano, y una breve fase sexual obligatoria en el mosquito vector. En el humano, la infección comienza con la picadura de la hembra del género *Anopheles* infectada, la cual introduce las formas del parásito denominadas esporozoítos [7], los cuales muestran una selectividad particular por las células hepáticas, en donde el parásito se desarrolla y genera el esquizonte hepático (ciclo pre-eritrocítico), que en unas dos semanas se rompe, dejando en libertad a miles de merozoítos hepáticos (10.000 a 30.000 merozoítos) que entran en el torrente circulatorio e invaden los glóbulos rojos [32].

Una vez que el parásito invade los eritrocitos comienza una nueva fase, denominada ciclo eritrocítico. La invasión es extremadamente rápida (30 segundos) y continúa con la formación de una vacuola parasitófora donde se localiza el parásito [33], que en esta fase se denomina anillo. A partir de 15 h post-invasión existe un progresivo incremento en la actividad metabólica y biosintética dentro de la célula infectada y el parásito pasa al estadio de trofozoíto caracterizado al microscopio por presentar un pigmento característico denominado hemozoína [34, 35].

El parásito de la malaria aunque tiene una mitocondria, carece de un ciclo de ácido cítrico funcional por lo que se piensa que es totalmente dependiente de la glucólisis para su abastecimiento energético [35]. A medida que el parásito madura, la tasa de utilización de glucosa y la producción de ácido láctico se incrementa hasta 100 veces en el eritrocito infectado [36]. Mediante endocitosis el parásito retiene porciones del citoplasma del eritrocito dentro de vesículas que se fusionan con la membrana digestiva interna o la vacuola alimenticia. Aquí las proteínas de la célula hospedadora, principalmente hemoglobina (Hb), son digeridas a pequeños péptidos que se utilizan como fuente de aminoácidos para el parásito. Al mismo tiempo, existe una elevada actividad de síntesis de *ex novo* de ADN contrastando marcadamente con la incapacidad del eritrocito normal para sintetizar macromoléculas [35, 37].



ataques de fiebre ya que desencadenan una liberación de citoquinas por parte del hospedador [38, 39].

La duración del ciclo asexual en el hombre varía dependiendo de la especie, de 48-50 h en *P. vivax*, *P. ovale* y *P. falciparum* y 72 h en *P. malariae*, resultando en el patrón de fiebres tercianas o cuartanas observado en los distintos tipos de malaria humana [35]. A pesar de que la mayoría de los merozoítos que invaden los eritrocitos desarrollan el ciclo asexual, una pequeña fracción puede dar lugar a células sexuales masculinas y femeninas que se denominan gametocitos. Cuando un mosquito vuelve a picar al individuo, los gametocitos que ingieren con la sangre, debido a la menor temperatura y a la presencia de ácido xanturénico en el estómago del insecto, se desarrollan en gametos que luego dan lugar a los macro y microgametocitos [35, 40].

La fecundación, que se produce en el estómago del mosquito, genera un cigoto diploide, que se transforma en un ooquinetto que, tras atravesar las paredes del estómago, se localiza en la lámina basal y segrega una cubierta ooquistica. Este ooquiste crece y experimenta una esporogonia que rinde un gran número de esporozoítos, por ello a esta fase del ciclo en el interior del mosquito se la conoce como ciclo esporogónico. La mayoría de estos esporozoítos se dirigen al interior de las glándulas salivales, desde donde se inyectarán a un nuevo hospedador vertebrado a través de una nueva picadura e iniciando nuevamente el ciclo [35, 41].

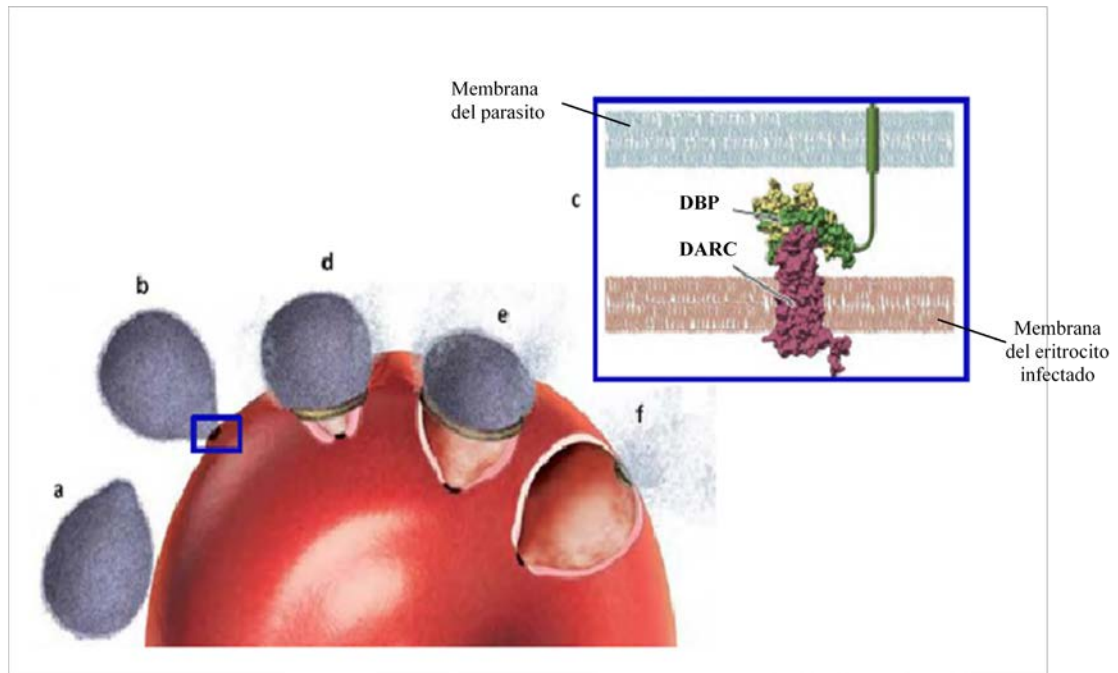
### **2.1.7. Invasión celular. Cambios en la membrana del eritrocito infectado**

Los merozoítos hepáticos, con su complejo apical, reproducen los eventos parásito-celulares al invadir, en forma selectiva, a los eritrocitos; así, los merozoítos hepáticos de *P. vivax* seleccionan determinantes (antígeno Duffy) de los eritrocitos jóvenes (reticulocitos); mientras que los de *P. falciparum*, seleccionan a la glicoforina (glicoproteína de la membrana eritrocítica). El desarrollo del parásito en el interior de la vacuola parasitófora del eritrocito, se ve afectado por el tipo de Hb y la presencia de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, entre otros, como se verá más adelante [35].

A continuación, se establece una estrecha unión entre el parásito y el eritrocito, seguida de la activación de un motor actina-miosina que impulsa la entrada del parásito (Figura 4). Estas acciones coinciden con la secreción de lípidos y proteínas (incluido proteasas) desde el aparato conoidal, produciendo una ruptura en la conexión de las proteínas integrales de membrana con la red del citoesqueleto. Finalmente, el ingreso

del parásito produce la invaginación de la membrana del eritrocito dando origen a la vacuola parasitófora [35, 42].

*P. falciparum* se diferencia de otras especies de *Plasmodium* en las alteraciones que se producen a nivel de las proteínas de membrana del eritrocito hospedador, que se relacionan con los síntomas más graves de la enfermedad [43, 44]. La forma de anillos es prácticamente la única que se observa en los frotis de sangre periférica de las personas infectadas con *P. falciparum*, dado que los eritrocitos que albergan las formas maduras son secuestrados en diferentes órganos y no circulan [35]. El fenotipo adhesivo de las especies de *P. falciparum* está asociado con los *knobs*, los cuales se componen principalmente de las asociaciones *knob*-proteínas ricas en histidina (KAHRP, del inglés *knob-associated histidine rich protein*). Estos *knobs* actúan como plataformas para la presentación de proteínas de citoadherencia exportadas por el parásito; como por ejemplo, la proteína 1 de *P. falciparum* presente en la membrana de eritrocito (PfEMP-1, del inglés *P. falciparum erythrocyte membrane protein 1*) [35, 45]. PfEMP-1 se considera la principal responsable de la adhesión a las células endoteliales y a otras células vasculares del hospedador [35, 46, 47]. De esta forma se transforma una célula inerte y altamente diferenciada como es el eritrocito, en una maquinaria adhesiva que actúa como incubadora para la eficiente replicación del parásito [35].



**Figura 4.** Ilustración de proceso de invasión del eritrocito por el merozoíto de *P. vivax*. a. Interacción inicial mediada por ligandos. b. Reorientación y formación de salida. c. En la ampliación se detalla la fuerte unión al eritrocito. d. Entrada y formación de vacuola parasitófora. e. Movimiento de ingreso dirigido por el motor de actina-miosina. f. Invaginación y re-sellamiento de la membrana del eritrocito y la vacuola parasitófora. Editado de: Méndez-Cuadro, D. M. (2011).

### 2.1.8. Fisiopatología del paludismo

La fisiopatología de la malaria y las manifestaciones clínicas están estrechamente ligadas a la especie de parásito, su ciclo de vida y a la inmunidad del hospedador. Los síntomas clásicos de la malaria corresponden con la ruptura del gran número de esquizontes circulantes que liberan merozoítos a la sangre [48, 49] activando los macrófagos. La molécula del parásito con mayor potencial para estimular macrófagos, son los fragmentos de glicosil-fosfatidil-inositol (GPI) [50]. La estimulación de los macrófagos por esta molécula induce la producción de citoquinas proinflamatorias y altas concentraciones de Factor de Necrosis Tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), que generan un estado de inflamación sistémica produciendo los síntomas clásicos de la malaria [51, 52].

*P. falciparum* es la especie de *Plasmodium* que produce un mayor secuestro de parásitos en la microcirculación, debido a la expresión de moléculas de adherencia en su membrana y a las alteraciones que causa en los eritrocitos que parasita [50, 53]. Este

fenómeno produce enlentecimiento del flujo sanguíneo en los capilares, con hipoxia, aumento local de citocinas, glucólisis anaeróbica y acidosis láctica [50, 54], que son claves para explicar muchas de las manifestaciones y complicaciones de la infección [50, 55]. El secuestro de *P. falciparum* evita que este sea depurado por el bazo, favorece su multiplicación y aumenta su supervivencia en las vénulas poscapilares donde hay menor presión de oxígeno, y en consecuencia menor estrés oxidativo [50]. Estos fenómenos no se producen en las infecciones por las otras tres especies de *Plasmodium* y en ellas pueden verse en sangre periférica parásitos en todas sus formas de desarrollo.

Los periodos de incubación habitualmente son de 13-28 días, pero pueden ser muy variables, oscilando entre 7 días y 9-12 meses en el caso de *P. vivax*. [50, 54]. Se ha comunicado un caso con periodo de incubación de tan solo tres días [50, 54, 56].

### **2.1.9. Clínica del paludismo**

Las manifestaciones clínicas se deben sólo a las formas asexuadas de la esquizogonia hemática, ya que ni las exoeritrocíticas (intrahepáticas), ni las sanguíneas sexuadas (gametocitos) producen síntoma alguno. Estas están influidas por factores dependientes del parásito y del hospedador, por ejemplo: *P. ovale* y *P. vivax* parasitan sólo los hematíes más jóvenes, *P. malariae* los más viejos y *P. falciparum* tiene capacidad de parasitar los de todas las edades siendo sus parasitemias mucho mayores. En cuanto al hospedador, el grado de inmunidad, innata o adquirida, que este pueda presentar (semi-inmunidad), influye en las manifestaciones del paludismo. Hay una serie de factores protectores innatos:

#### **✓ Receptores de membrana en eritrocitos**

La invasión de las células sanguíneas es posible gracias a la presencia de un receptor específico localizado en la membrana del eritrocito. En el caso de *P. vivax* este receptor está relacionado con el antígeno del grupo sanguíneo Duffy y como la mayoría de la población del África Occidental es negativa para el fenotipo Duffy, esta población es resistente a la infección por *P. vivax*. Sin embargo *P. falciparum* utiliza como sitio de unión a las glicoforinas, una familia de sialoglicoproteínas de membrana [57].

#### **✓ Tipos de Hb**

La anemia falciforme se caracteriza por la presencia de una Hb de tipo S. Dentro de los eritrocitos con Hb S, el parásito crece con dificultad. Los individuos portadores solamente de Hb S (homocigotos) generalmente fallecen muy tempranamente, antes de

alcanzar la edad reproductiva, y por consiguiente, no pueden transmitir el gen recesivo a la siguiente generación. Sin embargo se conoce que en las zonas maláricas, los individuos que tienen una mezcla de las dos hemoglobinas S y A (heterocigotos) tienen ventaja frente a los individuos que poseen solamente Hb normal A. En estas condiciones, la heterocigosidad para la Hb S confiere una ventaja selectiva en aquellas regiones infectadas por *P. falciparum*. Existen otras formas de Hb, menos frecuentes que la Hb S, que también son adaptaciones frente al parásito: la Hb C (en África occidental), y la Hb E, en la India y las islas de Indonesia [6].

✓ **Deficiencias enzimáticas**

La deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) es la enzimopatía más común en el ser humano y el quinto defecto congénito más común a nivel mundial. El gen relacionado está localizado en el cromosoma X (ligado al sexo femenino) y en su deficiencia provoca que los eritrocitos sean muy susceptibles al daño oxidativo debido a una disminución del poder reductor (disminución del glutatión reducido). Existen evidencias *in vitro* de que eritrocitos con deficiencia de G6PD, son menos susceptibles a la infección por *Plasmodium*, pero la evidencia en la población es controvertida y los estudios han arrojado tanto resultados que soportan el carácter protector como resultados que no lo soportan [57]. En muchas poblaciones mediterráneas, existe otro grupo de anomalías genéticas que confieren resistencia natural al paludismo, son las  $\alpha$  y  $\beta$ - talasemias. En estos casos, se producen mutaciones que reducen la cantidad de cadena  $\alpha$  ó  $\beta$  de la Hb, según sea el caso. Al igual que en las situaciones anteriores, las talasemias están relacionadas con un menor crecimiento del parásito intraeritrocitario y un mayor estrés oxidativo [6].

A continuación se mencionan las manifestaciones clínicas más frecuentes en la malaria:

✓ **Paludismo no complicado**

Los síntomas iniciales son inespecíficos y comunes a las cuatro especies. El principal, la fiebre, aparece al romperse los hematíes parasitados. Esta ruptura al inicio es anárquica, por lo que el patrón de fiebre es irregular. Posteriormente se sincroniza, sin conocerse el mecanismo, y se hace cíclica: fiebres cuartanas (cada tres días) en *P. malariae* y fiebres tercianas (cada dos días) en las otras tres especies. Suele acompañarse de escalofríos, cefaleas y artromialgias [58].

En *P. malariae*, la infección inicial (primo-invasión) puede pasar inadvertida, con parasitemias muy bajas, indetectables con microscopía y persistir así durante 20-30 años, al cabo de los cuales puede manifestarse como una fiebre cuartana [59, 60].

✓ **Paludismo grave o complicado**

La OMS ha establecido una serie de criterios que definen la malaria grave o complicada. La menor o mayor gravedad de la enfermedad estará determinada por el número de criterios de gravedad que tenga el paciente [58].

La malaria cerebral se caracteriza por signos clínicos variados, pero en todos hay pérdida parcial de la consciencia. Entre los signos prodrómicos están la fiebre de 40 °C y/o presencia de dolor de cabeza, somnolencia, delirio, confusión. Puede haber cambios en el comportamiento en las primeras fases y agitación, manía y subsiguiente coma. Los signos son los de una encefalopatía.

El paludismo álgido es raro pero generalmente fatal y es consecuencia de una infección con colapso y fallo vascular periférico. Los signos más característicos son parecidos al shock quirúrgico; piel pálida, fría y húmeda, unido a respiración superficial, pulso rápido y débil con baja presión sanguínea, junto a temperatura por debajo de lo normal.

También se puede presentar el síndrome hepatorenal por paludismo debido a *P. falciparum*. Un 50% de los pacientes tienen aumentada la urea en sangre y los niveles de creatinina sérica, aunque la causa es prerrenal, ya que de estos, sólo el 5- 10% tienen un verdadero fallo renal. Esto es causado por una necrosis tubular aguda por daño en la perfusión renal, producto a la hipovolemia o la reducción en la microcirculación renal [22].

✓ **Paludismo y embarazo**

Durante el embarazo disminuye la semi-inmunidad adquirida y aumenta la frecuencia y gravedad de los accesos palúdicos, sobre todo en primigestas y en el primer y segundo trimestre del embarazo. Puede ser más grave si la semi-inmunidad es nula o escasa y agravar la anemia gravídica. Los abortos, la mortalidad infantil y el bajo peso del recién nacido son más frecuentes [58].

✓ **Paludismo en la infancia**

La enfermedad es más grave en los niños que en los adultos. Son notorios la anorexia y los cambios de comportamiento con gran irritabilidad y sueño irregular. Puede presentarse cefalea intensa y en algunos casos náuseas y vómitos, con dolor

abdominal difuso. La fiebre aparece súbitamente, precedida de escalofrío o no. La duración de los paroxismos es irregular y varía entre 2 y 12 h. Cuando la temperatura es muy alta, casi siempre aparecen convulsiones. Al descender la fiebre viene el período de intensa sudoración, y la temperatura puede llegar a ser subnormal. La anemia aparece pronto y existe una parasitemia marcada. Es común la esplenomegalia dolorosa y la hepatomegalia poco notoria [22].

De forma general puede ser útil considerar los tres conceptos siguientes:

- Recidiva: reaparición del cuadro clínico después de la infección primaria, debido al paso de hipnozoítos a la sangre. Se produce por los mismos parásitos de la infección primaria por *P. vivax* y *P. ovale*.
- Recrudescencia: aparición del cuadro clínico por fracaso del tratamiento con esquizotomicidas hemáticos, no por la acción de los hipnozoítos, y por tanto los parásitos son los mismos de la infección primaria. Se producen principalmente con *P. falciparum*.
- Re-infección: es una nueva infección (parásitos distintos a los de la infección primaria) [58].

#### **2.1.10. Historia de los fármacos antipalúdicos**

El descubrimiento de las tierras americanas en el siglo XV incluyó el hallazgo de algunos productos fundamentales para la humanidad [18].

*“Sin el maní, la subsistencia de las razas africanas sería en verdad pobre; sin la papa (... difícilmente ve uno cómo pudieran alimentarse al presente las poblaciones europeas, (...); sin el caucho, no es fácil imaginar cómo pudieran haberse llevado a cabo los progresos alcanzados durante el último siglo en los terrenos de la electricidad, transporte y comunicaciones (...) pero existe otro producto del cual la humanidad es igualmente deudora al Nuevo Hemisferio. Y los beneficios que de este último ha ella recibido no son menos valiosos que los derivados de los otros, antes mencionados. Dicho producto es la quina”* [61].

La clásica leyenda del descubrimiento de las cualidades febrífugas de la corteza de la quina data de 1638, cuando la segunda Condesa de Chinchón, esposa del Virrey del Perú, Dña. Francisca de Rivera, enfermó de calenturas y el Corregidor de Loja, Juan López de Cañizares, le envió un conocido remedio de los indios. Este remedio se trataba de una infusión de la corteza del “Árbol de las Calenturas” al cual luego se le denominó *Cinchona* en honor a la condesa de Chinchón [18].

Otras hipótesis sitúan el conocimiento de las propiedades del árbol de la quina en los misioneros jesuitas de la provincia de Quito que habían observado que los mineros indios tomaban un remedio contra el frío que también curaba las fiebres palúdicas. Fuesen los “polvos de la condesa” o de “los jesuitas”, el remedio contra el paludismo se hizo famoso en Europa por Juan de la Vega, médico del Virrey de Perú que los trajo a Sevilla y por el cardenal Juan de Lugo que extendió su uso entre la curia vaticana.

El sulfato de quinina fue aislado en 1820, estableciéndose en Francia laboratorios pioneros en su producción comercial [18]. Sin embargo, actualmente se ha reconocido que en realidad ya desde el año 350 de Nuestra Era, los chinos utilizaban la planta *Artemisa annua* de forma efectiva para el tratamiento de la malaria, planta de donde se deriva la artemisina [62]. La quinina se continuó utilizando como el único tratamiento para esta enfermedad por más de tres siglos, hasta que en 1945 se sintetizó un nuevo compuesto antipalúdico, la CQ. Este fármaco desplazó a la quinina de procedencia vegetal, por poseer menos efectos colaterales y por tanto ser mejor tolerado [18]. Sin embargo, desde la aparición de *P. falciparum* resistente a la CQ, por primera vez en Tailandia en 1959 y en Colombia en 1961, la malaria resistente a los fármacos se ha vuelto uno de los problemas más importantes en el control de la enfermedad en los años recientes [18].

#### **2.1.11. Tratamiento**

El tratamiento ha sido posible durante muchos años gracias a la existencia de un número restringido de fármacos, presentando cada uno de ellos una serie de limitaciones de tipo farmacológico [63]. Los fármacos de mayor utilización como son la CQ y la asociación de sulfadoxina + pirimetamina presentan beneficios limitados y en determinados casos son de una eficacia cuestionable debido a los fenómenos de resistencia [9-11].

- **Clasificación de los fármacos antipalúdicos**

Los antipalúdicos se dividen en dependencia de la etapa del parásito que atacan y el fin clínico correspondiente.

- ✓ Esquizonticidas tisulares utilizados en la profilaxis causal:

Son fármacos que actúan contra las formas hícticas primarias de plasmodios en hígado, que en un mes o menos inician la etapa eritrocítica de la infección. Evitan la

maduración de los esquizontes hepáticos en el ciclo pre-eritrocítico, ejemplo: cloroguanida (pro-guanil) la cual es utilizada para la profilaxis causal del paludismo por *P. falciparum*.

- ✓ Esquizonticidas tisulares utilizados para evitar recaídas:

Los fármacos actúan en las formas hísticas latentes de *P. vivax* y *P. ovale* que persisten después de que pasaron a la circulación las formas hísticas primarias. Las formas hísticas latentes producen el paludismo recidivante o recaídas, meses o años después de la infección inicial. La primaquina es el fármaco prototipo reservado para evitar recaídas [22].

- ✓ Esquizonticidas hemáticos utilizados en la curación clínica y la supresión:

Los medicamentos en cuestión pueden dividirse en dos grupos: 1) Los esquizonticidas hemáticos de acción rápida, que incluyen la CQ, y los clásicos alcaloides antipalúdicos como: quinina y sus derivados, quinidina, mefloquina, halofantrina, entre otros, y 2) los esquizonticidas hemáticos menos eficaces y de acción más lenta, en donde encontramos la pirimetamina, cloroguanida y antibióticos antipalúdicos.

- ✓ Gametocidas:

Actúan contra las formas eritrocíticas sexuales de los plasmodios y así evitan la transmisión del paludismo a los mosquitos. La CQ y quinina poseen actividad gametocida contra *P. vivax*, *P. ovale* y *P. malariae*, en tanto que la primaquina tiene actividad especialmente potente contra *P. falciparum*.

- ✓ Esporonticidas:

Evitan o inhiben la formación de ooquistes y esporozoítos palúdicos en mosquitos infectados, un ejemplo es la CQ. Los antipalúdicos no se utilizan en seres humanos para este fin [22].

- **Fármacos antimaláricos de uso tradicional**

- ✓ **Cloroquina**

La CQ es miembro de una gran serie de 4-aminoquinolinas, sintetizado en 1934 y después de varias décadas de uso como terapia de primera línea y agente profiláctico, todavía se utiliza en muchas partes del mundo, con muy buenos resultados que avalan su empleo [22]. En España se dispone de la CQ (Resochín) y la hidroxicloroquina (Dolquine) [64].

*Mecanismo de acción:* Después de la digestión de la Hb, el hemo es liberado como ferriprotoporfirina (FP), la cual induce la hemólisis de los eritrocitos. La FP es detoxificada por el parásito a través de la conversión de ésta a hemozoína, el cual es un producto no tóxico para el parásito. El complejo FP-CQ formado es tóxico para la célula parasitaria y por demora en el secuestro de FP, la CQ puede permitir tanto a la FP, como al complejo formado entre ellas, ejercer efectos tóxicos [65]. El complejo FP-CQ, promueve fuertemente la peroxidación de los fosfolípidos anclados a la membrana, que puede sugerir una ruta alternativa para provocar la destrucción del parásito [22]. El tratamiento con CQ, reduce la actividad de la enzima hemo-polimerasa de *P. falciparum* en un 80%, siendo responsable de la transformación de los productos de degradación de la Hb, evitando en consecuencia, su transformación en hemozoína [66]. Por tanto, si no ocurre polimerización, no hay hemozoína y el hemo se acumula aumentando la toxicidad para el parásito [22, 67]. Por otra parte la CQ es una base débil que se acumula en los compartimentos lisosómicos del parásito, provocando un aumento del pH de la vacuola alimentaria e inhibe las proteasas que intervienen en la degradación de la Hb [64].

*Aplicaciones terapéuticas:* La CQ es muy eficaz contra las formas eritrocíticas de *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* y cepas de *P. falciparum* sensibles. Ejerce actividad contra gametocitos de las tres primeras especies, pero no con los de *P. falciparum*. El fármaco es inactivo contra las formas tisulares latentes de *P. vivax* o *P. ovale*, no eliminando las infecciones por dichas especies [68]. La CQ es altamente eficaz en la profilaxis y cura de la infección por *P. malariae* y cepas sensibles de *P. falciparum* que aún subsisten en Sur América y el Medio Oriente [22].

*Reacciones adversas:* Con las dosis utilizadas para la profilaxis o el tratamiento son poco frecuentes, aunque la toxicidad puede surgir cuando se administran con rapidez, y/o a dosis alta por vía parenteral. Pueden presentarse reacciones adversas tales como hipotensión y toxicidad cardiovascular, las cuales se han mostrado en niños tratados con inyecciones intramusculares. Otra manifestación es la alteración en la conducción cardíaca, especialmente cuando el tratamiento con el fármaco es muy prolongado [69]. Puede causar hemólisis en individuos con deficiencia de G6PD.

✓ **Amodiaquina**

Es una 4-aminoquinoleína que fue desarrollada entre 1941 y 1945. Su actividad es comparable con la CQ.

*Mecanismo de acción:* Actúa de forma similar a la CQ, lo que explica la resistencia cruzada que se observa entre ambos fármacos.

*Aplicaciones terapéuticas:* Actúa directamente contra los esquizontes eritrocíticos y gametocitos de *Plasmodium* spp. Se transforma en desetilamodiaquina la cual es responsable de la acción AM.

*Reacciones adversas:* El fármaco es bien tolerado, pero existe referencias de que puede producir agranulocitosis y hepatitis, lo que ha reducido mucho su uso. En la actualidad no está recomendada por la OMS. No se encuentra comercializada en España [64].

#### ✓ **Quinina**

Durante muchos años fue el único fármaco efectivo para la quimiopprofilaxis y el tratamiento de la malaria. La quinidina presenta una estructura similar a excepción de la estereoconfiguración del grupo alcohol secundario [22].

*Mecanismo de acción.* Parece similar al de CQ.

*Aplicaciones terapéuticas:* Presenta actividad esquizontocida sobre todas las especies de *Plasmodium* y gametocitocida sobre *P. vivax* y *P. malariae* [22]. Debido a su toxicidad fue reemplazada por otros compuestos, pero en la actualidad ha vuelto a utilizarse especialmente en el tratamiento de la malaria severa, particularmente contra las formas resistentes a otros antipalúdicos.

*Reacciones adversas:* Estas no son graves siempre que las concentraciones plasmáticas no superen los 5 mg/L, consisten en trastornos gastrointestinales (náuseas, vómitos) y neurológicos (cefaleas, vértigos). Puede aparecer cinchonismo leve o moderado frecuentemente después del tercer día de tratamiento [64], caracterizado por acúfenos, cefalea, disminución de la agudeza visual y auditiva, vértigos, náuseas y diarrea. Este proceso adquiere una especial gravedad cuando se alcanzan concentraciones superiores a 10 mg/L en plasma [22]. En casos de administración intravenosa es necesario monitorizar la glucemia (riesgo de hipoglucemia), la frecuencia cardíaca (arritmias) y la presión arterial (hipotensión).

#### ✓ **Mefloquina**

Entre muchas de las 4-quinolina-metanoles estudiadas por su semejanza estructural con la quinina, se advirtió que la mefloquina, era un compuesto inocuo y muy eficaz contra cepas de *P. falciparum* resistentes [22].

*Mecanismo de acción:* Se basa en la hipótesis de la base débil de la CQ (extensiva también a la mefloquina), actuando por incremento del pH de la vacuola alimentaria del parásito. El otro modo de acción está basado en cambios ultraestructurales observados *in vitro*, observándose una alta afinidad por el hemo libre [22], formando complejos ácidos que se unen a los fosfolípidos de las membranas de eritrocitos infectados [64].

*Aplicaciones terapéuticas:* En viajeros y personas que tengan riesgos exponerse a *P. falciparum* resistente, la mefloquina es el compuesto de elección en la profilaxis. No existen especialidades con este principio activo comercializadas en España. Se ha unido la mefloquina a otros medicamentos donde las combinaciones más exitosas son las formadas por artesunato/mefloquina y artemeter/mefloquina [22]. Han aparecido cepas de *P. falciparum* resistentes a mefloquina en el sureste asiático y en la cuenca del Amazonas cuyas bases moleculares parecen ser distintas a las de la CQ, ya que la mefloquina es activa frente a cepas de *P. falciparum* resistentes a la CQ.

*Reacciones adversas:* Se pueden presentar vómitos, discinesia, náuseas, anorexia y malestar general [22].

#### ✓ **Halofantrina**

La halofantrina o WR 171,669, es un hidroximetilfenantreno y fue sintetizada por Colwell [22].

*Mecanismo de acción:* Existen estudios que sugieren que la halofantrina interactúa con el hemo, de forma muy similar a la CQ, aunque también causa daño mitocondrial. Además, su principal acción es inhibir la bomba de protones presente en la célula hospedadora del parásito, aunque conjuntamente, es un poderoso inhibidor selectivo de la subunidad catalítica del AMP-cíclico dependiente de proteína-quinasa [22].

*Aplicaciones terapéuticas:* Se utiliza más bien como sustancia alternativa a la quinina y la mefloquina, para combatir la malaria aguda, causada por cepas de *P. falciparum*, resistente a varios fármacos. Los ensayos clínicos realizados demuestran que es eficaz contra *P. vivax*, y en muy pocos casos de *P. malariae* y *P. ovale*. Los parásitos maduros son particularmente vulnerables a su acción. En Tailandia se ha descrito resistencia cruzada con la mefloquina [22].

*Reacciones adversas:* Su uso está restringido por el riesgo de cardiotoxicidad.

✓ **Primaquina**

La actividad plasmocida del azul de metileno, descubierta por Erlich en 1891, se aprovechó posteriormente para sintetizar fármacos AMs del tipo 8-aminoquinolínico. La primaquina, ha sido el fármaco de mayor uso de todos los derivados 8-aminoquinolínicos [22].

*Mecanismo de acción:* La dificultad del cultivo *in vitro* de *P. vivax*, hace que se conozca muy poco acerca del mecanismo de acción de estos compuestos, sobre todo, la explicación de por qué son mucho más activas contra las formas tisulares y los gametos, y no así, con las formas eritrocíticas asexuadas de *Plasmodium* spp. La primaquina puede transformarse en una especie electrófila, que actúa como mediador de oxidoreducción [22] que interfieren con la ubiquinona y ubiquinona reducida, inhibiendo así la síntesis de poliaminas al interferir con el transporte de electrones en el parásito [70]. Esta propiedad tal vez contribuya a los efectos AMs, ya que genera especies de oxígeno reactivas, o puede interferir en el transporte electrónico dentro del parásito [22].

*Aplicaciones terapéuticas:* La primaquina se utiliza más bien para tratar la malaria recidivante producida por las especies de *P. vivax* y *P. ovale*, aunque también es efectiva en las etapas tisulares del *P. falciparum*. Las 8-aminoquinolinas poseen notable efecto gametocida frente a las cuatro especies de *Plasmodium*. La primaquina debe administrarse con un esquizonticida eritrocítico, por lo general se combina con CQ evitando la resistencia al fármaco. La actividad profiláctica de la primaquina es bien conocida, pero debido a su toxicidad es poco aceptada [22].

*Reacciones adversas:* Se observa hemólisis en personas que tienen deficiencia de la enzima G6PD [22].

✓ **Antifolatos: Proguanil y Cloroproguanil**

La cloroguanida (Paludrine), conocida comúnmente como proguanil, es una biguanida derivada de la pirimidina que se sintetizó en 1945 en Inglaterra [71].

*Mecanismo de acción:* La actividad AM del proguanil reside en su metabolito: el cicloguanil [71]. El proguanil inhibe la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR) del parásito, bloqueando la síntesis de ácido fólico y por consiguiente la síntesis de ADN y el agotamiento de los cofactores folatos. *Plasmodium* requiere el tetrahidrofolato como cofactor, para sintetizar las pirimidinas *de novo* debido a que los parásitos no tienen una ruta metabólica para sintetizar las pirimidinas. La unión del fármaco a la enzima del

parásito es cien veces mayor que la observada en los mamíferos. Generalmente se combinan con inhibidores de la enzima dihidropterato sintetasa (DPHS) y disminuyen la disponibilidad de dihidrofolato por lo que se aprovecha el sinergismo que se establece [22].

*Aplicaciones terapéuticas:* Es utilizado en la profilaxis y en la cura supresiva de la malaria por *P. falciparum* en fase de esporozoíto. Se puede emplear combinado con la atovacuona y puede ser utilizado como tratamiento en áreas endémicas donde se manifieste resistencia a CQ. Su eficacia clínica se encuentra muy limitada al rápido desarrollo de cepas de *P. falciparum* resistentes que se extienden por el oeste de África y Sudeste asiático [64].

*Reacciones adversas.* Puede ocasionar diarrea y náuseas ocasionalmente. Este fármaco se considera seguro para su utilización en el embarazo.

#### ✓ **Pirimetamina y Sulfadoxina**

La pirimetamina (Daraprim) pertenece a la familia de las diaminopirimidinas. La combinación antifólica de pirimetamina + sulfadoxina, una sulfonamida de acción prolongada, se ha utilizado en la profilaxis y tratamiento supresivo de la malaria humana, especialmente en aquellas ocasionadas por cepas de *P. falciparum* resistentes a CQ [71].

*Mecanismo de acción:* La pirimetamina produce una inhibición selectiva de la DHFR y a su vez las sulfonamidas inhiben la enzima DPHS; por lo que actúan sinérgicamente inhibiendo la síntesis de ácido fólico, como ha sido explicado anteriormente [64].

*Aplicaciones terapéuticas:* Su uso está restringido al tratamiento supresor de la malaria producido por *P. falciparum* resistente a la CQ, en regiones de África, donde no haya surgido resistencia.

*Reacciones adversas.* Pueden aparecer anomalías hematológicas causadas por la inhibición de la síntesis de ácido fólico [71]. En el 1% de las personas bajo tratamiento con sulfamidas, pueden manifestarse reacciones adversas como anorexia, náuseas y vómitos [22].

#### ✓ **Artemisina y sus derivados**

El compuesto aislado como principio activo de la planta *Artemisia annua* L. resultó ser una lactona sesquiterpénica, que contenía en su interior un endoperóxido.

*Mecanismo de acción:* Causa cambios morfológicos, que conllevan a una destrucción de la vacuola alimentaria del parásito aunque la acción de la artemisinina no es debido al efecto directo en la estructura lipídica de la membrana, sino que está mediado por radicales libres. El hierro del hemo reacciona con la artemisinina y comienzan a generarse especies radicálicas, producto de la ruptura hemolítica del puente endoperóxido [72] que provocan alteraciones en las proteínas de membranas. Estudios muy recientes apuntan que la artemisinina es un inhibidor de la SERCA (Ca<sup>2+</sup> ATPasa del retículo sarcoplasmático) de *Plasmodium*, provocando daños en la vacuola digestiva del parásito [73].

*Aplicaciones terapéuticas:* La artemisinina y sus derivados son esquizotomicidas hemáticos muy potentes consiguiendo una respuesta terapéutica más rápida que cualquier otro AM. Actúan frente a cepas multirresistentes de *P. falciparum* [22]. Debido a que su vida media es muy corta, si se usa como monoterapia durante cortos periodos de tiempo son frecuentes las recrudescencias, por lo que, para evitarlas, deben usarse en combinación con otro AM [64]. La OMS recomienda que las monoterapias orales a base de artemisinina se retiren del mercado y se sustituyan por TCA. Se han descubierto indicios de resistencia a las artemisininas en cuatro países de la subregión del Gran Mekong: Camboya, Myanmar, Tailandia y Vietnam. Pese a los cambios observados en la sensibilidad de los parásitos a las artemisininas, la eficacia clínica y parasitológica de las TCA sigue siendo alta en la mayoría de contextos. No obstante, en la provincia de Pailin (Camboya) se han registrado elevados índices de fracaso del tratamiento con varias TCA, en especial la dihidroartemisinina-piperaquina [31].

*Reacciones adversas:* No se han descrito.

✓ **Atovacuona:**

Es una hidroxinaftoquinona.

*Mecanismo de acción:* Su actividad es específicamente en la cadena respiratoria del parásito, uniéndose al sitio de oxidación del coenzima Q en el citocromo B del complejo III [74]. Su diferente mecanismo de acción hace que actúe eficazmente frente a cepas multirresistentes de *P. falciparum*.

*Aplicaciones terapéuticas:* Posee efecto sinérgico con el proguanil, por lo que su asociación atovacuona-proguanil posee gran actividad frente a *P. falciparum*, permitiendo su uso tanto para el tratamiento como la profilaxis del viajero a zonas de

paludismo resistente a la CQ. Esta formulación esta comercializada en España (Malarone).

*Reacciones adversas:* En general se tolera mejor que otros regímenes quimioprolácticos de la malaria, por lo que hay una menor tasa de abandono por efectos secundarios. No se recomienda su uso en el embarazo y lactancia [64].

- **Nuevas estrategias y perspectivas en el desarrollo de antimaláricos**

Con el creciente conocimiento de la bioquímica y la genómica del parásito se han identificado una serie de procesos o rutas metabólicas que constituyen potenciales dianas terapéuticas [9]. Algunos de los ejemplos más significativos de compuestos en fase de desarrollo son: [22]

1. Inhibidores de proteasas
2. Inhibidores de la síntesis de ácidos grasos
3. Inhibidores de la ruta de biosíntesis de isoprenoides
4. Compuestos que interfieren con el transporte y el metabolismo de fosfolípidos
5. Inhibidores del metabolismo mitocondrial

- ✓ **Inhibidores de proteasas**

Dado que la parte proteica de la Hb debe ser degradada a los aminoácidos correspondientes para ser utilizados como fuente para la síntesis de proteínas por parte del parásito, la inhibición de este proceso resulta letal. Entre las enzimas involucradas en este proceso, además de la hemo-polimerasa (ya mencionada anteriormente), se encuentran las cistein-proteasas (falcipaínas). Se han descrito falcipaínas de tipo 1, 2, 2' y 3, pero la inhibición de la falcipaína 2 y la falcipaína 3 provoca la incapacidad en el parásito para degradar la Hb provocando su muerte. Se identificaron inicialmente diferentes clases químicas de inhibidores, como azepanonas, *N*-acilhidrazonas y nitrilos aromáticos pero los últimos resultaron ser los de mayor interés [75].

Otras enzimas involucradas son las aspartil-proteasas, conocidas comúnmente como plasmepsinas I y II (Plm I y Plm II) que digieren la Hb en la vacuola alimentaria del parásito malárico, además de la hemo-polimerasa y de la falcipaína. Ambas plasmepsinas tienen un alto grado de homología en sus secuencias (73% idéntica), y están estrechamente relacionadas con la estructura de la catepsina D humana [76].

✓ **Inhibidores de la biosíntesis de ácidos grasos**

En *Plasmodium* existe un sistema denominado tipo II (FASII) en el que cada reacción en el proceso de biosíntesis está catalizada por una proteína independiente monofuncional. Por el contrario, en células de mamíferos la síntesis está mediada por una proteína multifuncional conocida como ácido graso sintetasa de tipo I. Inhibidores de enzimas de esta ruta son el triclosán y la tiolactomicina, un metabolito secundario de hongos y están en desarrollo nuevos compuestos con potencial terapéutico [22].

✓ **Fármacos dirigidos a la ruta de biosíntesis de isoprenoides**

La síntesis del isopentenil pirofosfato, es un proceso que tiene lugar a través de un conjunto de reacciones conocidas como la ruta DOXP (1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato) o ruta independiente de ácido mevalónico, ocurre en el apicoplasto y se encuentra ausente en células de mamíferos [22]. La fosmidomicina, un antibiótico natural producido por *Streptomyces lavendulae*, inhibe de manera específica la enzima DOXP reductoisomerasa, por lo que ha demostrado ser un buen tratamiento en el control de la malaria. Diferentes esfuerzos en la búsqueda de compuestos derivados de la fosmidomicina con mayor poder inhibitorio, mayor absorción gastrointestinal y menos efectos colaterales indeseables están actualmente en progreso [77]. En relación con esta ruta igualmente se ha descrito que inhibidores de la farnesil difosfato sintetasa, también tienen capacidad para inhibir el crecimiento de *Plasmodium*. Estos compuestos pertenecen al grupo de los bisfosfonatos y fueron desarrollados originalmente para el tratamiento de la osteoporosis, pero posteriormente han demostrado un enorme potencial antiprotozoístico [78].

✓ **Inhibidores del metabolismo de fosfolípidos**

Uno de los componentes principales de las membranas del parásito es el fosfolípido fosfatidilcolina cuya síntesis a su vez depende de la incorporación de colina exógena a partir de la sangre. Distintos análogos de la colina exhiben una potente actividad AM inhibiendo el transporte de colina que tiene lugar a través de un transportador específico localizado en la membrana del parásito [79]. Algunos de estos análogos también parecen interferir con la formación de hemozoína [80].

✓ **Inhibidores del metabolismo mitocondrial**

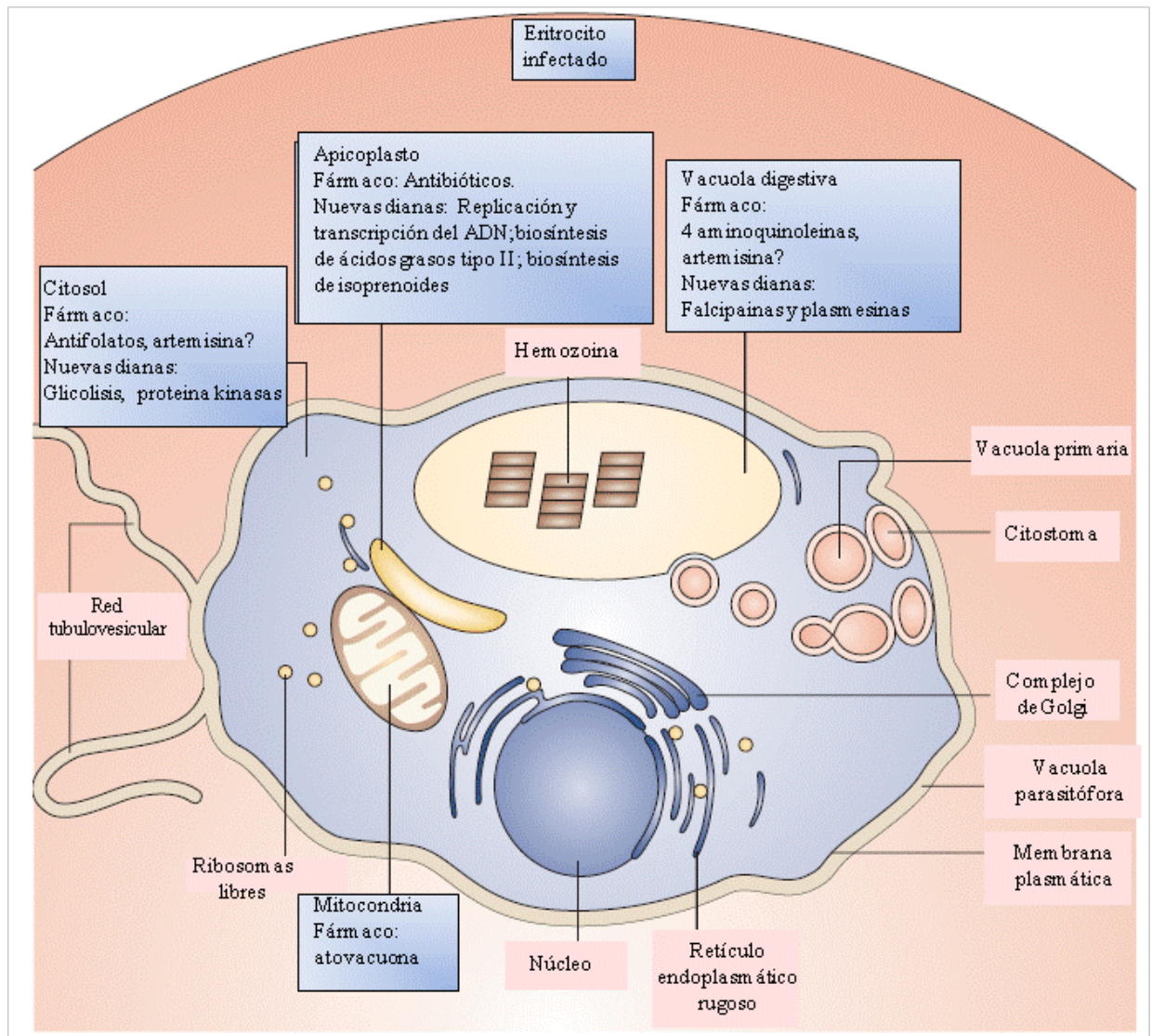
Las fases intraeritrocíticas tienen un metabolismo mitocondrial activo estando presentes todas las enzimas implicadas en el ciclo de los ácido tricarbónicos y determinados componentes de la cadena de transporte electrónico. Así la cadena

respiratoria del parásito constituye un blanco de acción de fármacos siendo ejemplos de compuestos que actúan a este nivel la atovaquona [74].

La enzima que vincula el metabolismo energético con la síntesis de pirimidinas es la dihidroorotato deshidrogenasa (DHODH). En *Plasmodium*, la DHODH es una proteína mitocondrial que lleva a cabo la síntesis *de novo* de pirimidinas. Aquellos fármacos que inhiban la cadena transportadora de electrones (mencionados anteriormente) afectarán también el crecimiento del parásito por inhibición de la síntesis de pirimidinas [81].

En definitiva, existen una serie de nuevas dianas potenciales que desde el punto de vista de su papel en la viabilidad y su capacidad de inhibición constituyen nuevas alternativas al descubrimiento de AMs. Algunos de los inhibidores en estudio corresponden a fármacos desarrollados para otros fines (antitumorales, antibacterianos) y que en una aproximación de lo que se conoce como química “*piggy back*” están aprovechando la información existente para desarrollar nuevos compuestos [22].

En la Figura 5 se muestra un resumen de los principales mecanismos de acción descritos anteriormente.



**Figura 5.** Eritrocito infectado con *P. falciparum* en estadio de anillo, sus compartimentos celulares y el sitio de acción de los principales fármacos AMs.

Editado de: [www.nature.com/reviews/drugdisc](http://www.nature.com/reviews/drugdisc)

### 2.1.12. Resistencia a fármacos antipalúdicos

La resistencia a fármacos antipalúdicos se manifiesta con mayor frecuencia en *P. falciparum*. Sólo esporádicamente se han descrito casos de resistencia en *P. vivax*; por este motivo, la CQ permanece como el medicamento de elección para *P. vivax* [82]. Aunque el problema de la resistencia a los fármacos está presente en todas las zonas endémicas de paludismo, las áreas reconocidas actualmente como más afectadas son la península de Indochina y la región del Amazonas en Suramérica [62]. Esto se relaciona

directamente con niveles plasmáticos subterapéuticos de los fármacos provocados por conductas terapéuticas y profilácticas incontroladas e irresponsables. En estas áreas han erradicado la mayoría de las formas sensibles del parásito y por consiguiente, aquellos parásitos que desarrollaron resistencia a través de su variación natural o a través de mutaciones tienen una clara ventaja biológica [62].

Esta resistencia ha sido relacionada a varios mecanismos: mutación esporádica de los microorganismos, con adaptación del agente patógeno al fármaco; activación de caminos metabólicos distintos para realizar la glicólisis aerobia y síntesis de aminoácidos; neutralización del fármaco por secreciones producidas por el protozoo ó formación de metabolitos que inactivan el fármaco [83].

En el caso de la pirimetamina se ha asociado la resistencia con mutaciones puntuales en el codon Asn-108 del gen que codifica para DHFR de *P. falciparum* [84]. Igualmente, los genes *pfcr1* (*P. falciparum* chloroquine resistance transporter) y *pfmdr1* (*P. falciparum* multidrug resistance 1), codifican proteínas trans-membrana de transporte en la vacuola digestiva del parásito. Estas se relacionan con resistencia y fallo terapéutico a la CQ, en el caso de *pfcr1* [10, 85], y con resistencia a CQ y a diversos medicamentos, en el caso de *pfmdr1* [86]. El gen *pfcr1* es responsable de sintetizar una proteína transmembrana que se encarga de expulsar del interior del lisosoma del parásito a las moléculas de CQ, impidiendo el daño a las membranas que ocasiona el medicamento [87]. En el caso de la resistencia a la artemisina y sus derivados, se ha involucrado con la misma, una mutación en el gen S769N de la *PfATP6*, que es la diana fundamental para este tipo de fármacos [73].

Afortunadamente el problema de las políticas terapéuticas y profilácticas irresponsables ha sido reconocido y ya se están tomando precauciones en este sentido, por ejemplo, en muchos países se ha ilegalizado la venta de CQ y otros fármacos AMs sin su correspondiente prescripción médica. Es obvio que la resistencia a los fármacos antipalúdicos es un fenómeno que se ha desarrollado cierto tiempo después de la introducción de los mismos, por lo que ha sido un problema continuo en los últimos años [62]. En un número creciente de países del sureste asiático se ha observado la resistencia a la artemisinina, un componente fundamental de los fármacos utilizados en el tratamiento del paludismo producido por *P. falciparum*. Se ha informado igualmente de resistencia a los insecticidas piretroides utilizados en el tratamiento de las redes mosquiteras y los más usados para la fumigación intradomiciliaria en 27 países

africanos y en 41 de todo el mundo. Si no se gestiona de un modo adecuado, esta resistencia constituye una amenaza potencial para futuros avances en el control del paludismo. Los casos confirmados de paludismo por *P. falciparum* sin complicaciones se deben tratar con TCA. El paludismo por *P. vivax* se debe tratar con CQ allí donde dicho fármaco sea eficaz, o con una TCA adecuada en las zonas donde *P. vivax* sea resistente a la CQ. El tratamiento del paludismo por *P. vivax* debe combinarse con la administración de primaquina durante 14 días para prevenir una recaída [31].

La quimioprofilaxis, puede tener un efecto preventivo importante, siempre que se administre adecuadamente; sin embargo, existe el riesgo de que la misma induzca resistencia de los parásitos a los antimaláricos [88].

En la actualidad la terapia antimalárica combinada se considera como mecanismo para retardar la posible aparición de resistencia en las poblaciones circulantes de parásitos. La combinación a considerar varía, en dependencia de la especie de *Plasmodium*, la zona geográfica y la aparición de resistencia; teniendo entre las opciones mefloquina+artemeter en regiones como el sureste de Asia, sulfadoxina/pirimetamina+CQ, o sulfadoxina/pirimetamina+amodiaquina en África Sub-sahariana. Recientemente dos nuevas combinaciones contempladas son clorproguanil+dapsona y proguanil+atovuona [89]. Todas estas opciones terapéuticas deben ser consideradas de acuerdo con la resistencia medicamentosa predominante, a la tasa de transmisión del área, a las características individuales de la enfermedad así como a los parásitos responsables, en caso de ser una infección mixta [90].

## 2.2. Métodos *in silico* para cribado de fármacos

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 [91]. En este sentido, el uso de técnicas de CV de bibliotecas químicas ha emergido como una nueva alternativa [92] a los ineficaces y costosos ensayos experimentales basados en la filosofía de “prueba y error” [93]. Estas técnicas computacionales se usan para seleccionar/identificar un número reducido de compuestos potencialmente activos para evaluarlos experimentalmente.

### 2.2.1. Cribado virtual basado en ligandos (CVBL)

El paradigma del CVBL está relacionado con el hecho de que las propiedades físicas, físico-químicas, químicas y biológicas de los compuestos orgánicos dependen en último término de la estructura molecular. Estos métodos se han mostrado de gran utilidad cuando no se dispone, de la información contenida en la estructura del receptor, son de bajo costo computacional y, por tanto, son muy utilizados en el descubrimiento de fármacos [15].

- **Filtros *drug-likeness***

El proceso de desarrollo de un fármaco es largo, complejo y de baja efectividad, siendo las principales causas de fracaso, las pobres propiedades farmacocinéticas, toxicidad en animales y los efectos adversos en los seres humanos [15]. Por esto como primer paso en un CV, es útil la aplicación de filtros que eliminen aquellas estructuras que posean propiedades no adecuadas para un fármaco en cuanto a los grupos funcionales que presentan y a sus propiedades físicas (*drug likeness*) [12]. Es decir, estos métodos consideran si la molécula está dentro de los estándares de relevancia biológica en cuanto a los grupos funcionales que presenta y sus propiedades fisicoquímicas. Así, se habla y distingue entre compuestos *drug-like* y los *non-druglike*. El método más rápido para evaluar las propiedades *drug-likeness* de un compuesto es la aplicación de "reglas" ya que los valores asociados con las reglas son rápidamente obtenidos a partir de la estructura utilizando programas computacionales [15].

La "regla de los cinco" de Lipinski [94, 95] (Ro5) es una de las más utilizadas. Esta filtra las moléculas en función de su peso molecular ( $MW \leq 500$  g/mol), su lipofilia, medida en función del coeficiente de reparto octanol/agua ( $LogP \leq 5$ ) y el número de donadores ( $nHBD_{Don} \leq 5$ ) y aceptores ( $nHB_{Ac} \leq 10$ ) de puentes de hidrógeno. Se considera que un compuesto que no satisfaga dos o más de estos criterios, tiene una baja probabilidad de tener una absorción intestinal y por consiguiente de convertirse en un buen fármaco con vía de administración oral. Además, normalmente esta regla se extiende con la condición de que el número de enlaces rotables ( $nRotB$ ) sea inferior a 10. Sin embargo, se ha encontrado que los márgenes de Lipinski son demasiados estrictos y normalmente se aplican valores de corte algo superiores, principalmente en lo referente al peso molecular y a la lipofilia. Otros estudios, como el realizado por Oprea (2000), establecen márgenes de variabilidad de estos y otros descriptores. En este

estudio, se evidencia que el valor de  $MW$  de gran número de fármacos excede a 500 g/mol y también el valor de  $LogP$  de muchos fármacos supera el valor de 5 [96]. Además, en otro estudio se proponen reglas adicionales,  $nRotB \leq 5$  para limitar su libertad conformacional, el área de superficie polar ( $PSA$ )  $\leq 120 \text{ \AA}^2$  y la solubilidad acuosa ( $logS$ )  $\geq -4$  mol/l [97]. Veber y col. (2008) propusieron que la flexibilidad molecular, el  $PSA$  y el número de enlaces de hidrógeno son descriptores importantes, y establecieron  $PSA \leq 140 \text{ \AA}^2$ ,  $nRotB \leq 10$  o  $(nHBDon + nHBAC) \leq 12$  [98]. Recientemente, Monge y col. (2006) [99], incluyeron otros filtros para evaluar la propiedades *drug-likeness* y establecieron la siguiente regla:  $(100 \leq MW \leq 800 \text{ g/mol}^{-1}$ ;  $logP \leq 7$ ;  $nHBAC \leq 10$ ;  $nHBDon \leq 5$ ;  $nRotB \leq 15$ ; que no existan funciones reactivas; número de átomos de halógeno  $\leq 7$ ; cadenas alquílicas  $\leq -(CH_2)_6CH_3$ ; que no existan cadenas perfluoradas:  $-CF_2CF_2CF_3$ ; que no existan anillos con más de 7 miembros; que posean al menos un átomo de N o O. Finalmente, Vieth y col. (2004) [100] observaron la diferencia en las propiedades de los medicamentos administrados por diferentes vías y confirmaron que los fármacos orales tienen propiedades asociadas con menos valores de  $MW$ , de  $nHBDon$ ,  $nHBAC$  y  $nRot$  [15, 100].

- **Búsqueda de similitud**

La búsqueda de similitud puede ser utilizada también en el CVBL e identifica las moléculas de la base de datos que son más similares a los compuestos de referencia, utilizando alguna definición cuantitativa de la similitud estructural intermolecular [101, 102]. Actualmente, muchas implementaciones de los métodos de similitud son de bajo costo computacional, por lo que, la búsqueda en grandes bases de datos puede realizarse rápidamente, demostrando ser extremadamente útil en el campo farmacéutico [103].

Los dos factores que participan en una búsqueda de similitud son los descriptores utilizados y la métrica empleada para establecer la comparación entre pares de moléculas (medidas o coeficientes de similitud). Estas comparaciones permiten ordenar las moléculas de la quimioteca en orden decreciente de similitud con la(s) molécula(s) de referencia. En este sentido, el resultado final es una lista ordenada en la que las estructuras más similares a la(s) estructura(s) de referencia, los vecinos más cercanos, se encuentran en la parte superior de la lista y serán los que tienen mayor probabilidad de ser de interés para el usuario [15, 104].

Son muy utilizados, generalmente, los descriptores basados en fragmentos 2D y 3D. Estos se basan en cadenas de *bits* de dimensión constante, en las que se indica la ausencia (0) o presencia (1) de una determinada característica, denominadas huellas digitales o *fingerprints*. Las huellas estructurales, originalmente desarrolladas para la búsqueda de subestructuras, utilizan un diccionario de fragmentos para asignar cada uno de los *bits* a un posible fragmento, de manera que se codifica su ausencia o presencia. Las huellas MACCS, un subconjunto del set *MDL Information Systems*, son las más usadas de este tipo, que cuentan con 166 *bits* basados en los grupos funcionales simples y anillos [15].

Existen muchos coeficientes de similitud, [15] siendo el coeficiente de *Tanimoto*, el más utilizado para los datos binarios, mostrando un buen comportamiento en varios estudios. Este se basa en el número de *bits* comunes en ambas moléculas dividido por el número de *bits* en cualquier molécula [105, 106].

- **Estudios de Relaciones Cuantitativas Estructura-Actividad (QSAR, por sus siglas en inglés, *Quantitative Structure-Activity Relationships*)**

La industria farmacéutica ha reorientado las estrategias de búsqueda hacia métodos que permitan una selección o diseño racional de nuevos compuestos. En dicho sentido, los estudios QSAR constituyen enfoques cuantitativos dirigidos a encontrar relaciones entre la estructura molecular y las actividades moleculares medidas o calculadas. Los estudios QSAR se han utilizado ampliamente en la modelización de disímiles propiedades moleculares de naturaleza física, química y biológica [15, 107], siendo el enfoque más utilizado en el diseño de fármacos. En estos métodos, se utilizan múltiples descriptores moleculares (DMs) de la estructura química combinados con la aplicación de técnicas quimiométricas para derivar modelos [15].

Los métodos QSAR han emergido no sólo como una vía para el descubrimiento de compuestos con una actividad deseada, sino además como un método con aplicaciones al estudio del mecanismo de acción de los mismos [108].

Los pasos comunes de un estudio QSAR constan de:

1. Formulación del problema
2. Parametrización cuantitativa de la estructura molecular
3. Medición de la propiedad de interés (efectos biológicos u otros)

4. Elección del tipo de modelo QSAR
5. Selección de los compuestos (diseño estadístico de las series)
6. Análisis matemático de los datos y validación (interna y externa) de los modelos obtenidos
7. Interpretación de los resultados y aplicación de los modelos desarrollados a los procedimientos de CVBL [109].

Sin embargo, el desarrollo de cualquier estudio QSAR, es un ciclo iterativo.

#### ✓ Regulaciones de los métodos QSAR

En febrero de 2007, los países miembros de la OCDE (siglas en inglés de la *Organización para Desarrollo y Cooperación Económica*) aprobaron los principios para la validación de modelos QSAR con fines regulatorios, que son conocidos actualmente como los Principios de la OCDE [110]. De acuerdo con esto, un modelo QSAR debería estar asociado con la siguiente información: 1) Un punto de medición definido; 2) Un algoritmo no ambiguo; 3) Un dominio de aplicación definido; 4) Medidas apropiadas de bondad de ajuste, robustez y predictibilidad; 5) Una interpretación mecanística, *si es posible* [15].

#### ✓ Técnicas de clasificación

El objetivo de estas técnicas es calcular una regla de clasificación (y, posiblemente, límites de clases, o probabilidades de pertenencia a una clase), basados en los objetos de la serie de entrenamiento y aplicar esta regla para asignar una de estas clases, a objetos de clases previamente desconocidas. Hoy en día, hay muchas técnicas que se demuestra que describen bien la actividad biológica [15].

El ADL resulta de elección entre muchos métodos estadísticos para obtener las funciones de clasificación debido a su simplicidad, su robustez matemática y su buen comportamiento en diferentes problemas. Este ha sido uno de los más utilizados en el descubrimiento y diseño de fármacos; además su uso ha sido ampliamente descrito [111]. Esta técnica se basa en la asignación de un compuesto a un grupo (activo o inactivo), conocidas sus características mediante una función discriminante, que no es más que una ecuación lineal con una variable dependiente la cual representa la pertenencia a un grupo determinado [93]. Actualmente existen técnicas paramétricas, no paramétricas, lineales y no lineales que describen adecuadamente la actividad biológica; pero el ADL sigue teniendo un amplio uso en ciencia [15, 16].

Existen varias herramientas para llevar a cabo la validación de los modelos QSAR, entre las que se encuentran: 1) Aleatorización de la variable respuesta (*Y-Randomization*), 2) validación cruzada (VC), 3) división de la base de datos en serie de entrenamiento (SE) y serie de predicción (SP) y 4) confirmación del poder predictivo utilizando SP externas [93].

Entre los numerosos programas que se utilizan para el cálculo de DMs, el programa **TOMOCOMD** [112] (Diseño Computacional Topológico Molecular, siglas en inglés), y específicamente el módulo **CARDD** (siglas en inglés de Diseño Racional de Fármacos Asistido por Ordenador), se utiliza ampliamente en la obtención de modelos QSAR que describen adecuadamente propiedades o actividades farmacológicas de los ligandos a partir de la estructura química [93]. Los DMs implementados en este programa, se conocen actualmente como QuBiLS-MAS, y aplican nuevos métodos grafo-teóricos para el diseño molecular de compuestos orgánicos potencialmente bioactivos [113]. La asociación de estos DMs con técnicas estadísticas como la Regresión Lineal Múltiple y el ADL, han posibilitado el descubrimiento de nuevos compuestos antibacterianos [114], antihelmínticos [115], AMs [116], trichomonida [117], tripanocida [118], e inhibidores de la enzima tirosinasa [15], entre otros, mediante la utilización del CVBL.

- **Sistemas de multclasificadores (SMC)**

En la literatura internacional, se refieren a multclasificadores como conjuntos de clasificadores diferentes que realizan predicciones que se fusionan, y se obtiene como resultado la combinación de cada una de ellas. Los SMC tienen como fundamento principal que son más exactos que los clasificadores individuales, pues la decisión combinada toma ventaja sobre las decisiones individuales de cada clasificador [119, 120]. Existe gran diversidad de diseños de clasificadores; antiguamente, el objetivo era encontrar el mejor clasificador; actualmente, es sacar el mejor provecho de la gran variedad que existe para obtener mayor eficiencia y precisión.

Para construir multclasificadores se necesitan dos etapas:

- ✓ La primera, teniendo en cuenta la aplicación específica, considera qué tipo y cuántos multclasificadores son necesarios para analizar un problema determinado, y realizar el diseño de los mismos.

✓ La segunda etapa trata el problema de cómo combinar los resultados obtenidos por los multclasificadores para obtener el resultado más óptimo.

La efectividad del sistema multclasificador dependerá de que ambas etapas de diseño, sean concebidas de forma conjunta [119]. Para realizar la combinación de las decisiones individuales de los clasificadores, se proponen en la literatura varias estrategias de combinación, siendo las más usadas: la selección y la fusión de clasificadores [121, 122]. La selección es la simple elección del “mejor” clasificador para una instancia determinada. La fusión, por otro lado, se basa en combinar, mediante alguna función, las salidas de los diferentes clasificadores. Este trabajo estará basado en la estrategia de fusión que asume que todos los clasificadores son competitivos y complementarios (igualmente expertos). Por este motivo, cada uno de ellos emite una decisión respecto a cada patrón de prueba que se presenta [122]. También un SMC puede ser entrenado (voto ponderado) cuando le es necesario un entrenamiento adicional (reentrenamiento o entrenamiento reforzado) para la obtención del resultado final o no-entrenado (voto no ponderado), en otro caso [113]

Algunos autores plantean que no hay una medida de diversidad involucrada de forma explícita en los métodos de generación de clasificadores, aunque asumen que la diversidad es el punto clave en cualquiera de los métodos [123, 124]. Ellos estudian la correlación de medidas entre pares ( $X_i, X_j$ ) o grupos de clasificadores y la precisión del sistema, a través de una recopilación de distintas medidas propuestas para valorar diversidad, concluyendo que tan sólo las medidas de doble fallo y la medida de desacuerdo están asociadas a la precisión colectiva [119].

### **2.2.3. Análisis de conglomerados (AC)**

El AC es un grupo de métodos para el reconocimiento de similitudes entre los casos (objetos) o entre las variables y destacar algunas categorías como un conjunto de casos similares (o variables) [125]. Estos métodos representan un caso especial del análisis exploratorio de datos, comprendidos de una serie de diferentes "algoritmos de clasificación" y permiten organizar los datos en subsistemas (conglomerados) [126, 127]. Los métodos más populares son los Métodos Aglomerantes Jerárquicos (de Unión Promedio, de Unión Completa, de Unión Simple, de Unión Promedio Ponderado, etc.), y otros métodos populares son los Métodos no-Jerárquicos, tales como el Método de las *K*-Medias y el Método de *Jarvis-Patrick* [15]. En los primeros, cada objeto comienza

dentro de su propio conglomerado y en los pasos posteriores, se unen a los pares más cercanos hasta que se obtiene uno solo que agrupe todas las observaciones. A diferencia de estos, los Métodos no-Jerárquicos carecen de la construcción de árboles. En su lugar, asignan los objetos a conglomerados una vez que el número de estos este especificado [127].

El AC es útil en el CV (fundamentado en el principio de similitud molecular) [128] y en la optimización de bases de datos de compuestos químicos (*database clustering*) [129], así como en la evaluación de la relación mutua entre variables (como medida del grado de similitud/disimilitud de la información codificada), lo cual posibilita la reducción de la dimensionalidad de la data [130].

#### 2.2.4. Cribado virtual en el desarrollo de antimaláricos

Se ha descrito el uso del CV en la búsqueda de fármacos AMs; tal es el caso de estudios de predicción de actividad frente a dianas específicas como el *citocromo bc1* de *P. falciparum* [131]. De la misma forma, con el fin de lograr más eficiencia en la selección de compuestos AMs se han empleado técnicas de HTS, por ejemplo sobre la colección de productos de la GSK, a través de que se han identificado más de 13.000 compuestos activos en cepas de *P. falciparum* [13]. Recientemente se han llevado a cabo estas técnicas para identificar compuestos que actúen frente a dianas farmacológicas novedosas como la enzima mitocondrial NADH quinona oxidoreductasa de *P. falciparum* (*PfNDH2*) [132]. En general, las técnicas de HTS en su conjunto son un sistema robótico complejo que permite la evaluación de centenares de miles de compuestos por semana y permiten identificar los compuestos más activos para la diana propuesta (*hits*), acelerando considerablemente la identificación de compuestos cabezas de serie (*leads*). Pero si no está bien dirigido, puede producir enormes cantidades de datos a una gran velocidad, pero de muy poca utilidad y rentabilidad para el desarrollo de fármacos, requiriendo una inversión considerable para su aplicación [133].

Nuestro grupo de investigación ha llevado a cabo CV de compuestos AMs, empleando índices lineales (IL) [134] e índices cuadráticos (IC) [116, 135]; estos se han llevado a cabo con un número reducido de compuestos, y los modelos generados no han sido obtenidos mediante la combinación de índices (IL, IC y IB). De igual forma no se ha empleado el CV con el enfoque integrador que se propone en esta Tesis, utilizando varios filtros como los mencionados anteriormente. Esto nos permitiría seleccionar los

compuestos más favorables para avanzar en el desarrollo de compuestos AMs, con un menor consumo de recursos.

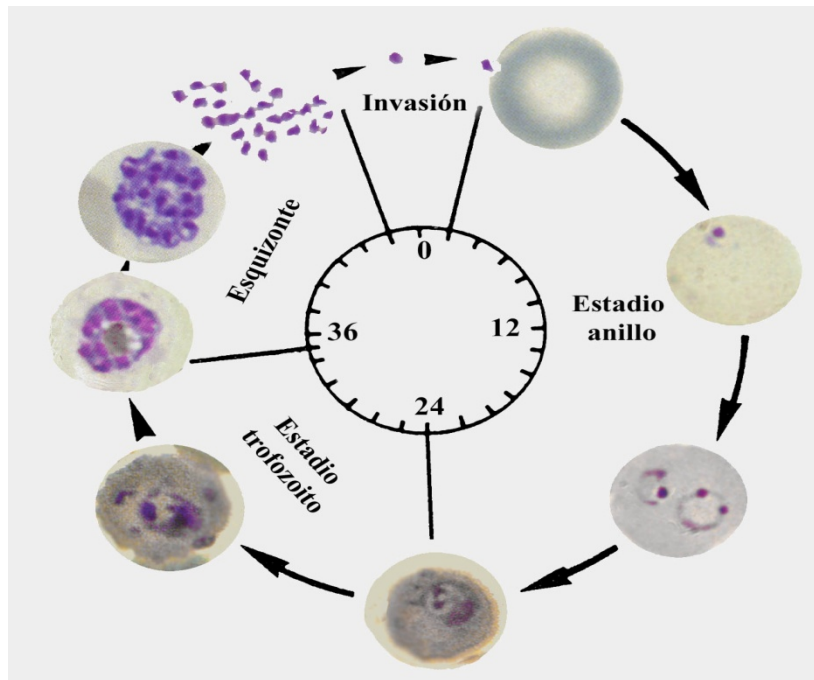
### **2.3. Técnicas de cribado *in vitro* frente a *Plasmodium***

Los estudios de Trager y Jensen (1976) sobre el mantenimiento del cultivo continuo *in vitro* de *P. falciparum* revolucionaron las investigaciones sobre el paludismo humano. Las técnicas de cultivo permitieron que los investigadores de todo el mundo estudiaran los parásitos del paludismo de mayor importancia clínica, además han constituido la base de muchos adelantos en la bioquímica, parasitología, inmunología y quimioterapia del paludismo [136].

El éxito del cultivo de estadios intraeritrocitarios de *P. falciparum* está basado en cuatro aspectos fundamentales:

- 1) El buen conocimiento del ciclo biológico intraeritrocitario del parásito (Figura 6)
- 2) El uso de un medio de cultivo particular, el RPMI (Roswell Park Memorial Institute), suplementado con suero o plasma humano (10-20%).
- 3) La regeneración del medio de cultivo por cambios frecuentes.
- 4) La reducción de la tensión de oxígeno (2-10%) y el incremento del CO<sub>2</sub> (3-5%).

Seguir cuidadosamente estos pasos asegura el crecimiento de los estados intraeritrocitarios de *P. falciparum*.



**Figura 6.** Reloj biológico de *P. falciparum*.

Tomado de: Deharo, E., P. Gautret, *et al.* (2000)

Dentro de las técnicas más empleadas para determinar la actividad antimalárica *in vitro* se encuentran: 1) el método visual [136], 2) el micrométodo radioisotópico [137], 3) los métodos bioquímicos como las pruebas de la LDH [138], de la HRP-2 [139] y 4) el método fluorimétrico [136]. Existen otros métodos particulares que postulan modos de acción como la inhibición de polimerización del grupo hemo [140].

Actualmente, el ELISA-HRP2 es el método de evaluación de sensibilidad *in vitro* para *P. falciparum* más ampliamente usado en el mundo; sin embargo, la descripción de aislamientos con ausencia de esta proteína conduce a la búsqueda de métodos alternativos para esta población de parásitos [139].

Recientemente, los métodos de detección de ácidos nucleicos basado en fluorescencia se han presentado como una alternativa con menor costo y tiempo de ejecución [141]. Estos se basan en la determinación de la fluorescencia emitida por un fluorocromo capaz de insertarse en los ácidos nucleicos de *Plasmodium*. Ejemplos de fluorocromos con estas características son, el Hoechst 33258 [142] y el SYBR-green I [141], que permiten cuantificar el número de parásitos siendo este directamente proporcional a la cantidad de ADN de los mismos [142].

Todos estos métodos determinan la inhibición del crecimiento de los parásitos mediante una medición directa o indirecta cuando éste es sometido a diferentes concentraciones de una sustancia a ensayar.

Las técnicas *in vitro* en la investigación de fármacos con posible actividad antimalárica tienen ventajas como son [136]:

- 1) La capacidad de obtener una información fiable con cantidades pequeñas (microgramos) de material.
- 2) La medición de la actividad intrínseca antimalárica donde no intervienen factores del hospedador.
- 3) La mayor precisión de la medición que generalmente no es posible con sistemas de test *in vivo*.
- 4) La evaluación de un mayor número de compuestos en un experimento, comparado con el método *in vivo*.
- 5) El hecho de no tener problemas de ética.

Además, el elevado costo de los ensayos *in vivo* y las restricciones cada vez mayores en el uso de animales, han dado lugar a que la mayor parte de los ensayos hoy en día utilicen cultivos *in vitro* de parásitos [136].

# *Materiales y Métodos*

---

---

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Método *in silico*

Se utilizaron los DMs implementados en el programa *TOMOCOMD-CARDD* [112] para la parametrización de los datos y el paquete de procesamiento STATISTICA 6.0 [143] para el análisis estadístico. Los modelos se validaron según lo establecido en los principios regulatorios de la OCDE [110].

##### 3.1.1. Construcción de la base de datos

La base de datos se conformó a partir de la literatura con un total de 2.314 compuestos, principalmente del *Handbook of Drugs and their Synonyms* de Martin Negwer [144] y de la base de datos *Merck Index* [145], donde pueden encontrarse los nombres, sinónimos y fórmulas estructurales para cada uno de los compuestos.

En el caso de aquellos compuestos extraídos del PubChem y de artículos científicos [146-158], se tomaron como criterios de inclusión en el grupo de los activos, valores de concentración inhibitoria 50 ( $IC_{50}$ ) en ensayos *in vitro*  $< 20 \mu\text{M}$  y un 100% de animales curados con dosis  $\leq 10 \text{ mg/kg}$  de peso en ensayos *in vivo*. En publicaciones donde la actividad se exprese en potencia relativa, se tomaron como activos aquellos donde esta razón sea mayor que 1.

El conjunto de compuestos inactivos está formado por fármacos con diferentes usos farmacológicos para los cuales no existen datos previos de actividad antimalárica, así como aquellos que no cumplieron los criterios de inclusión mencionados anteriormente. Esta situación puede reflejarse en los resultados de la clasificación de la serie de compuestos inactivos, donde algún compuesto puede ser clasificado por la función de clasificación como AM. Estas moléculas serían “erróneamente” clasificadas como activas en un principio y podían ser escogidas para ser evaluadas experimentalmente.

##### 3.1.2. Cálculos de descriptores moleculares

Empleando el modo de cálculo del programa *TOMOCOMD-CARDD* [112] se calcularon los DMs basados en relaciones de átomos, que fueron: índices cuadráticos [ $q_k(v)$ ,  $q_{kL}(v)$ ,  $q_k^H(v)$ ,  $q_{kL}^H(v)$ ], [159-162] lineales [ $f_k(v)$ ,  $f_{kL}(v)$ ,  $f_k^H(v)$ ,  $f_{kL}^H(v)$ ] [114, 115,

---

134, 163-165] y bilineales [ $\mathbf{b}_k(v_n, z_m)$ ,  $\mathbf{b}_{kL}(v_n, z_m)$ ,  $\mathbf{b}_k^H(v_n, z_m)$ ,  $\mathbf{b}_{kL}^H(v_n, z_m)$ ] [166, 167] estocásticos y no estocásticos, totales y locales ( $L$ ).

Con el objetivo de diferenciar los vértices (átomos) de los grafos moleculares, se consideraron como componentes vectoriales en el cálculo de los DMs, cuatro sistemas de propiedades atómicas, que fueron: valores de masa atómica ( $MW$ ), polarizabilidad atómica ( $P$ ), volumen de van der Waals ( $V$ ) y electronegatividad en la escala de Mulliken ( $E$ ) [168, 169]. En el caso de los índices bilineales se consideraron todas las posibles combinaciones de dichos pesos.

### **3.1.3. Diseño de series de entrenamiento y predicción**

Se evaluó la distribución y diversidad estructural dentro de los grupos de observaciones del total de la base de datos de 2.314 compuestos, mediante un AC o de conglomerados jerárquicos según el procedimiento  $k$ -NNCA (siglas en inglés de Algoritmo de clúster de  $k$ -Vecinos más Próximos) implementado en el paquete de procesamiento STATISTICA 6.0. [93, 143]. Previo al estudio de clúster fueron estandarizadas las matrices de DMs anteriormente calculados. A cada uno de los dos grupos formados se les realizó un segundo AC del tipo  $k$ -MCA (*k-means cluster analysis*). Esto permite dividir el grupo de compuestos activos en dos subconjuntos que formarán la SE y la SP; de igual manera se divide el grupo de los inactivos. Esto permite asegurar la representatividad de elementos del mismo dominio en los dos subconjuntos obtenidos.

Según varios autores la “única” condición necesaria y suficiente para poder estimar el valor predictivo de un modelo es comparar los valores predichos y observados de una SP externa [170]. Los compuestos incluidos en la SP no se usaron en el desarrollo de los modelos cuantitativos.

### **3.1.4. Desarrollo y validación de los modelos QSAR**

Los modelos QSAR fueron las principales herramientas de los ensayos *in silico* realizados en esta Tesis, los cuales fueron obtenidos utilizando los DMs *TOMOCOMD-CARDD*, así como el ADL como técnica estadística para clasificar los compuestos AMs. La ubicación de cada compuesto en una de las clases está dada por las probabilidades de clasificación posteriores, empleada para el cálculo de la diferencia de estas probabilidades ( $\Delta P$ ) según:

$$\Delta P\% = [P(\text{act}) - P(\text{inact})] \times 100$$

donde,  $P(\text{act})$  es la probabilidad con que la ecuación clasifica un compuesto como activo y  $P(\text{inact})$  es la probabilidad con que la ecuación clasifica un compuesto como inactivo.

De esta forma compuestos con  $\Delta P\% > 0$  se consideraron activos y aquellos con  $\Delta P\% < 0$  se consideraron inactivos.

Para la obtención de los modelos QSAR de clasificación se empleó la técnica del ADL que se caracteriza por una ecuación matemática lineal que representa la relación de la variable dependiente (clases de AMs y no-AMs) y las variables predictoras (DMs) [111]. Los modelos QSAR-ADL se obtuvieron utilizando el método de “pasos hacia delante” (*forward stepwise*) y de “mejor subconjunto” (*best subset*) para la selección de las variables (atributos).

Se utilizaron diferentes parámetros estadísticos para verificar la calidad y *robustez* de los modelos obtenidos (la  $\lambda$  de Wilks, el valor de  $F$  y el cuadrado de la distancia de Mahalanobis ( $D^2$ ) [170].

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 [171]. De igual forma se calcularon los parámetros estadísticos más utilizados en la literatura médico-estadística: la exactitud total ( $Q$ ), el coeficiente de correlación de Matthews ( $C$ ), la sensibilidad (**Sens**), la especificidad (**Spec**) y la razón de falsa alarma (**RFA**)”[170].

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

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

$$\mathbf{Sens} = 100 * VP / (VP + FN)$$

$$\mathbf{Spec} = 100 * VP / (VP + FP)$$

$$\mathbf{RFA} = 100 * FP / (FP + VN)$$

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 demostrar el poder predictivo de los mismos, se efectuaron ejercicios de validación interna y externa. En la *validación interna*, se llevó a cabo una estrategia de VC dejando el 5, 10, 15, 20, 25 y 30% de los

compuestos fuera (*Leave-Group-Out*, según sus siglas en inglés) generando nuevos modelos con los que se predice tanto la nueva SE utilizada, como el porcentaje de compuestos no incluidos correspondiente en cada ocasión. Este proceder se repitió hasta que todos los casos (en este caso grupos) son retirados una vez y predichos por el modelo generado con las respectivas bases de datos reducidas [93].

Un segundo ejercicio de validación interna se llevó a cabo mediante la aleatorización de la variable respuesta, [172] que consiste en invertir la clasificación correcta de dicha variable en el 5, 10, 20, 30, 40 y 50% de los compuestos de la SE. En cada caso se desarrolló un nuevo modelo al que se le determinan los parámetros estadísticos mencionados en párrafos anteriores. Este procedimiento es útil para demostrar la estabilidad del modelo QSAR/ADL obtenido (y también descarta el ajuste casual), en dependencia del desajuste o alteración gradual de los parámetros estadísticos.

Para la validación externa, la SP generada mediante el análisis de clúster fue sometida a la evaluación de las funciones discriminantes, de modo que pudieron ser calculados para cada caso los parámetros estadísticos recomendados (*Q*, *C*, *Sens*, *Spec* y *RFA*) [170].

### **3.1.5. Sistemas multclasificadores-ensamblados-basados en modelos QSAR**

La utilización de SMC es una estrategia, que puede aumentar la precisión del análisis y obtener excelentes resultados en el comportamiento de la clasificación. Los SMC pertenecen a una reciente área de la minería de datos que ha permitido mejorar, en general, la precisión de las predicciones por medio de las combinaciones de clasificadores individuales.

No existe todavía un clasificador por excelencia (Teorema de “*No free lunch*”); para un problema determinado es difícil seleccionar cual será el clasificador que logre encontrar una mejor frontera de decisión para separar las clases. Por ello, se utilizaron un conjunto de modelos QSAR/ADL para obtener sistemas ensamblados o multclasificadores. Estos tienen una tendencia general a mejorar los resultados de las clasificaciones [173, 174].

Para la confección de los SMCs, se emplearon los modelos QSAR/ADL obtenidos bajo las condiciones previamente descritas. Además, se tuvieron en cuenta dos factores

importantes: la diversidad de los clasificadores y la combinación de las salidas de los mismos [113]. Varios autores plantean que no hay una medida de diversidad involucrada en forma explícita en los métodos de generación de clasificadores, aunque asumen que la diversidad es el punto clave en cualquiera de los métodos y que de esto dependerá en gran medida el resultado final del SMC [175].

Se han planteado 4 niveles que representan el punto del proceso donde recae el peso de la combinación y que son: Nivel de base de datos, Nivel de rasgos, Nivel de clasificadores y Nivel de clasificación [175]. En este trabajo, a nivel de atributo, la diversidad está basada en que los modelos se entrenaron sobre varios subconjuntos de variables predictoras, representadas por varias familias de DMs. A nivel de combinación, se garantizó la diversidad mediante el empleo de varias formas (voto ponderado y voto no ponderado) para la obtención de los SMCs. Se utilizó el enfoque de fusión, el cual supone que cada modelo tiene el conocimiento de todo el espacio químico [15].

Para “cuantificar” las correlaciones entre los clasificadores individuales, fueron seleccionadas las medidas de diversidad de *desacuerdo* y de *dobles fallos* [124, 176].

Estas medidas se basan en combinar por pares todos los modelos y establecer una salida binaria para cada pareja formada, representando si la predicción fue correcta (1) o no (0). De esta manera, para cada pareja de modelos, se calcularon los valores que se muestran en la Tabla 1 y 2.

**Tabla 1.** Relación entre dos modelos individuales ( $M_1$  y  $M_2$ ) para cada instancia.

	$M_2$ correcto (1)	$M_2$ incorrecto (0)
$M_1$ correcto (1)	a	b
$M_1$ incorrecto (0)	c	d
$a + b + c + d = 1$		

Si se suman los valores a, b, c, d, entre el par de clasificadores  $M_1$  y  $M_2$  para cada pareja formada se obtendrá el siguiente resultado, a partir del cual se calculan las medidas en formas de pares.

**Tabla 2.** Relación entre dos modelos individuales ( $M_1$  y  $M_2$ ) para todas las instancias o parejas

	$M_2$ correcto (1)	$M_2$ incorrecto (0)
$M_1$ correcto (1)	A	B
$M_1$ incorrecto (0)	C	D
$A + B + C + D = N$		

En este caso, A representa la suma total de los valores de  $a$  y así respectivamente con los valores B, C y D. El número total de casos es N.

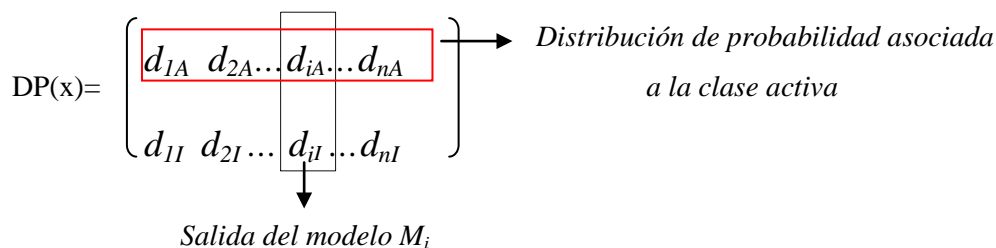
La medida de **desacuerdo** se basó en aquellos casos que fueron clasificados de manera diferentes por los dos clasificadores:  $D_{1,2} = b + c$ . La medida de **dobles fallos** tuvo en cuenta aquellos casos en que los dos clasificadores se equivocaron:  $DF_{1,2} = d$ . Se utilizó una combinación de ellas para la selección de los mejores clasificadores bases  $DIF_{1,2} = D_{1,2} - DF_{1,2}$ . Se escogieron diferentes conjuntos de clasificadores bases que maximizaron los valores de  $DIF_{1,2}$ .

La salida de los clasificadores individuales se consideró tanto categórica (activo e inactivo) como continua (*probabilidad posterior o pronosticada*, P).

Se utilizó primeramente el *voto ponderado* que necesita un entrenamiento adicional para los clasificadores base en la obtención de los resultados finales. En este estudio, solamente la columna de la distribución de probabilidad asociada a la clase activa del perfil de decisión fue usada y el ADL fue empleado para dar un peso a cada modelo individual en este SMC [15].

En el *voto no ponderado* se supone que todos los modelos tienen la misma contribución al resultado final. Dentro de este enfoque el *voto mayoritario* es muy utilizado [177-180], donde cada clasificador individual da un voto para un caso prediciendo su clase, y cada caso tendrá la salida final en función de la clase que reciba más votos siendo seleccionada como la salida del SMC. Para combinar las salidas continuas, se utilizaron las matrices llamadas perfiles de decisión (*decision profile*, DP), como se muestra en la Figura 7. Sea  $M = \{M_1, M_2, \dots, M_n\}$  el conjunto de clasificadores y  $\Omega = \{C_A, C_I\}$  las clases activa e inactiva. Para una instancia  $x$ , se denota por  $d_{iA}(x)$  o  $d_{iI}(x)$  el valor de distribución de probabilidad que el clasificador  $M_i$  da a la hipótesis que  $x$  sea de la clase activa e inactiva. En este caso, el *promedio de las probabilidades* (PP) y la *probabilidad máxima* (PMA) son los más usados con un buen rendimiento. En

nuestro caso, se utilizaron además otras combinaciones algebraicas de las distribuciones de probabilidades, como la función del mínimo y del producto.



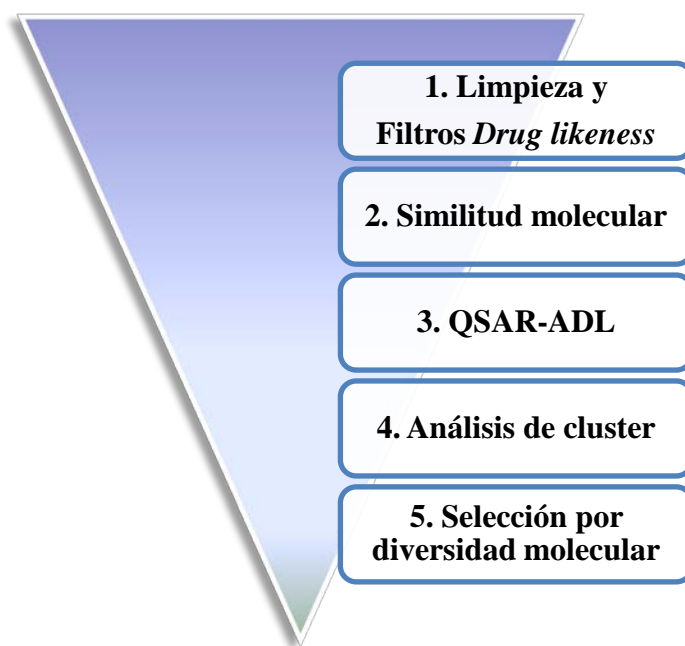
**Figura 7.** Perfiles de decisión de un conjunto de clasificadores.

De igual manera, fueron calculados los parámetros recomendados (**C**, **Sens**, **Spec** y **RFA**) en las SEs y SPs para la evaluación y la validación del comportamiento de los SMCs.

Para validar de forma más exhaustiva el poder predictivo del SMC se utilizó una base de datos de 13.410 compuestos con actividad *in vitro* frente a la cepa Dd2 de *P. falciparum* resistente a la CQ [13]. Estos compuestos fueron empleados en la validación del mejor SMC como una simulación del proceso de CV. Este experimento permitió comparar los resultados predichos por nuestro SMC, con los obtenidos experimentalmente por la GSK y evaluar así el comportamiento de nuestro modelo en la práctica [13].

### 3.2. Protocolo de CVBL integrado por diferentes filtros

Un buen protocolo de CV necesita ser rápido y preciso, de modo que sea práctico para cribar grandes bases de datos (millones de compuestos) en aras de priorizar un número reducido de compuestos para ser evaluados experimentalmente. En la Figura 8 se muestra el protocolo de CV secuencial “*paso a paso*” con los diferentes *filtros* llevado a cabo en este estudio. El mismo se basó en la jerarquía computacional de cada filtro, en el tiempo CPU que utilizaba cada uno de ellos y en la complejidad de la información aportada como entrada para cada paso. De esta forma los compuestos obtenidos en cada paso, pasaron a la etapa siguiente del protocolo, disminuyendo gradualmente el número de compuestos seleccionados.



**Figura 8.** Esquema del protocolo de cribado virtual “*paso a paso*”.

Con este método se tamizaron 4 bases de datos de compuestos para seleccionar posibles AMs:

**BD1: Spectrum collection** (<http://www.msdiscovery.com/spectrum.html>) que está compuesta por 2.000 compuestos (fármacos: 50%, productos naturales: 30% y otros componentes bioactivos).

**BD2: DrugBank** (<http://www.drugbank.ca>), la cual es generada en la Universidad de Alberta (Canadá). Esta base de datos contiene 6.811 compuestos que incluyen todas las moléculas aprobadas por la FDA, péptidos proteicos, nutraceuticos y fármacos experimentales.

**BD3: Otava Diversity Libraries PrimScreen15** (<http://www.otavachemicals.com>), es una base de datos confeccionada por grupos de diversidad usando el CheD software. En este caso se utilizó la biblioteca de 15.000 compuestos.

**BD4: Tocriscreen collections** (<http://www.tocris.com/screeningLibraries.php>), la cual incluye 1.120 compuestos bioactivos adecuados para HTS y aplicaciones químicas y biológicas.

**Tabla 3.** Total de compuestos cribados por cada base de datos.

Bases de datos	Numero de compuestos
BD1	2000
BD2	6808
BD3	15000
BD4	1120
<b>Total</b>	<b>24.928</b>

A continuación se describe cada uno de los pasos mencionados anteriormente en el CVBL.

### 3.2.1. Filtros *drug-likeness*

El filtro de Absorción-Distribución-Metabolismo y Excreción (ADME) más clásico es la regla de los 5 (Ro5) de Lipinski, basado en las propiedades fisicoquímicas del compuesto; sin embargo se ha encontrado que los márgenes de Lipinski son demasiado estrictos [96, 99]. Teniendo en cuenta que existían diversos criterios en este tema, se aplicaron los valores de límites superiores de varios filtros descritos en la literatura, incluyendo de esta manera otras condiciones no incluidas en la regla de Lipinski.

En nuestro caso, un compuesto no fue tomado en consideración si:  $MW > 700$  g/mol;  $LogP > 7$ ;  $nHBD_{on} > 5$ ;  $nHB_{Ac} > 10$ ;  $nRotB > 10$ ;  $PSA > 140 \text{ \AA}^2$ . Todos estos descriptores fueron calculados con el programa *CDK Descriptor GUI* (v0.94) [181].

### 3.2.2. Búsqueda de similitud molecular

Se utilizó el método de *fusión de datos* [182], empleando 30 compuestos de referencia (AMs estructuralmente diversos). En el Anexo 1 se muestran las estructuras de estos compuestos. Las huellas MACCS [96] fueron calculadas para caracterizar las estructuras de referencia y las de las bases de datos, utilizando el programa *CDK Descriptor GUI* (v0.94) [181]. El *coeficiente de Tanimoto* fue utilizado para establecer las métricas de comparación intermolecular (una de referencia vs. una de la base de datos) [105, 106].

De esta manera, cada molécula de la base de datos (de dimensión  $n$ ) fue ordenada en una posición (ranking)  $r_{ij}$  ( $1 \leq i \leq n$ ,  $1 \leq j \leq 15$ ) con una medida de similitud (*score*)  $s_j$

respecto a cada una de las estructuras de referencia. Su *score* final se estableció por la regla de fusión máximo:  $s_f = \text{máximo} \{s_1, s_2 \dots s_{15}\}$  (fusión por máximo *score*). Después, todas las moléculas de la base de datos fueron ordenadas según su *score* fusionado,  $s_f$ . Los compuestos retenidos son los que se encuentran por encima del 66% en la lista ordenada  $\{s_{f1}, s_{f2} \dots s_{fn}\}$  [15].

### **3.2.3. Estudio QSAR/ADL**

Se calcularon los DMs para aquellos compuestos retenidos de los pasos anteriores de cada filtro según el protocolo de la Figura 6. Los compuestos que pasan al paso siguiente de dicho protocolo, fueron cribados por el SMC seleccionado según el epígrafe 3.1.5 de esta sección. De esta forma, solo aquellos compuestos clasificados como activos en el estudio QSAR/ADL, pasan a la etapa siguiente del CV.

### **3.2.4. Análisis de clúster y selección final por diversidad molecular**

Se llevó a cabo un AC jerárquico según el procedimiento *k*-NNCA implementado en **STATISTICA 6.0** [143], donde cada conglomerado formado es analizado individualmente mediante la inspección visual de la estructura de cada miembro. De esta forma se seleccionan compuestos semejantes estructuralmente a compuestos activos y se trata de obtener la mayor representatividad y diversidad de núcleos bases. Se prestó especial atención a la presencia de singletons (*outlier structural*), pues estos pudieran constituir nuevos núcleos base.

Para la selección de los compuestos a evaluar experimentalmente se realiza una búsqueda de la actividad descrita frente a *P. falciparum*; así como de la disponibilidad y el precio en el mercado para su adquisición.

## **3.3. Métodos *in vitro***

Los compuestos seleccionados según el protocolo descrito anteriormente fueron evaluados en ensayos *in vitro* frente a dos cepas de *P. falciparum*, 3D7 y Dd2 sensible y resistente a CQ, respectivamente. Estas cepas fueron donadas a nuestro laboratorio por Centro Nacional de Microbiología, del Instituto de Salud Carlos III.

El cultivo de *P. falciparum* fue mantenido en medio RPMI 1640 suplementado con albumax (Gibco) 0,5%, hipoxantina (Sigma) 0,1%, suero bovino fetal (Gibco) 10% y glóbulos rojos (grupo O+ o A+, 2% hematocrito). Se incubaron a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> [183].

### **3.3.1. Evaluación de la actividad antimalárica. Microtest *in vitro* basado en fluorescencia**

El método de detección de ácidos nucleicos usando fluorocromos como el SYBR-green I, se ha presentado como una alternativa con menor costo y tiempo de ejecución comparándolos con otras técnicas para la evaluación de la actividad antimalárica [184].

Usando placas de 96 pocillos se distribuyen 50 µL/pocillo de los productos previamente disueltos en DMSO (Panreac), utilizándose 3 réplicas por cada concentración, así como controles con CQ (Sigma) y DMSO al 0,1%. Posteriormente se distribuyeron 50 µL/pocillo del cultivo de *P. falciparum*, para completar un volumen de 100 µL/pocillo. El hematocrito fue de 2% con una parasitemia del 1%, dejando controles de crecimiento y de glóbulos rojos no parasitados. Después de 48-72 h de incubación, se añaden 100 µL/pocillo de SYBR-Green (Applied Biosystem) disuelto en una solución de tampón de lisis (0,2 µL/mL) [185] y se agitan las placas por 15 min protegidas de la luz. Seguidamente se mantienen durante una hora en reposo para favorecer la acción del agente intercalante con el ADN parasitario. La lectura de la fluorescencia se realiza en un lector de microplacas (Sunrise RC-TECAN) a una longitud de onda de excitación de 485 nm y de emisión de 535 nm [184]. El porcentaje de inhibición (IC) se calcula usando la fórmula siguiente:

$$\%IC = \frac{(IF \text{ Control} - IF \text{ Compuesto})}{IF \text{ Control}} \times 100$$

donde, IF = Intensidad de Fluorescencia

Además de los compuestos seleccionados por el protocolo de CV, se evaluaron 16 nuevos compuestos obtenidos por síntesis química, suministrados por el Laboratorio de Farmacoinformática y Modelización Molecular, del Departamento de Química Farmacéutica del Colegio de Farmacia ISF en Moga, India.

### **3.3.2. Citotoxicidad inespecífica en macrófagos**

Para los ensayos de citotoxicidad inespecífica se emplearon macrófagos de la línea J774, los cuales se conservaban en nitrógeno líquido a -170 °C [186]. Se trata de una línea celular de macrófagos peritoneales de origen murino, que fue donada a nuestro laboratorio por el Centro Nacional de Microbiología, del Instituto de Salud Carlos III. Para el mantenimiento del cultivo se utilizan frascos de cultivo celular de 25 cm<sup>2</sup>, mediante pases sucesivos en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero bovino fetal (Gibco), a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub>.

Este ensayo se basa en medir la respiración celular como indicador de viabilidad celular por la reducción a nivel mitocondrial de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (Sigma) [187]. El MTT es captado por las células y reducido por la enzima succínico deshidrogenasa mitocondrial a formazán insoluble que queda retenido en las células y puede ser liberado mediante la solubilización de las mismas. De esta forma es cuantificada la cantidad de MTT reducido mediante el cambio de coloración del amarillo al azul [188].

Para la realización de subcultivos en las pruebas de citotoxicidad inespecífica, se despegan las células con una solución de EDTA/tripsina en tampón fosfato salino (PBS, por sus siglas en inglés) a 1 g/L durante 10 minutos. Se centrifugan a 1.500 rpm/5 min y se resuspenden en medio fresco para determinar su concentración y viabilidad a través del recuento en cámara de Neubauer con una solución de Azul tripán (Sigma). El cultivo se ajusta a 70.000 macrófagos en 100 µL/pocillo. Después de 24 h de incubación a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub>, se retira el medio y se añaden 200 µL de los productos a evaluar previamente disueltos. Por cada concentración de los productos se utiliza un pocillo sin macrófagos que servirá como blanco y se utilizan controles de crecimiento de células. Tras 24 h en contacto con los productos se retira el medio y se añaden 100 µL/pocillo de MTT (0,4 mg/mL) en PBS, incubándose a 37 °C durante 1 h [188]. Los cristales de formazán se disuelven con 100 µL/pocillo de DMSO. Se leen las absorbancias a 595 nm y la actividad citotóxica se calcula empleando la fórmula:

$$\%C = \frac{100 - (A_{\text{compuesto}} - A_{\text{blanco}})}{A_{\text{control}} - A_{\text{blanco}}} \times 100$$

donde, %C = es el porcentaje de citotoxicidad inespecífica y A= es la absorbancia.

### **3.3.3. Evaluación de la actividad antimalárica *in vitro* en el test de inhibición de la biomineralización de la FPIX (FBIT)**

Durante su desarrollo intraeritrocitario el parásito degrada grandes cantidades de hemoglobina dentro de un orgánulo especializado denominado vacuola digestiva [189, 190]. Durante este proceso se libera FPIX, un compuesto potencialmente tóxico para el mismo parásito, que puede provocar desde lisis de la membrana hasta la inactivación de enzimas indispensables para su alimentación, como la Plm I y II y la falcipaina. La FPIX se detoxifica a través de un mecanismo particular del parásito, formando un polímero insoluble atóxico, la hemozoína, llamado también pigmento malárico [189, 190]. Por lo tanto la eliminación de la FPIX es un mecanismo indispensable para su supervivencia. Esta función especializada hace de la vacuola digestiva un blanco de elección para la quimioterapia antimalárica, puesto que, un fármaco capaz de inhibir la polimerización de la FPIX podría ser letal para el parásito. Para muchos fármacos, su habilidad para inhibir la polimerización de la FPIX está directamente relacionada con la potencia AM [191-193].

En una placa de 96 pocillos no estéril se colocó en estricto orden, 50 µl/pocillo de solución de clorhidrato de hemina bovina en DMSO a una concentración de 0,5 mg/mL. Luego se añadió 100 µl/pocillo de tampón acetato de sodio pH 4,4 y posteriormente 50 µl de cada uno de los productos a evaluar disueltos en DMSO a diferentes concentraciones. Se utilizaron controles de DMSO y de CQ como fármaco de referencia. Se colocaron por triplicado tanto los productos a evaluar como los controles. La placa se incubó a 37 °C por 18-24 h y luego es centrifugada a 3.000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante es eliminado sacudiendo con fuerza la placa de arriba abajo y se añadieron 200 µl/pocillo de DMSO centrifugándose nuevamente la placa a 3000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se elimina de la misma forma y se colocan 150 µl/pocillo de hidróxido de sodio 0,1 N, agitándose la placa 30 segundos. Se realiza la lectura de la absorbancia a una longitud de onda de 405 nm en un lector ELISA [140].

El porcentaje de inhibición de cada producto de síntesis fue calculado mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inh} = \frac{\text{PAC} - \text{PAE}}{\text{PAC}} \times 100$$

donde, % Inh = es el porcentaje de Inhibición

PAC = promedio de la absorbancia del control

PAE = promedio de la absorbancia del compuesto en estudio.

Se determinó la IC<sub>50</sub> (concentración que inhibe el 50 % de la biomineralización de la FPIX utilizando la función Probit [194, 195]).

# *Resultados*

---

---

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Introducción

Durante el transcurso de este capítulo se presentan, de manera resumida, los principales resultados obtenidos en la investigación. De esta forma se ofrece al lector la posibilidad de corroborar, mediante los resultados del trabajo, la aplicabilidad de los métodos computacionales en la modelización de la actividad antimalárica, el cribado farmacológico y la corroboración de la actividad predicha mediante los ensayos experimentales.

Los resultados de esta Tesis se han dividido en 3 secciones, primeramente los resultados de los métodos *in silico*, luego el desarrollo del proceso de CVBL y por último, los resultados de los métodos de corroboración experimental *in vitro*.

En primer lugar, dentro del estudio *in silico*, se expone el proceso de conformación de la SE y SP de la base de datos utilizada para la obtención de los modelos de predicción de la actividad antimalárica. Luego en el epígrafe siguiente se presenta la generación y validación de las funciones discriminantes utilizando los índices moleculares lineales, cuadráticos y bilineales basados en relaciones atómicas, respectivamente. Finalmente, se integran los diferentes modelos QSAR/ADL obtenidos en los artículos para conformar un SMCs que permitan optimizar las condiciones para el CVBL de bases de datos y la propuesta de potenciales compuestos AMs.

Los resultados de los ensayos *in vitro* se dividen en los obtenidos mediante el método fluorimétrico frente a dos cepas de *P. falciparum*, de los cuales seleccionan una serie de compuestos con actividad antimalárica a los que se les realizó el ensayo de citotoxicidad inespecífica así como la prueba de FBIT.

### 4.2. Métodos *in silico*

La base de datos de 2.314 compuestos quedó dividida en dos conjuntos de 851 y 1.463 compuestos activos e inactivos, respectivamente. Después del AC de *k*-MCA se dividen estos grupos en dos subconjuntos separados, la SE con 638 activos y 1.097 inactivos y la SP con 213 activos y 366 inactivos. De esta forma se asegura que cualquier clase química (determinada por clúster) estará representada en ambas series de compuestos.

Mediante los DMs estocásticos y no-estocásticos, totales y locales, basados en relaciones de átomos implementados en el programa *TOMOCOMD-CARDD* [112], se obtuvieron 37 modelos de clasificación QSAR/ADL. Los parámetros estadísticos obtenidos para cada uno de ellos, así como los índices que representan cada modelo individual se reflejan en la Tabla 4.

La clasificación (expresada en  $\Delta P\%$ ) para cada compuesto de la base de datos de trabajo (SE y SP) por cada uno de los 37 modelos de predicción (véase Anexo 2 del CD que se adjunta en esta Tesis).

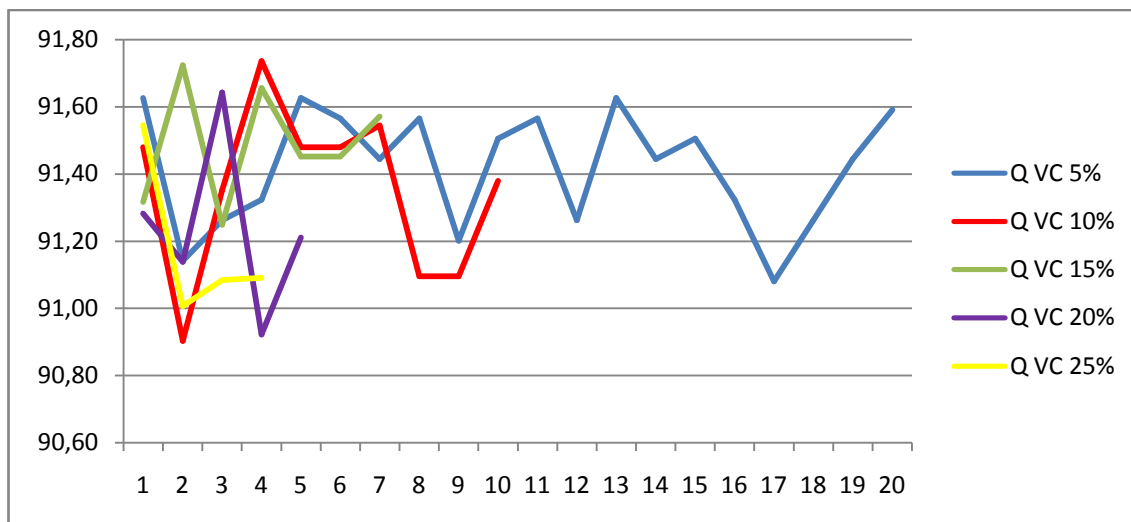
**Tabla 4.** Comportamiento de los 37 modelos QSAR/ADL basados en relaciones de átomos.

Modelo	Índices	SE					SP					Wilks' $\lambda$	D2	F
		C	Q	Sens	Esp	FAR	C	Q	Sens	Esp	FAR			
1	ILNS-M	0,73	86,86	89,03	78,24	14,40	0,74	87,56	87,79	80,26	12,57	0,47	4,90	(7,1727) = 281,3377
2	ILNS-P	0,77	89,28	89,50	82,75	10,85	0,77	88,95	90,14	81,70	11,75	0,45	5,32	(7,1727) = 305,3036
3	ILNS-V	0,77	89,11	89,81	82,21	11,30	0,74	87,74	88,73	80,08	12,84	0,43	5,61	(7,1727) = 322,1649
4	ILNS-K	0,79	90,03	89,81	84,14	9,85	0,78	89,81	88,26	84,68	9,29	0,43	5,73	(7,1727) = 329,1215
5	ILNS-Gral	0,80	90,66	91,69	84,29	9,94	0,81	91,02	91,55	85,15	9,29	0,42	5,96	(7,1727) = 342,4944
6	IQNS-M	0,73	87,09	88,71	78,83	13,86	0,73	87,05	84,98	80,80	11,75	0,48	4,59	(7,1727) = 263,4684
7	IQNS-P	0,76	88,88	87,77	82,96	10,48	0,73	87,22	86,38	80,35	12,30	0,46	5,10	(7,1727) = 292,9673
8	IQNS-V	0,76	88,59	88,24	82,07	11,21	0,74	87,39	87,32	80,17	12,57	0,46	4,97	(9,1725) = 221,5716
9	IQNS-K	0,80	90,37	89,34	85,20	9,02	0,79	90,16	88,73	85,14	9,02	0,42	5,89	(9,1725) = 262,8651
10	IQNS-Gral	0,79	90,26	89,66	84,74	9,39	0,81	90,85	89,67	86,04	8,47	0,43	5,77	(7,1727) = 331,5598
11	IBNS-MP	0,75	88,07	89,66	80,22	12,85	0,74	87,74	88,73	80,08	12,84	0,46	5,00	(7,1727) = 287,3787
12	IBNS-MV	0,77	88,82	89,50	81,81	11,58	0,76	88,43	87,79	82,02	11,20	0,46	5,07	(7,1727) = 291,2286
13	IBNS-MK	0,73	87,32	87,30	80,03	12,67	0,72	86,87	84,98	80,44	12,02	0,47	4,85	(7,1727) = 278,3801
14	IBNS-PV	0,77	89,16	88,71	82,99	10,57	0,77	89,12	88,73	82,89	10,66	0,45	5,22	(7,1727) = 299,4637
15	IBNS-PK	0,79	89,97	88,24	85,05	9,02	0,77	89,29	88,26	83,56	10,11	0,43	5,71	(7,1727) = 327,9478
16	IBNS-VK	0,77	89,05	89,18	82,46	11,03	0,75	88,08	88,26	81,03	12,02	0,43	5,68	(7,1727) = 326,1627
17	IBNS-Gral	0,78	89,57	89,97	83,07	10,67	0,75	88,43	86,38	82,88	10,38	0,42	5,91	(9,1725) = 263,8623
18	INS-Gral	0,81	91,18	90,91	85,93	8,66	0,81	91,02	89,20	86,76	7,92	0,42	6,04	(7,1727) = 347,0380
19	ILSS-M	0,76	88,59	89,03	81,61	11,67	0,75	87,91	89,67	79,92	13,11	0,47	4,90	(7,1727) = 281,5600
20	ILSS-P	0,77	89,05	89,66	82,18	11,30	0,74	87,74	88,73	80,08	12,84	0,45	5,33	(7,1727) = 305,9011
21	ILSS-V	0,77	89,22	89,97	82,35	11,21	0,77	88,95	88,73	82,53	10,93	0,43	5,60	(7,1727) = 321,6680
22	ILSS-K	0,77	89,28	88,24	83,53	10,12	0,79	90,33	88,26	85,84	8,47	0,449	5,278	(7,1727) = 303,0869

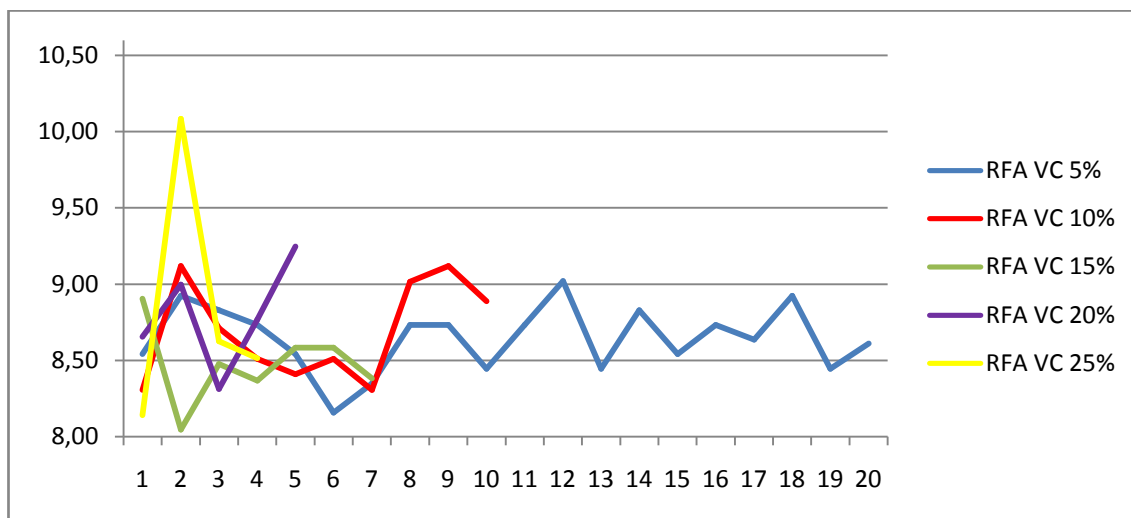
Tabla 4. Continuación

Modelo	Índices	SE					SP					Wilks' $\lambda$	D2	F
		C	Q	Sens	Esp	FAR	C	Q	Sens	Esp	FAR			
23	ILSS-Gral	0,79	90,09	89,97	84,16	9,85	0,79	89,81	91,08	82,91	10,93	0,43	5,72	(9,1725) = 255,1377
24	IQSS-M	0,71	86,05	85,11	78,70	13,40	0,73	87,39	84,51	81,82	10,93	0,50	4,21	(7,1727) = 241,9065
25	IQSS-P	0,73	87,09	87,30	79,57	13,04	0,73	86,87	86,85	79,40	13,11	0,48	4,59	(8,1726) = 230,6731
26	IQSS-V	0,74	87,78	87,77	80,69	12,22	0,71	86,18	85,45	78,79	13,39	0,46	4,97	(7,1727) = 285,2241
27	IQSS-K	0,74	87,55	88,40	79,89	12,94	0,80	90,33	91,55	83,69	10,38	0,46	5,09	(7,1727) = 292,5573
28	IQSS-Gral	0,78	89,39	89,50	82,99	10,67	0,76	88,60	86,38	83,26	10,11	0,45	5,22	(7,1727) = 299,9503
29	IBSS-MP	0,72	86,80	86,68	79,34	13,13	0,72	86,70	84,98	80,09	12,30	0,50	4,33	(7,1727) = 248,6270
30	IBSS-MV	0,73	87,26	87,46	79,83	12,85	0,76	88,43	89,67	80,93	12,30	0,49	4,46	(7,1727) = 255,8101
31	IBSS-MK	0,74	87,67	87,93	80,37	12,49	0,79	89,98	89,20	84,44	9,56	0,47	4,77	(7,1727) = 274,0049
32	IBSS-PV	0,73	87,03	86,68	79,80	12,76	0,75	88,08	87,32	81,58	11,48	0,48	4,73	(7,1727) = 269,3719
33	IBSS-PK	0,74	87,55	87,62	80,32	12,49	0,72	86,53	86,85	78,72	13,66	0,48	4,60	(7,1727) = 264,4024
34	IBSS-VK	0,74	87,72	87,77	80,58	12,31	0,74	87,56	87,79	80,26	12,57	0,48	4,73	(7,1727) = 271,6514
35	IBSS-Gral	0,78	89,45	89,66	83,02	10,67	0,78	89,29	90,14	82,40	11,20	0,44	5,55	(10,1724) = 221,0526
36	ISS-Gral	0,79	90,03	89,97	84,04	9,94	0,78	89,81	89,20	84,07	9,84	0,41	6,21	(9,1725) = 276,9992
37	Gral NS-SS	0,82	91,41	91,69	85,90	8,75	0,82	91,36	92,49	85,28	9,29	0,39	6,82	(9,1725) = 304,4584

Los ejercicios de validación interna realizados para demostrar la *robustez* de los modelos se efectuaron con éxito. A continuación se muestran los resultados de la validación interna realizada para el modelo 37 que se deriva de la combinación de todos los DMs calculados para los compuestos de la base de datos (Gráficos 1 y 2).

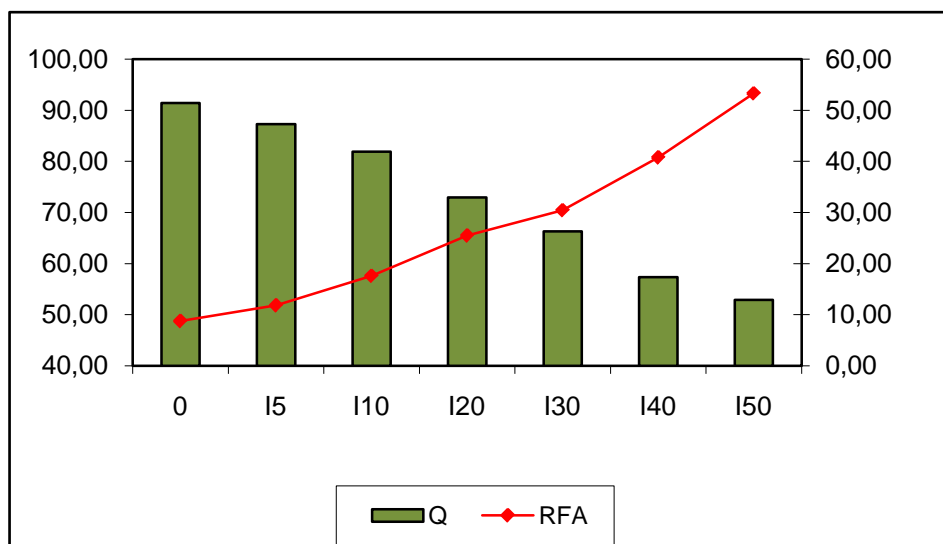


**Gráfico 1.** Resultados obtenidos para  $Q$  de la SE del modelo 37 en el ejercicio de VC, dejando el 5, 10, 15, 20 y 25% de los compuestos fuera.



**Gráfico 2.** Resultados obtenidos para  $RFA$  de la SE del modelo 37 en el ejercicio de VC, dejando el 5, 10, 15, 20 y 25% de los compuestos fuera.

Los resultados de la aleatorización de la variable respuesta como segundo ejercicio de validación interna se muestran en el Gráfico 3.



**Gráfico 3.** Resultados de validación interna mediante ejercicio de aleatorización de la variable respuesta para el modelo individual 37.

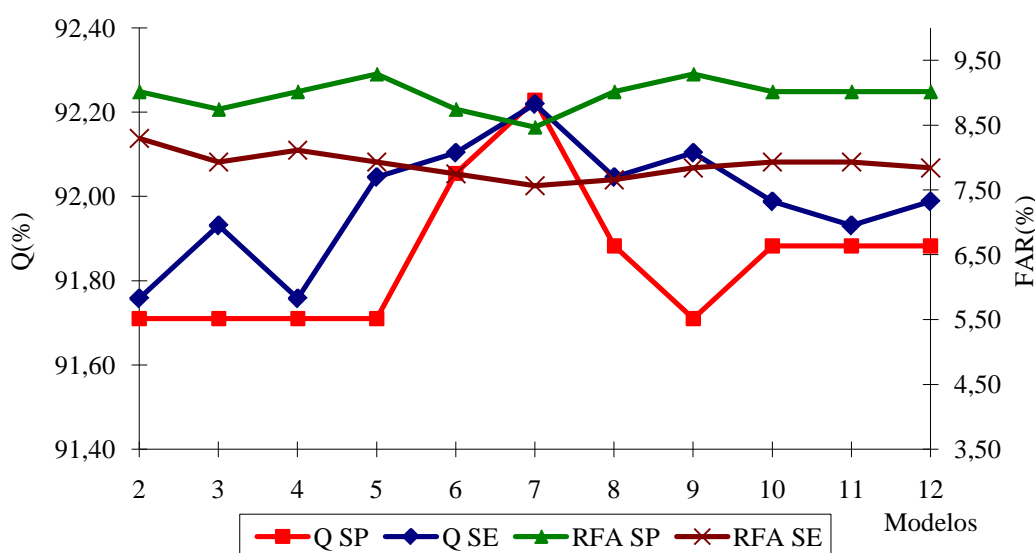
A pesar de la calidad de los modelos QSAR/ADL, se hizo indispensable evaluar este comportamiento frente a una SP externa, condición necesaria y suficiente para validar cualquier modelo QSAR [113, 196]. En la Tabla 4 se muestran estos resultados para la SP.

En las técnicas de modelado molecular, es típico que exista gran cantidad de casos parecidos con clases diferentes y puede resultar difícil encontrar los patrones que caracterizan cada una de las clases del problema en estudio. Es conocido también que no siempre combinar los mejores modelos ofrecen buenos resultados [175]. Teniendo en cuenta que los modelos fueron validados adecuadamente, se decidió fusionarlos en los SMCs para ser utilizados en CVBL.

Los resultados obtenidos para la *diversidad derivada*,  $DIF_{1,2}$  [124, 197] en la comparación por pares de todos los modelos, se muestran en el Anexo 3. Los 12 modelos seleccionados como más diversos (2, 19, 22, 23, 25, 26, 30, 32, 33, 34, 35 y 37) fueron aquellos que maximizaron el valor de  $DIF_{1,2}$ . Para decidir el número óptimo de clasificadores que integran el SMC así como los modelos que lo componen, existen

muchos enfoques que no han sido explorados. En este estudio se comparan 2 enfoques diferentes para lograr combinar los modelos QSAR en la modelización molecular de la actividad AM.

Se realizó el análisis del *voto ponderado*, utilizándose como variable independiente el  $\Delta P$  de los compuestos por los 12 modelos anteriormente mencionados. El Gráfico 4 muestra el comportamiento de  $Q$  y  $RFA$  para la SP en el ensamblaje de dichos modelos individuales, de forma tal que nos permitió escoger el número óptimo de clasificadores a combinar. Así se compararon los parámetros estadísticos para todas las variantes, resultando que el mejor comportamiento se obtiene con la combinación de 7 modelos (19, 23, 26, 32, 33, 35 y 37), donde coincide el valor más alto de  $Q$  y el menor valor de  $RFA$  tanto para la SE como para la SP.



**Gráfico 4:** Valores de  $Q$  y  $RFA$  según el *voto ponderado* para los 12 modelos más diversos.

Para el otro método de ensamblaje explorado (*voto no ponderado*) se fusionaron los  $\Delta P$  de todas las combinaciones posibles entre los clasificadores individuales (modelos) a través de funciones como el promedio de las probabilidades, probabilidad máxima, función del mínimo y del producto. Construyendo las matrices denominadas perfiles de decisión se obtuvieron los parámetros estadísticos  $C$ ,  $Sens$ ,  $Spec$  y  $RFA$  para cada una de las variantes posibles (desde la combinación de 2 hasta 12 modelos). En la

Tabla 5 se muestra un resumen de los mejores resultados obtenidos en el *voto no ponderado*.

**Tabla 5.** Mejores resultados obtenidos para la SP en el *voto no ponderado*.

No. de modelos	ID de modelos	Q (SP)	FAR (SP)	combinación algebraica
2	37 35	92,23	5,19	Mínimo
<b>3</b>	<b>37 35 2</b>	<b>92,06</b>	<b>3,83</b>	<b>Mínimo</b>
4	37 35 22 2	92,23	7,38	Mediana
5	37 35 22 2 32	92,57	7,10	Mediana
6	37 35 22 2 32 25	92,23	7,92	Mediana
7	37 35 22 2 32 25 23	92,40	7,10	Mediana
8	37 35 22 2 32 25 23 30	92,23	7,65	Mediana

Aquí se observa que la combinación de 3 modelos (específicamente los modelos 2, 35 y 37), logra el mejor comportamiento de sus parámetros estadísticos con respecto a las otras combinaciones.

En la Tabla 6 se resumen los resultados de ensamblado de los modelos comparando el comportamiento alcanzado por el mejor modelo individual (37), así como el mejor SMC del *voto ponderado* y del *voto no ponderado*, en aras de tomar la decisión del método a utilizar en próximos cribados.

**Tabla 6.** Comportamiento de los SMCs con mejores resultados en las SE y SP y comparación con el modelo 37 como mejor clasificador individual.

	SE				SP			
	Q	Sens	Espec	RFA	Q	Sens	Espec	RFA
Modelo 37	91,41	91,69	85,90	8,75	91,36	92,49	85,28	9,29
<i>Voto ponderado</i>	92,22	91,85	87,59	7,57	92,23	93,43	86,52	8,47
<b><i>Voto no ponderado</i></b>	<b>91,35</b>	<b>83,39</b>	<b>92,36</b>	<b>4,01</b>	<b>92,06</b>	<b>84,98</b>	<b>92,82</b>	<b>3,83</b>

Se selecciona el SMC del *voto no ponderado* para ser utilizado en el CV que será desarrollado posteriormente, por mostrar un mejor comportamiento en ambas series (tomando en consideración la RFA, que debe ser lo menor posible), siguiendo además el principio de parsimonia.

Las ecuaciones 2, 35 y 37 corresponden a los 3 modelos individuales con el mismo número de identificación que forman el SMC seleccionado.

$$\text{Clasif (2)} = -5,69 + 0.79 \times 10^{-2} P f_4^H(x) - 0.23 \times 10^{-3} P f_7^H(x) + 0.3 \times 10^{-5} P f_{10}(x) - 0.12 P f_{3L}^H(x_E) + 0.12 \times 10^{-3} P f_{8L}^H(x_E) + 0.13 P f_{3L}(x_E) - 0.5 \times 10^{-3} P f_{7L}(x_E)$$

$$\text{Clasif (35)} = -5.86 - 0.84^{PVs} b_8^H(x, y) + 1.56^{PVs} b_{10}^H(x, y) - 0.77^{PVs} b_{12}^H(x, y) + 0.09^{PVs} b_{2L}^H(x_E, y_E) + 0.45^{PKs} b_l(x, y) - 0.78^{PKs} b_{0L}(x_E, y_E) + 0.31^{VKs} b_0^H(x, y) - 0.31^{VKs} b_4^H(x, y) - 0.12^{VKs} b_0(x, y) + 0.12^{VKs} b_6(x, y)$$

$$\text{Clasif (37)} = -7.01 + 1.72 \times 10^{-2} V f_{2L}(x_E) + 1.94 \times 10^{-6} P q_9(x) - 0.51^K q_{1L}^H(x_{E-H}) - 8.23 \times 10^{-3}^{VK} b_{2L}^H(x_E, y_E) - 2.80 \times 10^{-2} M_s f_l^H(x) + 1.00 P_s f_0^H(x) + 8.68 \times 10^{-2} V_s f_{2L}^H(x_E) + 1.34^{Ks} f_{13L}(x_E) - 3.65 \times 10^{-2} P V_s b_8^H(x, y)$$

Con el objetivo de demostrar las posibilidades de utilización de nuestro SMC para detectar compuestos con actividad AM se utilizó como segunda SP externa (serie de simulación de CVBL) una base de datos de la GSK con 13.410 compuestos, evaluados frente a *P. falciparum* [13]. Al comparar la clasificación de estos compuestos según la actividad experimental reportada frente a la cepa Dd2 de dicho parásito, con la obtenida con nuestros modelos ensamblados en el SMC, se obtuvo un valor de  $Q$  de 91,73 % (véase Anexo 4 del CD que se adjunta en esta Tesis).

### 4.3. Protocolo CVBL integrado por diferentes filtros

Para cribar grandes bases de datos, se siguió un protocolo de CV “paso a paso” (véase Figura 7 de la sección de Materiales y Métodos) que permite evaluar de forma jerárquica aquellos compuestos candidatos a ser evaluados experimentalmente.

La Tabla 7 muestra el número de compuestos de cada base de datos que pasa de un filtro a otro en el protocolo utilizado y cada fase del mismo se profundizará en la sección de Discusión.

**Tabla 7.** Resultados del CV para las 4 bases de datos estudiadas según el protocolo paso a paso propuesto en este trabajo.

	Total	Filtro <i>Drug-likeness</i>	Similitud molecular	QSAR-ADL	AC	Selección
BD1	2000	1394	154	74	38	11
BD2	6811	2709		135	21	12
BD3	15000	13872		119	28	9
BD4	1120	832		56	31	4

donde, **BD1:** Spectrum collection

**BD2:** DrugBank

**BD3:** Otava Diversity Libraries PrimScreen15

**BD4:** Tocriscreen collections

En el caso de la base de datos de la **BD1** se utilizó un paso adicional con respecto a las demás bases de datos que fue la búsqueda de similitud molecular. Las huellas MACCS [198] y el *coeficiente de Tanimoto* [106] fueron utilizados para caracterizar las estructuras y establecer las métricas de comparación intermolecular respectivamente entre los 30 compuestos de referencia y los compuestos de la **BD1**. Se aplicó el método de fusión de datos, utilizando la función del máximo *score* [104] ordenándose la base de datos según su *score* fusionado,  $s_f$  [22, 181].

En el caso la utilización de los filtros *drug-likeness* como se ha mencionado anteriormente, se aplicaron los valores de límites superiores de varios filtros descritos en la literatura, incluyendo de esta manera otras condiciones no incluidas en la regla de Lipinski [15]. En el epígrafe 3.2.1 de Materiales y Métodos se exponen los criterios particulares que se tuvieron en cuenta en la aplicación de estas reglas.

Los compuestos retenidos por similitud (para **BD1**) o aquellos que cumplen con las reglas ADME especificadas en nuestro estudio (el resto de las bases de datos), fueron cribados por los modelos QSAR/ADL. Para ello se calcularon los DMs especificados por el SMC de *clasificación de voto no ponderado*, obtenido anteriormente para identificar nuevos AMs, obteniéndose la clasificación virtual para cada uno de los compuestos de las bases de datos.

Finalmente, empleando un AC jerárquico según el procedimiento *k*-NNCA [143] se determinan los compuestos más prometedores dentro de cada clúster teniendo en

cuenta su relación con cada miembro del mismo. Las estructuras de los 37 compuestos seleccionados por el protocolo de CVBL se muestran en el Anexo 4.

#### 4.4. Métodos *in vitro*

En la Tabla 8 se muestran los compuestos evaluados *in vitro* por el microtest basado en fluorescencia descrito en el epígrafe 3.3.1 de Materiales y Métodos.

**Tabla 8.** Total de compuestos evaluados *in vitro* y origen de cada uno de ellos.

Número	Base de datos de origen	Nombre/Código
1		Purpurina
2		Azaperona
3		Clozapina
4		7,8-Dihidroflavona
5		Flumetasona
6	BD1	17-Acetato de medroxiprogesterona
7		Acido canrenoico
8		Ursodiol
9		Hidrocloruro de noscapina
10		Salvinorin B
11		Clorhidrato de coralina
12		Physcion
13		Zipradisona
14		Isradipina
15		Flunisolida
16		Oxifenciclimina
17		Dicumarol
18		Dicloxacilina
19	BD2	Nitisona
20		Metilbromuro de anisotropina
21		Triflupromazina
22		Fluorometolona
23		Amcinonide
24		Nabilona
25		NGB 2904
26	BD3	A23187, ácido libre
27		GW 4064
28		JWH 015
29		Otava-129610003
30		Otava-1688185

Tabla 8 (continuación)

31		Otava-7018770808
32	BD4	Otava-7019050991
33		Otava-7119891531
34		Otava-7210710035
35		Otava-103950028
36		Otava-1677649
37		Otava-7017470452
Nuevos compuestos de síntesis		
38		MKG P1
39		MKG P2
40		MKG P3
41		MKG P4
42		MKG P5
43		MKG P6
44		MKG P7
45		MKG P8
46		MKG P9
47		MKG P10
48		MKG C1
49		MKG C2
50		MKG C3
51		MKG C5
52		MKG C10
53		MKG C14

De los compuestos evaluados *in vitro*, 37 corresponden a la selección a través del CVBL propuesto en esta Tesis y 16 son nuevos compuestos químicos sintetizados por el Laboratorio de Farmacoinformática y Modelización Molecular, del Departamento de Química Farmacéutica del Colegio de Farmacia ISF en Moga, India.

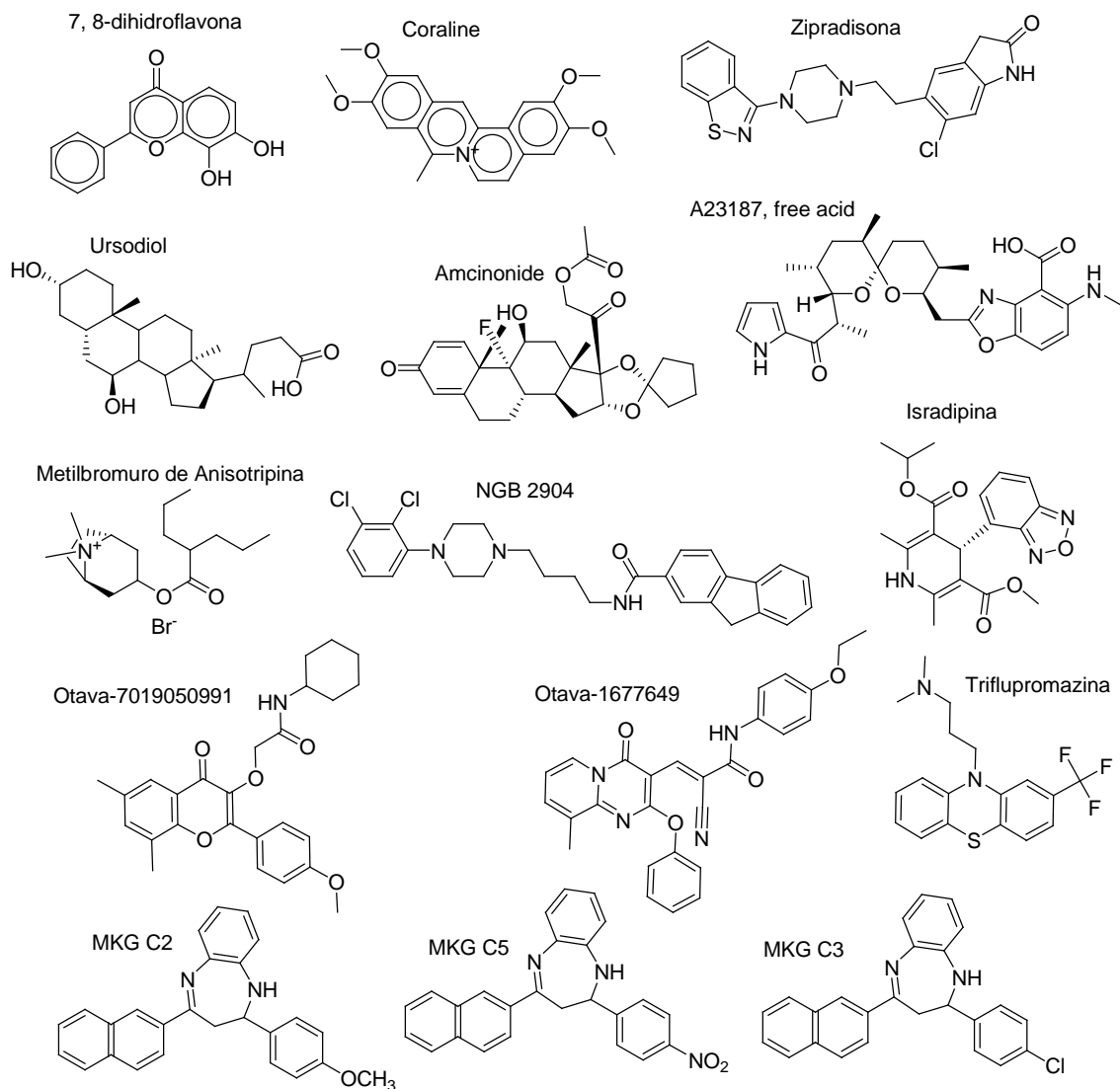
Se consideraron como activos aquellos compuestos con valores de  $IC_{50} \leq 20 \mu M$  en alguna de las dos cepas en estudio. Los datos obtenidos en el cribado *in vitro* para dichos compuestos se muestran en la Tabla 9 y las estructuras de los mismos en la Tabla 10. Como puede observarse, 9 compuestos seleccionados en el CVBL mostraron moderada actividad en ambas cepas. Como era de esperar para los fármacos ya conocidos, la toxicidad sobre macrófagos murinos fue baja. En el caso de los nuevos compuestos de síntesis, también mostraron baja citotoxicidad. Los valores señalados en

rojo son aquellos que consideramos más significativos y serán comentados en el epígrafe 5.3 de la Discusión.

**Tabla 9.** Resultados del cribado *in vitro* para los compuestos seleccionados como activos por el microtest fluorimétrico del SYBR-green I. Resultados del ensayo de citotoxicidad inespecífica y el microtest de FBIT.

No. Compuesto	IC <sub>50</sub> (μM)	IC <sub>50</sub> (μM)	Concentración citotóxica	IC <sub>50</sub> (μM)
	3D7	Dd2	(μM)	FBIT
4	13,18	12	>50	Inactivo
8	15,8	10,4	>50	Inactivo
11	<b>0,31</b>	<b>0,33</b>	<b>&gt;50</b>	<b>28,7</b>
13	5.9	6.7	–	–
14	14.7	14.2	–	–
20	9,1	–	–	<b>250</b>
21	8.3	13.3	–	–
23	4.9	15	–	–
25	3,10	–	–	>300
26	<b>0,43</b>	<b>0,67</b>	>50	>300
32	15,10	10,59	>50	>300
36	13,59	11,17	>50	>300
49	6,29	12,18	>50	>300
50	14,24	16,70	>50	>300
51	15,84	21,51	>50	<b>282</b>
CQ	0,02	0,12	>50	30,5

**Tabla 10.** Estructuras de los compuestos activos por el microtest fluorimétrico del SYBR-green I.



## *Discusión*

---

---

## 5. DISCUSION

### 5.1. Métodos *in silico*

Como se ha mencionado anteriormente en Materiales y Métodos, se ha usado una base de datos de trabajo con 2.314 compuestos, donde se han incluido compuestos AMs descubiertos en los últimos años para aumentar el dominio de aplicación de los modelos QSAR. Estos compuestos tienen estructuras diversas, no incluidas en la SE de los modelos desarrollados previamente [146-158] además de una amplia representatividad de mecanismos de acción. La base de datos de trabajo nuestra fue confeccionada previo a la publicación de la evaluada por la GSK frente a *P. falciparum* [13], por eso estos compuestos no fueron incluidos, sin embargo se usaron para simular el proceso de CV (como se verá más adelante).

Como criterio de clasificación para cada molécula se consideraron los  $\Delta P$  % (ver Materiales y Métodos epígrafe 3.1.4.). Los índices calculados resultaron útiles para describir la actividad antimalárica. Los valores logrados para  $Q$  en cada una de las ecuaciones discriminantes desarrolladas, así como los valores del resto de los parámetros utilizados comúnmente en la estadística de química médica, tales como **Sens**, **Spec**, **RFA** y **C** [170], así lo demostraron (ver Tabla 4).

En este contexto, la **Sens** no es más que la probabilidad de predecir un caso positivo correctamente, mientras que la **Spec** es la probabilidad de que una predicción positiva sea correcta. El valor de **C**, cuantifica la fuerza de la relación lineal entre los DMs y las clasificaciones, y puede proporcionar a menudo una evaluación más equilibrada de la predicción que, por ejemplo, los valores de  $Q$ . En este sentido todos los modelos obtenidos mostraron valores de **C** superiores a 0,71 tanto para la SE como para la SP, siendo el valor más elevado para el modelo 37 (0,82).

La **RFA** constituye un parámetro indispensable el cual refleja la posibilidad de seleccionar un compuesto inactivo (no AM) como positivo (AM), por lo que esta razón debe ser lo menor posible [170]; sobre todo si tenemos en cuenta que el fin de estos modelos es desarrollar procesos de CV. Por esta razón, mientras menor sea la cantidad de compuestos falsamente clasificados como activos, mejor serán sus poderes predictivos en la práctica. En todos los modelos obtenidos, los valores de **RFA** fueron menores que el 14,4%, tanto para SE como para SP, lo que puede estar dado por la

amplia diversidad estructural de los datos y la carencia de una rigurosidad extrema en la selección, de los compuestos inactivos.

Los 37 modelos obtenidos mostraron valores de  $Q$  por encima de 86,05%, tanto para SE como SP. De forma general todos los parámetros estadísticos [170] fueron adecuados para ambas series, en la totalidad de modelos mencionados. El modelo 37 fue el resultado de la combinación de todos los esquemas de ponderación en los índices no-estocásticos y estocásticos. Este modelo clasificó correctamente el 91,41% de la SE con un alto valor de  $C$  (0,82) y baja  $RFA$  (8,75%), siendo el mejor de todos los modelos individuales (ver Tabla 4).

Con el ánimo de promover la aceptación de estos por parte de los órganos regulatorios, existen principios reflejados por la OCDE [110] (guía internacional de buenas prácticas QSAR) que deben tenerse en consideración a la hora de realizar estos estudios.

a) *Principio 1*: Un punto de medición definido

El punto de medición en nuestro caso es la clasificación *experimental* de compuestos en dos grupos: Activo (1) e Inactivo (-1), según la actividad antimalárica, la cual se puede medir y posteriormente modelar; sin embargo no fue establecido ningún protocolo experimental específico. Se utilizaron diferentes medidas cinéticas, ya que la actividad fue reportada por diversos parámetros, según se mencionó en el epígrafe 3.1.1 de Materiales y Métodos; por consiguiente, el enfoque utilizado sería de un QSAR *global* basado en una base de datos no-congenérica. De esta forma la actividad solo está estimada por la estructura química, aspecto importante para la identificación de nuevos compuestos líderes.

b) *Principio 2*: Un algoritmo no ambiguo

Se utilizó un algoritmo matemático bien definido, el cual es caracterizado por el ADL como la herramienta matemática para relacionar el punto de medición (variable respuesta) y los descriptores de la estructura química. Los DMs en este caso fueron los índices lineales [114, 115, 134, 163-165], cuadráticos [159-162] y bilineales [166, 167], basados en relación de átomos tanto estocásticos como no estocásticos. Estos están dados con toda claridad en la literatura internacional, por lo que, se considera que nuestro algoritmo no es ambiguo.

---

c) *Principio 3*: Un dominio de aplicación definido

Con el fin de definir el Dominio de aplicación de modelos, se utilizó un enfoque basado en la distancia de Euclidea como se aplican en el programa de Ambit [199], En general se reconoce que los modelos QSAR son válidos sólo si están dentro del mismo dominio de aplicación para el que se desarrollaron. De hecho, incluso si se desarrollan los modelos con la misma base de datos, el dominio de aplicación para los nuevos productos químicos puede diferir de un modelo a otro, dependiendo de los DMs específicos. Por lo tanto, los compuestos químicos seleccionados en este estudio sólo se utilizaron en los experimentos in vitro después de que se les determinó si estaban o no incluidos en el dominio de aplicación de los modelos obtenidos previamente. Para ello, se utilizó el enfoque basado en la distancia como se aplican en el programa de Ambit. En este análisis, los compuestos se encontraban dentro del ámbito de aplicabilidad de los modelos desarrollados, lo que asegura una gran fiabilidad para la predicción utilizado el CV [200].

d) *Principio 4*: Medidas apropiadas de bondad de ajuste, robustez y predictibilidad

Como ejercicio de validación interna se empleó el método de VC de “dejar-grupos-fuera”, (LGO, por sus siglas en inglés). En este caso hemos tomado como referencia el modelo 37 que es una combinación de todos los índices empleados además de ser el que mejor comportamiento obtuvo de los clasificadores individuales.

En el Gráfico 1 se ilustran los resultados del ejercicio de VC para el modelo 37 donde se observa que la  $Q$  para la SE del nuevo modelo obtenido en cada caso, se mantiene entre 90,9 y 91,72%. De igual manera para el caso de los valores de **RAF** mostrados en el Gráfico 2, los cuales oscilan entre 8,14 y 10,09. En ambos casos no existen variaciones significativas de estos parámetros para los nuevos modelos obtenidos tras dejar fuera los grupos correspondientes para la VC, por lo que puede concluirse que el modelo 37 tiene una gran estabilidad a perturbaciones dentro de la SE, por lo tanto se trata de un modelo con adecuada calidad.

En el ejercicio de aleatorización de la variable respuesta observado en el Gráfico 3, se refleja la disminución del valor de  $Q$  y el aumento en los valores de **RFA** a medida que aumenta el porcentaje de compuestos a los cuales se les invierte la clasificación en la SE. Este desajuste de los parámetros estadísticos nos permite afirmar que los valores obtenidos no se deben a correlaciones casuales ni a redundancia estructural en la SE.

---

La predictibilidad de los modelos obtenidos se relaciona sobre todo con los valores de  $Q$  para la SP externa de nuestra base de datos (ver Tabla 4), donde dichos valores oscilan entre 86,18 y 91,36 % para los 37 modelos individuales. Esto demuestra el satisfactorio poder predictivo de nuestros modelos basados en relaciones de átomos, donde el modelo numero 37 alcanza los mayores valores de  $Q$ . En la construcción de SMC que se discutirá más adelante en este mismo epígrafe, se empleó una SP externa mucho más extensa.

e) *Principio 5: Una interpretación mecanicista, si es posible*

En el presente estudio, no es posible esta interpretación debido a la naturaleza de los datos usados para confeccionar los modelos QSAR, pues los mismos fueron desarrollados con el propósito de obtener la clasificación de los compuestos, por lo que es difícil hacer una interpretación químico-física o estructural de ellos.

Todo eso nos animó a combinar estos modelos en un modelo único de predicción o SMC que fusione todas las funciones discriminantes obtenidas. La fusión de modelos independientes para obtener un sistema multicriterial, se realiza con el propósito de mejorar la calidad de la clasificación individual. De esta forma, cada modelo capta por separado una fracción de la información química contenida en la base de datos a través de los DMs que usa y con la fusión se complementa dicha información [173, 174].

Una de las condiciones para obtener buenos SMC es partiendo de clasificadores individuales lo más diversos posible [115], por lo que a los 37 modelos obtenidos se les llevó a cabo un estudio de diversidad que permitió escoger los mejores clasificadores a combinar. De esta forma se seleccionaron los 12 modelos que maximizaron el valor de  $DIF_{1,2}$  (ver epígrafe 4.2 de Resultados y Anexo 3), reduciendo así el número de clasificadores a combinar y garantizando la diversidad necesaria.

Se realizaron 2 métodos para combinar los modelos QSAR en aras de obtener mejores resultados en la modelización molecular de la actividad AM, los cuales fueron el *voto ponderado* y el *voto no ponderado*. Un punto importante para construir los SMCs es combinar la salida de los modelos individuales para lo cual existen diferentes formas estadísticas, las cuales dependen de si ésta es categórica (*activo* o *inactivo*) o continua (probabilidad pronosticada de pertenencia a una clase) [15]. Después de seleccionados los 12 modelos con mayor diversidad se realizó el análisis del *voto ponderado*, utilizándose como variable independiente el  $\Delta P$  de cada uno de los casos.

---

Los resultados expuestos en el Gráfico 4 y la Tabla 5 para el *voto ponderado* y *no ponderado* respectivamente, muestran diferencias en los posibles SMC a utilizar ya que fueron obtenidos por métodos de ensamblaje diferentes. Por el método del *voto ponderado* (Gráfico 4) se obtuvo que el número óptimo de clasificadores a combinar era 7 y por el método del *voto no ponderado* (ver Tabla 5) se obtuvo que el SMC integrado por 3 modelos mostraba el mejor resultado, con la función del mínimo como poder de agregación. Ambos SMC superaron en calidad el comportamiento del modelo 37 (ver Tabla 6), sobre todo teniendo en cuenta que los valores de  $Q$  fueron mayores que el alcanzado por el modelo individual en SP. En el caso del SMC del *voto no ponderado* el valor de  $Q$  fue de 91,35 para la SE, el cual es similar al valor alcanzado por el modelo 37 (91,41). Sin embargo la elección de este SMC está justificado por el hecho de superar los valores de **Spec** y en lograr los menores valores de **RFA** tanto en SE como en SP, con menor número de clasificadores individuales.

Como hemos mencionado anteriormente, nuestro objetivo es hacer una selección lo más eficiente posible de compuestos a evaluar experimentalmente, por tanto, el criterio de tener valores de **RFA** lo menor posible, disminuye la posibilidad de evaluar compuestos que son inactivos y han sido clasificados como activos. De esta forma se escogió el SMC integrado por los modelos 2, 35 y 37 obtenido por el método de *voto no ponderado* para ser empleado en los próximos pasos de este estudio.

En la Tabla 11 se muestra una comparación del comportamiento del SMC seleccionado en esta Tesis con otros modelos individuales desarrollados por otros autores [114, 116, 135]. En todos se ha empleado el ADL como técnica de clasificación de actividad antimalárica; sin embargo la mayor parte de los trabajos han sido desarrollados usando una o pocas series de compuestos, lo que limita el CV de bases de datos, pues esas predicciones solo son fiables en el espectro de los núcleos bases usados para entrenar a los modelos. En esta Tabla se observa que los modelos EcA [116] y EcC [114], logran los mayores valores de  $Q$  (superiores a 93%), aunque muy similares a los obtenidos para el SMC que proponemos en esta Tesis. La principal debilidad de estos modelos es que están confeccionados a partir de una base de datos mucho menor que la nuestra (2.314 compuestos); además de que ambos fueron obtenidos solo a partir de índices cuadráticos estocásticos (EcA) y con índices lineales no estocásticos (EcC). Por otro lado, en los modelos representados por EcB [135] y EcD [114], se logra un comportamiento inferior al obtenido por el SMC en cuestión y en el caso de EcB, la

base de datos utilizada es muy pequeña, reduciendo el dominio de aplicación de dicho modelo.

El éxito del empleo del SMC que proponemos es la obtención de resultados excelentes, con el empleo de una base de datos mayor, por consiguiente un mayor dominio de aplicación. Además se ha logrado a través de combinaciones de modelos individuales por lo que aporta una información basada en múltiples criterios. En sentido general, la utilización de SMCs resulta una alternativa eficaz y rápida para la detección de propiedades farmacológicas a nuevas entidades moleculares procedentes tanto de la diversa y poco explorada naturaleza como del amplio mundo de la síntesis química.

**Tabla 11.** Comparación entre el mejor SMC seleccionado y otros modelos publicados para la actividad antimalárica.

<b>Modelos de clasificación basados en la estructura de compuestos</b>					
<b>AMs</b>					
<b>Característica del modelo</b>	<b>SMC (2-35-37)</b>	<b>EcA</b>	<b>EcB</b>	<b>EcC</b>	<b>EcD</b>
<i>N</i> total	2.314	1.562	59	1.562	1.562
<i>N</i> antimaláricos	851	597	25	597	597
Programa	TOMOCOMD	TOMOCOMD	TOMOCOMD	TOMOCOMD	TOMOCOMD
Técnica	ADL	ADL	ADL	ADL	ADL
<b>SE</b>					
<i>N</i> total	1.735	1.120	41	1.120	1.120
<i>N</i> antimaláricos	638	437	17	437	437
<i>Q</i> (%)	91,35	93,73	90,2	94,02	91,52
<b>SP</b>					
<i>N</i> total	579	442	18	442	442
<i>N</i> antimaláricos	213	160	8	160	160
<i>Q</i> (%)	92,06	93,04	83,3	93,42	90,5

donde, Ec A-D corresponden a modelos de predicción de actividad antimalárica obtenidos en trabajos previos [114, 116, 135].

---

El empleo de una extensa SP externa con la obtención de una  $Q$  del 91,73% para la predicción virtual, con respecto a los resultados experimentales reportados por la GSK para *P. falciparum* (cepa Dd2), nos aporta una ejercicio que valida aun más el poder predictivo de nuestro sistema de clasificación, evidenciada por la buena correspondencia entre ambos resultados (véase Anexo 4 del CD que se adjunta en esta Tesis).

## 5.2. Protocolo de CVBL para la identificación de AMs a partir de bases de datos

El diagrama de flujo ilustrado en la Figura 7 resume el protocolo de selección virtual propuesto en nuestro estudio. Esta estrategia de trabajo incluye al SMC obtenido en este Tesis, como principal “interruptor” para la priorización de compuestos en el proceso de CVBL. Dicho protocolo incluye varios filtros computacionales de forma integrada y podría servir de guía para los que trabajan en el área de CVBL-QSAR. Se cribaron 4 bases de datos cuyas características se muestran en la Tabla 3 de Materiales y Métodos. Algunas de estas bases de datos tienen en su catálogo la lista de empresas que lo produce lo cual es una ventaja ya que permite adquirir los compuestos por la compra directa a sus propietarios, evitando el proceso de síntesis o aislamiento, que es un paso lento del proceso.

Los resultados mostrados en la Tabla 7 evidencian que este procedimiento *jerarquizado* permite reducir la cantidad de compuestos gradualmente después de cada filtro de forma rápida y precisa. A continuación se describen los resultados obtenidos para las 4 bases de datos cribadas en las diferentes etapas del CVBL siguiendo la estrategia referida.

La limpieza de las bases de datos consiste en la eliminación de duplicados y restos de moléculas que puedan afectar el procedimiento de cálculos de DMs, así como alterar el resultado final. El primer paso consiste en reducir el número de compuestos (diseño negativo) empleando los filtros de *drug-likeness*. Éstos son muy simples, rápidos y permiten además “optimizar” de alguna manera simultáneamente la potencia y la farmacocinética [201]. Se utilizaron los límites superiores de algunos filtros descritos en la literatura, (véase epígrafe 3.2.1 de Materiales y Métodos) seleccionando los compuestos que cumplieron con los criterios establecidos [22]. Los compuestos que entran en el próximo paso del CVBL tendrán características favorables para ser

---

empleados como fármacos en caso de tener actividad AM, descartando aquellos que no posean propiedades adecuadas de ADME.

El siguiente paso reduce la biblioteca de compuestos por el análisis de similitud con los compuestos de referencias (30 AMs). Este paso solo fue empleado para el caso de **BD1** (*Spectrum collection*). El resultado de este paso es una quimioteca más focalizada (*focused library*), pues todos los compuestos incluidos en ella presentan rasgos comunes a los compuestos de referencia según la medida de comparación intermolecular establecida (*coeficiente de Tanimoto*) [106].

De esta manera, se retuvieron los primeros 154 compuestos según los criterios mencionados en el epígrafe 3.2.2 de Materiales y Métodos, para el caso de la **BD1**. Estos compuestos se parecen de alguna manera a uno de los 30 compuestos de referencia (diseño positivo). El paso 3 del protocolo incluye también otro enfoque de diseño positivo, como puede observarse en la Tabla 7, este filtro computacional es el que reduce el número de compuestos de una forma más rigurosa, siendo el más importante en la selección de los compuestos como posibles AMs. Así por ejemplo, de la **BD3** y **BD4** se elimina más del 90 % de los compuestos que pasan el filtro anterior a través de los modelos de predicción. Es evidente que el empleo del filtro de similitud molecular puede reducir la cantidad de compuestos en el filtro con buena sensibilidad; pero también se puede correr el riesgo de dejar compuestos fuera que pueden ser nuevos núcleos bases y no tienen semejanza con los fármacos de referencia. Por este motivo proponemos su utilización o no en próximos protocolos de CVBL.

Finalmente, en el AC empleado descrito en el epígrafe 3.2.4 de Materiales y Métodos [143], se incluyeron los compuestos procedentes del filtro anterior, así como los activos de nuestra base de datos de trabajo. Mediante una inspección visual detallada de las estructuras químicas, se analizó cada clúster formado y se seleccionaron compuestos semejantes estructuralmente a compuestos activos, tratando de obtener la mayor representatividad y diversidad de núcleos bases. Es decir, tratando de seleccionar compuestos disimilares entre sí y disimilares a las sustancias AMs de referencias para así descubrir nuevos núcleos base con dicha actividad. Es importante señalar que dentro de los compuestos eliminados después del AC, están aquellos cuya actividad antimalárica ha sido descrita en la literatura, aunque las propias bases de datos no lo describan. Este hecho corroboró la aplicabilidad de nuestro protocolo en el descubrimiento de nuevos AMs a partir de grandes bases de datos. La decisión final

para ser evaluados experimentalmente se basó además, en la disponibilidad y precio en Sigma-Aldrich. En el caso de los compuestos predichos como activos de la base de datos **BD3** los productos se adquirieron directamente de sus laboratorios.

Los fármacos pueden tener más de una actividad farmacológica, este tipo de “re-descubrimiento” representa una reducción para la quimioterapéutica, pues se evitan los largos lapsos de tiempo que demora un compuesto en entrar en el mercado, pues los fármacos que son re-descubiertos ya se encuentran en uso y sus propiedades farmacocinéticas y toxicológicas son bien conocidas [202].

La utilización de esta estrategia de CVBL usando un procedimiento paso a paso de varios filtros computacionales mostró su aplicabilidad en la identificación de compuestos con actividad terapéutica diferente a la estudiada (fármacos con otros usos). Esto brinda una posibilidad hacia la reposición de fármacos “viejos” con indicaciones nuevas, en este caso como AM, siendo una estrategia económicamente atractiva cuando se compara con el costo de fármacos desarrollados mediante métodos *de novo*, lo cual ha despertado el interés de búsqueda de los investigadores en farmacopeas [203] fundamentado principalmente por el limitado gasto experimental, posibilitando concentrarse rápidamente en las estructuras candidatas más prometedoras.

### 5.3. Métodos *in vitro*

Los 15 compuestos que mostraron valores de  $IC_{50} \leq 20 \mu M$  se consideraron como activos. Esto fue uno de los criterios de inclusión de compuestos en la serie de activos a la hora de confeccionar la base de datos utilizada para el desarrollo de los modelos QSAR/ADL. De ellos 12 fueron identificados como AMs por el cribado virtual llevado a cabo y 3 son nuevas moléculas de síntesis. Ninguno de estos compuestos tenían descrita actividad experimental directamente frente a *Plasmodium* spp.

Los compuestos más activos fueron el **11** y el **26** con valores de  $IC_{50}$  de 0,31 y 0,43  $\mu M$  para la cepa 3D7 respectivamente, así como 0,33 y 0,67  $\mu M$  frente a la cepa Dd2 respectivamente. Ambos compuestos tuvieron un comportamiento similar frente a las 2 cepas utilizadas en el estudio 3D7 y Dd2 (sensible y resistente a CQ respectivamente).

El compuesto **11** (Clorhidrato de coralina), que presenta la actividad antimalárica más potente de todos los ensayados, muestra semejanza en cuanto a actividad citostática con la berberina, conocido AM que actúa sobre el ADN [204]. Se ha demostrado que este compuesto se une selectivamente a la zona (poliA) del ARN; pero no está claro el

---

mecanismo por el cual se lleva a cabo esta unión [205]. También tiene una estructura similar a otras benzo[c]fenantridinas cuaternarias, las cuales son potentes inhibidores de topoisomerasas humanas con actividad antimalárica. Sin embargo, para ellas se describe pérdida de actividad *in vitro* frente a *P. falciparum*, con respecto a otras benzo[c]fenantridinas [155]. Por todo ello se ha sugerido que el modo de acción frente al parásito para este tipo de compuesto puede ser diferente al efecto producido en las células cancerosas humanas [155]. De hecho, los resultados obtenidos en el test FBIT señalan una capacidad de inhibición de la biomineralización de la  $\beta$ -hematina ( $IC_{50} = 28,7 \mu M$ ) del orden de la que presenta la CQ ( $IC_{50} = 30,5 \mu M$ ) en este y ensayos previos [206], lo que sugiere un mecanismo de acción relacionado con el proceso de la degradación de la Hb [22].

El compuesto **26** (A23187 ácido libre), es producido en la fermentación por *Streptomyces chartreusensis* y forma complejos estables con iones divalentes de calcio, aumentando su concentración intracelular y por consiguiente la muerte celular [207]. También interfiere en la fosforilación oxidativa e inactiva la ATPasa mitocondrial, induciendo la apoptosis en algunas líneas de células y la previniéndola en otras [208]. La escasa o nula actividad registrada en el test FBIT ( $IC_{50} > 300$ ) no aporta en este caso información alguna acerca de su mecanismo de acción.

En el caso del compuesto **4** ha sido evaluado frente a *Trypanosoma brucei* con una  $IC_{50}$  de  $2,3 \mu M$  [209], siendo su actividad antimalárica ( $IC_{50}$  en torno a  $12 \mu M$ ) bastante inferior a la tripanocida.

Para el compuesto **8** se ha descrito su actividad inhibitoria frente a la enzima alanina aminopeptidasa de la familia M1 de *P. falciparum* (M1AAP) mediante un ensayo que midió la hidrólisis de un sustrato péptico fluorogénico (H-Leu-NHMec) (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/assay/assay.cgi?aid=1445#aDescription>) mediante la fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 370 nm y de emisión de 460 nm. Sin embargo este ensayo no se lleva a cabo directamente con el parásito cultivado *in vitro*, por lo que la actividad frente a la enzima no es una condición que impida la evaluación frente a nuestras cepas de *P. falciparum*, ya que la misma puede no corresponderse con la observada en la célula parasitaria. De cualquier forma debemos tener en cuenta que la enzima M1AAP es una aminopeptidasa citosólica relacionada con la etapa terminal del proceso de digestión de la Hb en el eritrocito, por lo que puede ser un posible mecanismo de acción para este compuesto.

El compuesto **13** es un antipsicótico atípico con acción antagonista de los receptores D2 y tiene una elevada afinidad por los receptores 5-HT<sub>2A</sub> en los que inhibe la liberación de serotonina y ocasiona un aumento de la transmisión dopaminérgica [210]. Su afinidad por receptores alfa<sub>1</sub> y H<sub>1</sub> es moderada, mientras que por los muscarínicos es casi inexistente [211]. El mismo está aprobado por la FDA para el tratamiento de la esquizofrenia y estados asociados con trastornos bipolares [212]. Sin embargo el mecanismo de acción de este compuesto, como ocurre con otros medicamentos utilizados para tratar la esquizofrenia, es desconocido.

Mientras tanto, el compuesto **14** es una dihidropiridina bloqueadora de canales de calcio que, por lo general, se prescribe para el tratamiento de la hipertensión arterial con el fin de reducir el riesgo de accidente cerebrovascular y ataque cardíaco. Las investigaciones más recientes en modelos animales sugieren que este puede tener usos potenciales para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson [213]. Se ha descrito que bloqueadores de canales de calcio como el verapamilo, restauran la sensibilidad a CQ en cepas de *P. falciparum* resistentes al medicamento, aunque aun se debate si esta resistencia es producto de una rápida salida de la CQ, o por el contrario de una menor entrada del fármaco al parásito. De cualquier forma, existe evidencia experimental que sugiere que el fenómeno está asociado con alteraciones en el transporte del medicamento causados por los fármacos que actúan bloqueando los canales de calcio [214]. Para el compuesto **14** no se ha reportado la acción previamente, aunque la misma puede deberse al mecanismo descrito para el verapamilo.

El compuesto **23** es un glucocorticoide tópico utilizado para tratar el prurito, enrojecimiento e inflamación, asociada con varias enfermedades dermatológicas como la dermatitis atópica y la dermatitis de contacto alérgica. Tiene una débil afinidad por el receptor de progesterona, y prácticamente ninguna por receptores de mineralocorticoides, estrógenos o de andrógenos. Los corticosteroides se cree que actúan por la inducción de proteínas inhibitoras de la fosfolipasa A<sub>2</sub>, llamadas lipocortinas [215].

Los compuestos **13**, **14** y **23** se evaluaron frente a enzimas M1AAP de *P. falciparum*, mediante el ensayo mencionado anteriormente. Estos también se han evaluado frente a una aminopeptidasa de la familia M17-leucina (*PfM17LAP*) y una M17 aspartil aminopeptidasa (*PfM17AAP*) de *P. falciparum*. <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/assay/assay.cgi?aid=434965>. Dichas enzimas se

---

encuentran en todas las etapas intra-eritrocitarios del parásito, y su función es completar la hidrólisis de la Hb en aminoácidos que serán usados para síntesis proteica de *ex novo*. En ambos ensayos ninguno de estos compuestos mostraron actividad, por lo que la actividad encontrada por nosotros puede estar relacionado con otro mecanismo de acción de dichos compuestos frente a *P. falciparum*.

El compuesto **21** es un medicamento antipsicótico de la clase de las fenotiazinas y su indicación es básicamente para los vómitos severos. El mecanismo propuesto para el efecto antiemético es fundamentalmente por bloqueo de los receptores D2 del neurotransmisor dopamina, en la zona de activación de los quimiorreceptores en el centro del vómito. Se ha descrito que bloquea el neurotransmisor dopamina en el nervio vago en el tracto gastrointestinal. Este compuesto también se une a los receptores de acetilcolina muscarínicos (M1 y M2) y los receptores triptamina D (5HT2B). Se ha descrito en algunas fenotiazinas como es el caso de la clorpromazina y la trifluoperazina que modulan la resistencia a la CQ *in vitro* e *in vivo* en cepas procedentes de África y sureste de Asia [216-219]. En otros estudios sin embargo estas mismas fenotiazinas han mostrado actividad intrínseca *in vitro* frente a *Plasmodium* [216, 217]. La inhibición de la falcipaina y la interacción con el grupo hemo (FPIX) se ha asociado a la actividad de compuestos de este tipo [220, 221]. Específicamente la acción de el compuesto **21** no ha sido descrita, pero se suma a la teoría de las fenotiazinas como cabezas de serie para fármacos AM [222].

El compuesto **20** es una sal de amonio cuaternario que se ha usado como complemento en el tratamiento de la úlcera péptica, aunque ha sido sustituido por el uso de agentes más eficaces. Dependiendo de la dosis, puede reducir la motilidad y la actividad secretora del sistema gastrointestinal y el tono del uréter y la vejiga urinaria además de tener una ligera acción relajante sobre los conductos biliares y la vesícula biliar [223].

Se ha descrito el compuesto **25** como un antagonista selectivo de receptores D3 de dopamina, siendo 56 veces más selectivo a estos que a los de tipo D2 en humanos [224]. En modelos animales de adicción se ha observado que este compuesto presenta su acción dependiendo de la dosis, por lo que solo bajas dosis fueron efectivas y el efecto antiadictivo pudo ser revertido aumentando las dosis de cocaína u otra fármaco de este tipo [225].

Los compuestos **32** y **36**, pertenecen a la base de datos **BD3** (Otava Diversity Libraries PrimScreen15), la misma ha sido creada con fines investigativos, específicamente para realizar cribados farmacológicos dada la diversidad estructural de los compuestos que la integran. Estos compuestos no tienen actividad farmacológica descrita.

Los compuestos **49-51** son nuevos compuestos de síntesis que mostraron *in vitro* actividad moderada frente a *P. falciparum*. Los mismos se cribaron de manera retrospectiva por los modelos que integran el SMC empleado para el cribado de las 4 bases de datos en estudio. Los resultados de este cribado se muestran en la Tabla 12, donde se observa que en los tres casos, los compuestos fueron clasificados como activos en el CV ( $\Delta P > 0$ ) por cada uno de los modelos que integran el SMC, demostrando la predictibilidad de el sistema propuesto.

**Tabla 12.** Clasificación virtual de los nuevos compuestos de síntesis que mostraron actividad *in vitro* frente a *P. falciparum*.

Compuesto	$\Delta P$ (%)			
	modelo 2	modelo 35	modelo 37	promedio
MKG C2	68,96	90,52	72,01	77,16
MKG C3	73,50	96,35	89,83	86,56
MKG C5	74,06	95,10	86,42	85,19

En el ensayo de citotoxicidad inespecífica frente a cultivos de macrófagos se obtuvo como resultado que los compuestos activos frente a *P. falciparum*, tanto los seleccionados en el cribado virtual (fármacos con otros efectos biológicos ya conocidos) como los nuevos compuestos de síntesis, no mostraron actividad citotóxica a la máxima concentración ensayada (50  $\mu$ M).

El ensayo de FBIT descrito previamente en el epígrafe de Materiales y Métodos presenta las limitaciones de que sólo aquellos compuestos que inhiben la biomineralización del grupo hemo muestran actividad en este ensayo, pero no selecciona compuestos con otros mecanismos de actividad antimalárica. Por ello, su valor como prueba de descarte de actividad antimalárica es limitado. Por otro lado se trata de un proceso *in vitro* que simula las condiciones de la biomineralización a un nivel íntimo de interacción entre los componentes involucrados, sin tener en cuenta que

una sustancia que eventualmente presente actividad, deberá atravesar al menos 3 tipos de membranas antes de llegar a su sitio de acción: la membrana del eritrocito, del parásito y de la vacuola digestiva. Por lo que deben realizarse paralelamente a esta prueba otros ensayos de actividad antimalárica [226].

A pesar de esas limitaciones, es interesante la información adicional a la actividad antimalárica que puede aportar, como es el caso de los dos compuestos más activos frente al parásito, el **11** (Clorhidrato de coralina) y el **26** (A23187 ácido libre).

El compuesto **20** (Metilbromuro de anisotripina) de los cribados *in silico* en este trabajo, y el **51**, perteneciente a la serie de los nuevos compuestos de síntesis, presentaron unos valores de  $IC_{50}$  de 250 y 282  $\mu$ M respectivamente. Estos valores son similares a los descritos para la quinina en un ensayo similar ( $IC_{50} = 324 \mu$ M) [193], de acuerdo con la descripción de que la quinina tiene un coeficiente de unión débil con la FPIX [140].

En sentido general, se puede plantear que la estrategia de trabajo que se propone como objetivo de la presente investigación, y que además se desarrolla, puede ser utilizada para la búsqueda de compuestos con actividad antimalárica. La integración de métodos *in silico* permite cribar grandes bases de datos de forma eficiente, reduciendo en cada etapa del proceso, el número de compuestos para ser evaluados experimentalmente.

En definitiva, respondiendo al objetivo general de esta Tesis, se concluye que la estrategia de tamizaje farmacológico desarrollada para el descubrimiento de potenciales fármacos antimaláricos, a través del empleo jerárquico de nuevos “filtros” *in silico*, permite el cribado eficiente de bases de datos de compuestos químicos y limita la posterior corroboración experimental de dicha actividad exclusivamente a los candidatos más prometedores. Así, sólo 37 (0,14%) de los 24.928 compuestos de partida consiguen pasar los sucesivos filtros, lo que da idea del nivel de exigencia del sistema propuesto, así como del ahorro que supone en ensayos *in vitro*.

De estos 37 que superan el cribado *in silico*, un total de 12, lo que representa un porcentaje considerable (32,4%), muestran una actividad interesante *in vitro*. Y de este grupo, 8 son fármacos con otros usos terapéuticos conocidos, es decir son fruto del “*drug repositioning*” o reutilización de medicamentos, lo que indica que esos compuestos ya han superado etapas importantes (y en muchos casos limitantes) en el desarrollo de fármacos, lo que supondría una ventaja adicional. Estos últimos son

*potenciales fármacos promiscuos*, cuyas propiedades farmacocinéticas y toxicológicas son ya conocidas.

*Conclusiones*

---

---

## 6. CONCLUSIONES

1. La utilización de descriptores moleculares (DMs) implementados en el programa TOMOCOMD-CARDD (Diseño computacional topológico molecular, módulo dediseño racional de fármacos asistido por ordenador) y Análisis discriminante lineal (ADL) ha permitido la obtención de 37 modelos QSAR (Relaciones Cuantitativas Estructura-Actividad) de actividad antimalárica; habiéndose efectuado con éxito los ejercicios de validación interna y externa para demostrar la *robustez* y poder predictivo de los mismos.
2. La confección de un sistema multclasificador (SMC), obtenido a partir de los 37 modelos QSAR/ADL mediante el método de *voto no ponderado*, ha permitido mejorar la predicción de los clasificadores individuales para su utilización en el cribado virtual basado en ligando (CVBL).
3. El empleo como serie de predicción externa, de una base de datos de 13.410 compuestos con actividad antimalárica (GlaxoSmithKline), ha permitido la predicción de actividad en el 91,73% de los mismos, lo que demuestra el poder de selección del sistema multclasificador desarrollado y aporta la validación mas exhaustiva.
4. La aplicación del cribado virtual basado en ligando (CVBL) a un total de casi 25.000 compuestos pertenecientes a cuatro bases de datos, mediante un protocolo que integra varios filtros computacionales, permitió la selección de únicamente 37 compuestos (1,6% del total) para ser evaluados *in vitro* frente a *P. falciparum*.
5. Un porcentaje considerable (32,4%) de los 37 compuestos que superan el cribado *in silico* muestran *in vitro* una interesante actividad antimalárica, y ocho de ellos (21,6%) son fármacos con otros usos terapéuticos y por tanto con propiedades farmacocinéticas y toxicológicas conocidas, ventaja adicional que les convertiría en *potenciales fármacos promiscuos*.
6. El Clorhidrato de coralina (compuesto 11), así como el denominado Acido libre A23187 (compuesto 26) son los más activos sobre cultivos de *P. falciparum*. Los resultados del test de inhibición de la biomineralización de la ferriprotoporfirina IX, sugieren exclusivamente para el primero un mecanismo de acción relacionado con el proceso de degradación de la hemoglobina.

7. La utilización de sistemas multclasificadores, resulta una alternativa eficaz y rápida para la detección de propiedades farmacológicas en nuevas entidades moleculares, tanto de origen natural como obtenidas por síntesis química.
8. El protocolo de Cribado Virtual Basado en Ligando (CVBL) propuesto ha permitido la identificación de un número reducido de compuestos con potencial actividad antimalárica, que incluye fármacos ya comercializados con otros usos, optimizando el tiempo y el coste de los ensayos preclínicos.

# *Recomendaciones*

---

## 7. RECOMENDACIONES

- ✓ El protocolo de cribado utilizado puede aplicarse a la selección de compuestos con determinados mecanismos de acción frente a *Plasmodium* spp., si se enfoca para este propósito la base de datos.
- ✓ Esta estrategia puede ser empleada en el cribado farmacológico para el descubrimiento de fármacos con otras actividades biológicas integrando modelos *in silico* e *in vitro*.

# *Referencias Bibliográficas*

---

---

**8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Machado Y, *et al.* Paludismo, enfermedad del tercer mundo. 2011; Disponible en: <http://www.monografias.com/trabajos77/paludismo-enfermedad-tercer-mundo/paludismo-enfermedad-tercer-mundo.shtml>.
2. Snow RW, *et al.* The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*. **2005**;434(7030): p. 214-217.
3. López HGM, Fumadó PV, González TMI. Actualización en el diagnóstico y tratamiento de la malaria. *Anales de Pediatría*. **2012**.
4. Cox-Singh J, *et al.* *Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. **2008**;46(2): p. 165-171.
5. Chan M. World Malaria Report: 2012, W.G.M. Programme, Editor, *World Health Organization*. **2012**.
6. Granda RS, Jiménez MM. Paludismo: El desarrollo de una vacuna. *Hospital Clínico Universitario de Valencia*: Valencia. p. 1-10.
7. Jiménez JN, Muskus CE, Vélez ID. Diversidad genética de *Plasmodium falciparum* y sus implicaciones en la epidemiología de la Malaria. *Biomedica*. **2005**;25(004): p. 588-602.
8. Doderer C, *et al.* A new ELISA kit which uses a combination of *Plasmodium falciparum* extract and recombinant *Plasmodium vivax* antigens as an alternative to IFAT for detection of malaria antibodies. *Malaria Journal*. **2007**;6: p. 19.
9. González PD. Nuevas dianas terapéuticas para el tratamiento de la malaria. *Enfermedades Emergentes*. **2005**;7(1): p. 40-43.
10. Fidock DA, *et al.* Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance. *Molecular Cell*. **2000**;6(4): p. 861-871.
11. White NJ. Antimalarial drug resistance: the pace quickens. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **1992**;30(5): p. 571-585.
12. Pérez-Nueno VI. Herramientas de cribado virtual aplicadas a inhibidores de entrada del VIH. Diseño de nuevos compuestos anti-VIH. *Tesis de Doctorado*, Departamento Química Orgánica. Escola Técnica Superior IQS: Barcelona; **2009**.
13. Gamo FJ. *et al.* Thousands of chemical starting points for antimalarial lead identification. *Nature*. **2010**;465(7296): p. 305-310.
14. Ekins S, *et al.* *In silico* repositioning of approved drugs for rare and neglected diseases. *Drug discovery today*. **2011**;16(7-8): p. 298-310.
15. Le TTH. Nuevos Modelos Matemáticos y Estrategias de Cribado Virtual para el Descubrimiento de Potentes Inhibidores de la Enzima Tirosinasa. *Tesis de Doctorado*, Departamento de Licenciatura en Ciencias Farmacéuticas. Universidad Central "Marta Abreu de Las Villas": Santa Clara; **2011**.
16. Cronin MT, *et al.* Structure-based classification of antibacterial activity. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*. **2002**;42(4): p. 869-78.
17. Arevalo JG. El paludismo en la Villa de Alcaracejos. Vol 67. Ediciones *El Siglo Médico*; **1900**.
18. Fernández AB. La Erradicación del Paludismo en España: Aspectos Biológicos de la lucha antipalúdica. *Tesis de Doctorado*, Departamento de Biología celular. Universidad Complutense de Madrid: Madrid; **2002**.

19. Langlois JP. Bases Generales para la Redacción de los Reglamentos de Higiene. En: *Higiene Privada y Pública*, Barcelona; **1912**. p. 718-737.
20. Benjumeda MJA. Etiología y profilaxis del paludismo. *Tesis de Doctorado*, Cádiz; **1892**.
21. Bercial A. Comunicación a la Superioridad del Inspector de Sanidad de la Provincia de Huesca. *Revista de Obras Públicas*. **1920**;18(2348): p. 456.
22. Machado-Tugores Y, *et al.* Descubrimiento de nuevos antimaláricos a partir de fármacos conocidos mediante cribado *in silico* e *in vitro*. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*. **2012**;78(4): p. 401-434.
23. Singh B, *et al.* A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *Lancet*. **2004**;363(9414): p. 1017-1024.
24. Kantele A, *et al.* Monkey malaria in a European traveler returning from Malaysia. *Emerging Infectious Diseases*. **2008**;14(9): p. 1434-1436.
25. Lee WC, *et al.* Hyperparasitaemic human *Plasmodium knowlesi* infection with atypical morphology in peninsular Malaysia. *Malaria Journal*. **2013**;12: p. 88.
26. Daneshvar C, *et al.* Clinical and laboratory features of human *Plasmodium knowlesi* infection. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. **2009**;49(6): p. 852-860.
27. Herrera VS. La malaria: estrategias actuales para el desarrollo de una vacuna efectiva. *Revista Academia Colombiana de Ciencias*. **2005**;29(113): p. 535-546.
28. Sachs J, Malaney P. The economic and social burden of malaria. *Nature*. **2002**;415(6872): p. 680-685.
29. Mendis K, *et al.* The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. **2001**;64(1-2 Suppl): p. 97-106.
30. Baird JK, Rieckmann KH. Can primaquine therapy for *vivax* malaria be improved? *Trends in Parasitology*. **2003**;19(3): p. 115-120.
31. Chan M. World Malaria Report: 2011, W.G.M. Programme, Editor, *World Health Organization*; **2011**.
32. Guevara RR. Biología de los parásitos del género *Plasmodium*. *Gaceta Médica Caracas*. **1997**;105(1): p. 24-26.
33. Cowman AF, Crabb BS. Invasion of red blood cells by malaria parasites. *Cell*. **2006**;124(4): p. 755-766.
34. Castro RI, Rodríguez GMC. Proteomic analysis of *Plasmodium*, the causal agent of Malaria. *Salud publica de Mexico*. **2009**;51(3): p. 395-402.
35. Méndez-Cuadro DM. Proteómica redox de membrana de eritrocito humano en Malaria y polimorfismos de grupos sanguíneos y G6PD. *Tesis de Doctorado*, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad Complutense de Madrid: Madrid; **2011**.
36. Roth E. *Plasmodium falciparum* carbohydrate metabolism: a connection between host cell and parasite. *Blood Cells*. **1990**;16(2-3): p. 453-60.
37. Craig A, Scherf A. Molecules on the surface of the *Plasmodium falciparum* infected erythrocyte and their role in malaria pathogenesis and immune evasion. *Molecular and Biochemical Parasitology*. **2001**;115(2): p. 129-143.
38. Chen Q, Schlichtherle M, Wahlgren M. Molecular aspects of severe malaria. *Clinical Microbiology Reviews*. **2000**;13(3): p. 439-450.
39. Kwiatkowski D. Tumour necrosis factor, fever and fatality in *falciparum* malaria. *Immunology Letters*. **1990**;25(1-3): p. 213-216.

40. Ramasamy MS, *et al.* Interactions of human malaria parasites, *Plasmodium vivax* and *P. falciparum*, with the midgut of *Anopheles* mosquitoes. *Medical and Veterinary Entomology*. **1997**;11(3): p. 290-296.
41. Beier JC, *et al.* Ookinete rates in Afrotropical anopheline mosquitoes as a measure of human malaria infectiousness. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. **1992**;47(1): p. 41-46.
42. Li X, *et al.* A Presenilin-like protease associated with *Plasmodium falciparum* micronemes is involved in erythrocyte invasion. *Molecular and Biochemical Parasitology*. **2008**;158(1): p. 22-31.
43. Haldar K, Mohandas N. Erythrocyte remodeling by malaria parasites. *Current Opinion in Hematology*. **2007**;14(3): p. 203-209.
44. Kirk K. Membrane transport in the malaria-infected erythrocyte. *Physiological Reviews*. **2001**;81(2): p. 495-537.
45. Maier AG, *et al.* Exported proteins required for virulence and rigidity of *Plasmodium falciparum*-infected human erythrocytes. *Cell*. **2008**;134(1): p. 48-61.
46. Waller KL, *et al.* Interaction of the exported malaria protein Pf332 with the red blood cell membrane skeleton. *Biochimica et Biophysica Acta*. **2010**;1798(5): p. 861-871.
47. Black CG, *et al.* *In vivo* studies support the role of trafficking and cytoskeletal-binding motifs in the interaction of MESA with the membrane skeleton of *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells. *Molecular and Biochemical Parasitology*. **2008**;160(2): p. 143-147.
48. Pongponratn E, *et al.* Electron microscopy of the human brain in cerebral malaria. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*. **1985**;16(2): p. 219-227.
49. Sherman IW, Eda S, Winograd E. Cytoadherence and sequestration in *Plasmodium falciparum*: defining the ties that bind. *Microbes and Infection/ Institut Pasteur*. **2003**;5(10): p. 897-909.
50. Campuzano ZG, Blair TBS. Malaria: consideraciones sobre su diagnóstico. *Medicina & Laboratorio*. **2010**;16(7-8): p. 311-354.
51. Chotivanich KT, *et al.* The resistance to physiological shear stresses of the erythrocytic rosettes formed by cells infected with *Plasmodium falciparum*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. **2000**;94(3): p. 219-226.
52. Dondorp AM, *et al.* The role of reduced red cell deformability in the pathogenesis of severe *falciparum* malaria and its restoration by blood transfusion. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. **2002**;96(3): p. 282-286.
53. Higgins MK. The structure of a chondroitin sulfate-binding domain important in placental malaria. *The Journal of Biological Chemistry*. **2008**;283(32): p. 21842-21846.
54. Baruch DI, *et al.* Cloning the *P. falciparum* gene encoding PfEMP1, a malarial variant antigen and adherence receptor on the surface of parasitized human erythrocytes. *Cell*. **1995**;82(1): p. 77-87.
55. Chen Q, *et al.* Developmental selection of var gene expression in *Plasmodium falciparum*. *Nature*. **1998**;394(6691): p. 392-395.
56. Hemmer CJ, *et al.* Malaria and bacterial sepsis: similar mechanisms of endothelial apoptosis and its prevention *in vitro*. *Critical Care Medicine*. **2008**;36(9): p. 2562-2568.

57. Ruwende C, Hill A. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and malaria. *Journal of Molecular Medicine* (Berlin, Germany). **1998**;76(8): p. 581-588.
58. Puente S, *et al.* Malaria: conceptos clínicos y terapéuticos. *Enfermedades Emergentes*. **2005**;7(1): p. 34-39.
59. Skoutelis A, *et al.* Drug-induced acute malaria. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. **2000**;32(3): p. 333.
60. Vinetz JM, *et al.* *Plasmodium malariae* infection in an asymptomatic 74-year-old Greek woman with splenomegaly. *The New England Journal of Medicine*. **1998**;338(6): p. 367-371.
61. Caballero A. Nuevos datos respecto a la acción de la Chara sobre las larvas de los mosquitos, *Boletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural*. **1922**; p. 61-64.
62. Rodríguez LA, *et al.* Tratamiento antimalárico: una revisión actualizada. *Revista Archivo Médico de Camagüey*. **2010**;14(1).
63. Iqbal J, Khalid N, Hira PR. Comparison of two commercial assays with expert microscopy for confirmation of symptomatically diagnosed malaria. *Journal of Clinical Microbiology*. **2002**;40(12): p. 4675-4678.
64. Jiménez GA. Antimaláricos, antihelmínticos y otros antiparasitarios, En: *Avances en Farmacología y Farmacoterapia*. España: Acción Médica, S.A; **2006**. p. 199-218.
65. Fitch CD. Ferriprotoporphyrin IX, phospholipids, and the antimalarial actions of quinoline drugs. *Life Sciences*. **2004**;74(16): p. 1957-1972.
66. Slater AF, Cerami A. Inhibition by chloroquine of a novel haem polymerase enzyme activity in malaria trophozoites. *Nature*. **1992**;355(6356): p. 167-169.
67. Chou AC, Fitch CD. Control of heme polymerase by chloroquine and other quinoline derivatives. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **1993**;195(1): p. 422-427.
68. Fraunholz MJ, Roos DS. *PlasmoDB*: exploring genomics and post-genomics data of the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Redox Report: Communications in Free Radical Research*. **2003**;8(5): p. 317-320.
69. Bustos DG, Asinas CY, Gay F. Drug resistance in the Philippines. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*. **1992**;23 (4): p. 149-151.
70. García E, *et al.* Antiparasitarios: antipalúdicos, antiprotozoarios, antihelmínticos y ectoparasiticidas. *Tesis de Doctorado*, Medicine. Servicio de Farmacología Clínica. Universidad de Navarra: Navarra; **1998**.
71. Yeo AE, *et al.* A statistical analysis of the antimalarial activity of proguanil and cycloguanil in human volunteers. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. **1994**;88(6): p. 587-594.
72. Zhu K, *et al.* Molecular recognition between GlcNAc and *Plasmodium falciparum* merozoites. *Chinese Journal of Parasitology & Parasitic Diseases*. **1994**;12(1): p. 20-22.
73. Valderramos SG, *et al.* Investigations into the role of the *Plasmodium falciparum* SERCA (PfATP6) L263E mutation in artemisinin action and resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **2010**;54(9): p. 3842-3852.
74. Krungkrai J, Krungkrai SR, Phakanont K. Antimalarial activity of orotate analogs that inhibit dihydroorotase and dihydroorotate dehydrogenase. *Biochemical Pharmacology*. **1992**;43(6): p. 1295-1301.

75. Rodríguez-Concepción M. The MEP pathway: a new target for the development of herbicides, antibiotics and antimalarial drugs. *Current Pharmaceutical Design*. **2004**;10(19): p. 2391-2400.
76. Waller RF, *et al.* A type II pathway for fatty acid biosynthesis presents drug targets in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **2003**;47(1): p. 297-301.
77. Ghosh S, *et al.* Effects of bisphosphonates on the growth of *Entamoeba histolytica* and *Plasmodium* species *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Medicinal Chemistry*. **2004**;47(1): p. 175-187.
78. Biagini GA, *et al.* Characterization of the choline carrier of *Plasmodium falciparum*: a route for the selective delivery of novel antimalarial drugs. *Blood*. **2004**;104(10): p. 3372-3377.
79. Vial HJ, *et al.* Prodrugs of bisthiazolium salts are orally potent antimalarials. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **2004**;101(43): p. 15458-15463.
80. Looareesuwan S, *et al.* Malarone (atovaquone and proguanil hydrochloride): a review of its clinical development for treatment of malaria. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. **1999**;60(4): p. 533-541.
81. Segura C, Blair S. La mitocondria en el género *Plasmodium*. *Biomédica*. **2003**; 23: p. 351-63.
82. Daily JP. Antimalarial drug therapy: the role of parasite biology and drug resistance. *Journal of Clinical Pharmacology*. **2006**;46(12): p. 1487-1497.
83. Aljure S, Mendoza K. Determinación de la mutación Asn-108 del gen DHFR de *Plasmodium falciparum* asociada con resistencia «*in vitro*» a pirimetamina en aislados del Departamento de Sucre, Colombia. *Revista de la Facultad de Ciencias de Salud*. **2005**;2(2).
84. Pécoulas EP, *et al.* *Plasmodium falciparum*: detection of antifolate resistance by mutation-specific restriction enzyme digestion. *Experimental Parasitology*. **1995**;80(3): p. 483-487.
85. Djimé A, *et al.* A molecular marker for chloroquine-resistant *falciparum* malaria. *The New England Journal of Medicine*. **2001**;344(4): p. 257-263.
86. Reed MB, *et al.* Pgh1 modulates sensitivity and resistance to multiple antimalarials in *Plasmodium falciparum*. *Nature*. **2000**;403(6772): p. 906-909.
87. Montoya P, *et al.* Polimorfismos del gen *pfmdr1* en muestras clínicas de *Plasmodium falciparum* y su relación con la respuesta terapéutica a antipalúdicos y paludismo grave en Colombia. *Biomédica*. **2007**;27: p. 204-215.
88. Talisuna AO, Bloland P, D'Alessandro U. History, dynamics, and public health importance of malaria parasite resistance. *Clinical Microbiology Reviews*. **2004**;17(1): p. 235-254.
89. Björkman A. Malaria associated anaemia, drug resistance and antimalarial combination therapy. *International Journal for Parasitology*. **2002**;32(13): p. 1637-1643.
90. Llanos C, *et al.* Mecanismos de generación de anemia en malaria. *Colombia Médica*. **2004**;35(4): p. 205-214.
91. Tollman PA, *et al.* How genomic and genetics are transforming the biopharmaceutical industry, *Revolution in R&D*. **2001**. p. 1-60
92. Venkatesh S, Lipper RA. Role of the development scientist in compound lead selection and optimization. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. **2000**;89(2): p. 145-54.

93. Meneses-Marcel A. Identificación *in silico* y experimental de nuevas entidades moleculares activas frente a *Trichomonas vaginalis*. Tesis de Doctorado, Departamento de Parasitología. Universidad Complutense de Madrid: Madrid; **2006**.
94. Lipinski CA, *et al.* Experimental and computacional approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **1997**;23: p. 3-25.
95. Lipinski CA, *et al.* Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **2001**;46(1-3): p. 3-26.
96. Oprea TI. Property distribution of drug-related chemical databases. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*. **2000**;14(3): p. 251-264.
97. Schneider G, Baringhaus KH. *Molecular Design: Concept and Applications*. Weinheim: Wiley-VCH; **2008**.
98. Veber DF, *et al.* Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *Journal of Medicinal Chemistry*. **2002**; 45(12): p. 2615-2623.
99. Monge A, *et al.* Managing, profiling and analyzing a library of 2.6 million compounds gathered from 32 chemical providers. *Molecular Diversity*. **2006**;10(3): p. 389-403.
100. Vieth M, *et al.* Characteristic physical properties and structural fragments of marketed oral drugs. *Journal of Medicinal Chemistry*. **2004**;47(1): p. 224-232.
101. Downs GM, Willett P. Similarity searching in databases of chemical structures. *Reviews in Computational Chemistry*. **1995**;7: p. 1-66.
102. Bajorath J. Selected concepts and investigations in compound classification, molecular descriptor analysis and virtual screening. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*. **2001**;41: p. 233-245.
103. Sheridan RP, Kearsley SK. Why do we need so many chemical similarity search methods? *Drug Discovery Today*. **2002**;7(17): p. 903-11.
104. Hert J, Willett P, Wilton DJ. Comparison of Fingerprint-Based Methods for Virtual Screening Using Multiple Bioactive Reference Structures. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*. **2004**;44: p. 1177-1185.
105. Willett P, Winterman V. A Comparison of Some Measures for the Determination of Intermolecular Structural Similarity. *Quantitative Structure-activity Relationships*. **1986**;5: p. 18-25.
106. Ellis D, Furner-Hines J, Willett P. On the measurement of inter-linker consistency and retrieval effectiveness in hypertext databases. *Perspectives in Health Information Management*. **1993**;3: p. 128-149.
107. Todeschini R, Consonni V. Methods and Principles in Medicinal Chemistry. En: Mannhold R, Kubinyi H, Timmerman H, editors. *Handbook of Molecular Descriptors*. Vol 11. ed. Federal Republic of Germany: WILEY-VCH; **2000**.
108. Fratev F, Benfenati E. 3D-QSAR and molecular mechanics study for the differences in the azole activity against yeastlike and filamentous fungi and their relation to P450DM inhibition. 1. 3-substituted-4(3H)-quinazolinones. *Journal of Chemical Information and Modeling*. **2005**;45(3): p. 634-644.
109. Van de Waterbeemd H, *et al.* Experimental Design in Synthesis Planning and Structure-Property Correlations. *Chemometric Methods in Molecular Design*, H. van de Waterbeemd, editor. VCH Publishers: New York; **1995**. p. 103-112.

110. OECD, in *Guidance Document on the Validation of (Quantitative) Structure-Activity Relationship [(Q)SAR] Models, Series on Testing and Assessment No. 692007*: Paris. **2007**. p. 154.
111. García PI. Construcción QSAR de Redes Complejas de Compuestos de interés en Química Farmacéutica, Microbiología y Parasitología. *Tesis de Doctorado*, Departamento de Química Orgánica. Universidad de Santiago de Compostela: Santiago de Compostela; **2011**. p. 218.
112. Marrero-Ponce Y, Romero V. TOMOCOMD (TOPological MOlecular COMputer Design) for Windows. **2002**; Central University of Las Villas; Version 1.0 is a preliminary experimental version; in future a professional version can be obtained upon request to Y. Marrero: yovanimp@uclv.edu.cu or ymarrero77@yahoo.es.
113. Siverio MD. Nueva estrategia de tamizaje farmacológico para el descubrimiento de potenciales fármacos antiinflamatorios integrando modelos *in silico* e *in vivo*. *Tesis de Doctorado*, Departamento de Licenciatura Farmacéutica. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas: Santa Clara; **2013**. p. 100.
114. Marrero-Ponce Y, *et al.* 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. *Journal of Molecular Modeling*. **2005**. p. 1-17.
115. Marrero-Ponce Y, *et al.* 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. *Bioorganic Medicinal Chemistry*. **2005**;13(4): p. 1005-20.
116. Marrero-Ponce Y, *et al.* Ligand-based virtual screening and *in silico* design of new antimalarial compounds using nonstochastic and stochastic total and atom-type quadratic maps. *Journal of Chemical Information and Modeling*. **2005**;45(4): p. 1082-1100.
117. Marrero-Ponce Y, *et al.* A computer-based approach to the rational discovery of new trichomonacidal drugs by atom-type linear indices. *Current Drug Discovery Technology*. **2005**;2(4): p. 245-65.
118. Castillo-Garit JA, *et al.* Ligand-based discovery of novel trypanosomicidal drug-like compounds: *in silico* identification and experimental support. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **2011**;46(8): p. 3324-3330.
119. Meneses GM, Cedré GD. Ambiente para la búsqueda de combinaciones de modelos bases en multclasificadores de Químio-Bioinformática. *Tesis de Doctorado*, Facultad de Matemática-Física-Computación. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas: Santa Clara; **2013**.
120. Sharkey AJC, Noel ES. How to Improve the Reliability of Artificial Neural Networks. *Department of Computer Science, University of Sheffield, U.K*; **1995**.
121. Kuncheva LI, Lakhmi CJ. Designing Classifier Fusion Systems By Genetic Algorithms. *IEEE Transactions on Evolutionary Computation*. **2000**;4(4): p. 327-336.
122. Bulacio PE. Sistema de Clasificadores Heterogéneos para toma de decisión conjunta basada en agregación de información mediante Integrales Borrosas. *Tesis de Doctorado*, Departamento de ingeniería de Sistemas Telemáticos. Universidad Politécnica de Madrid: Madrid; **2006**. p. 148.

123. Shipp CA, Kuncheva LI. *Relationships Between Combination Methods and Measures of Diversity in Combining Classifiers*. United Kingdom: Bangor, Gwynedd, LL57 1UT; **2002**. p. 135-148.
124. Kuncheva LI, Whitaker CJ. Measures of Diversity in Classifier Ensembles and Their Relationship with the Ensemble Accuracy. *Machine Learning*. **2003**;51: p. 181-207.
125. Xu J, Hagler A. Chemoinformatics and Drug Discovery. *Molecules*. **2002**;7: p. 566-700.
126. Massart DL, Kaufman DL. The Interpretation of Analytical Chemical Data by the Use of Cluster Analysis. En: *Chemical Analysis*. Vol 65. New York: Wiley; **1983**.
127. Willett P. *Similarity and Clustering in Chemical Information Systems*. Letchworth (UK): Chemometrics Research Studies Press; **1987**. p. 254.
128. Papa E, Gramatica P. Screening of persistent organic pollutants by QSPR classification models: a comparative study. *Journal of Molecular Graphics & Modelling*. **2008**;27(1): p. 59-65.
129. Willett P. Chemoinformatics-similarity and diversity in chemical libraries. *Current Opinion in Biotechnology*. **2000**;11(1): p. 85-88.
130. Gute BD, *et al.* Prediction of halocarbon toxicity from structure: a hierarchical QSAR approach. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. **2004**;16(1-2): p. 121-129.
131. Rodríguez T, *et al.* Identification of new antimalarial leads by use of virtual screening against cytochrome bc<sub>1</sub>. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **2011**;19(21): p. 6302-6308.
132. Sharma R, *et al.* Identification of novel antimalarial chemotypes via chemoinformatic compound selection methods for a high-throughput screening program against the novel malarial target, PfNDH2: increasing hit rate via virtual screening methods. *Journal of Medicinal Chemistry*. **2012**;55(7): p. 3144-3154.
133. Cadavid TMI. Investigación y Desarrollo de fármacos y Universidad. *Tesis de Doctorado*, Academia de Farmacia de Galicia. Universidad de Santiago de Compostela: Santiago de Compostela; **2008**.p. 99.
134. Marrero-Ponce Y, *et al.* 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. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **2005**;13(4): p. 1293-304.
135. Montero-Torres A, *et al.* 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. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **2006**;41(4): p. 483-93.
136. Deharo E, *et al.* *Técnicas de laboratorio para la selección de sustancias antimalaricas*. La Paz, Bolivia: Imprenta Perez; **2000**.
137. Desjardins RE, *et al.* *Quantitative assessment of antimalarial activity in vitro by a semiautomated microdilution technique*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **1979**;16(6): p. 710-718.
138. Makler MT, *et al.* Parasite lactate dehydrogenase as an assay for *Plasmodium falciparum* drug sensitivity. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. **1993**;48(6): p. 739-741.

139. Noedl H, *et al.* Histidine-rich protein II: a novel approach to malaria drug sensitivity testing. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **2002**;46(6): p. 1658-1664.
140. Deharo E, *et al.* A non-radiolabelled ferriprotoporphyrin IX biomineralisation inhibition test for the high throughput screening of antimalarial compounds. *Experimental Parasitology*. **2002**;100(4): p. 252-256.
141. Montenegro M, Murillo C. SYBR-green como alternativa a ELISA- HRP2 para determinar la sensibilidad a los antipalúdicos en aislamientos de *Plasmodium falciparum* adaptados a cultivo en Colombia. *Biomedica*. **2011**;31(3): p. 209-421.
142. Gutierrez YD, *et al.* Fluorometría; un método rápido y sencillo para evaluar la Actividad Antipalúdica. *Biobarfo*. **2005**;13: p. 3-9.
143. STATISTICA (data analysis software system) vs 6.0, Tulsa: StatSoft Inc.
144. Newer M. *Organic-Chemical Drugs and their Synonyms*. Berlin: Akademie-Verlag; **2001**.
145. O'Neil MJ. *The Merck index: an Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*. Whitehouse Station, N.J: Merck; **2001**.
146. Carrico D, *et al.* *In vitro* and *in vivo* antimalarial activity of peptidomimetic protein farnesyltransferase inhibitors with improved membrane permeability. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **2004**;12(24): p. 6517-6526.
147. Li Q, *et al.* Design, synthesis, and activity of achiral analogs of 2-quinolones and indoles as non-thiol farnesyltransferase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **2005**;15(8): p. 2033-2039.
148. Xie A, Sivaprakasam P, Doerksen RJ. 3D-QSAR analysis of antimalarial farnesyltransferase inhibitors based on a 2,5-diaminobenzophenone scaffold. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **2006**;14(21): p. 7311-7323.
149. Aldana I, *et al.* Anti-malarial activity of some 7-chloro-2-quinoxalinecarbonitrile-1,4-di-N-oxide derivatives. *Die Pharmazie*. **2003**;58(1): p. 68-69.
150. Vicente E, *et al.* Synthesis and structure-activity relationship of 3-phenylquinoxaline 1,4-di-N-oxide derivatives as antimalarial agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **2008**;43(9): p. 1903-1910.
151. Vicente E, *et al.* Synthesis and antiplasmodial activity of 3-furyl and 3-thienylquinoxaline-2-carbonitrile 1,4-di-N-oxide derivatives. *Molecules*. **2008**;13(1): p. 69-77.
152. Zarranz B, *et al.* Synthesis and antimalarial activity of new 3-arylquinoxaline-2-carbonitrile derivatives. *Arzneimittel-Forschung*. **2005**;55(12): p. 754-761.
153. Krungkrai J, Krungkrai SR, Supuran CT. Carbonic anhydrase inhibitors: inhibition of *Plasmodium falciparum* carbonic anhydrase with aromatic/heterocyclic sulfonamides-*in vitro* and *in vivo* studies. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **2008**;18(20): p. 5466-5471.
154. Nöteberg D, *et al.* Design and synthesis of plasmepsin I and plasmepsin II inhibitors with activity in *Plasmodium falciparum*-infected cultured human erythrocytes. *Journal of Medicinal Chemistry*. **2003**;46(5): p. 734-746.
155. Nyangulu JM, *et al.* Antimalarial benzo[c]phenanthridines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **2005**;15(8): p. 2007-2010.
156. Posner GH, *et al.* New chemical and biological aspects of artemisinin-derived trioxane dimers. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **2002**;10(1): p. 227-232.

157. Rathelot P, *et al.* 1,3-Diphenylpyrazoles: synthesis and antiparasitic activities of azomethine derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **2002**;37(8): p. 671-679.
158. Reichenberg A, *et al.* Diaryl ester prodrugs of FR900098 with improved *in vivo* antimalarial activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **2001**;11(6): p. 833-835.
159. Marrero-Ponce Y, Total and local (atom and atom type) molecular quadratic indices: significance interpretation, comparison to other molecular descriptors, and QSPR/QSAR applications. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **2004**;12(24): p. 6351-69.
160. 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. *Journal of Molecular Structure (Theochem)*. **2005**;717: p. 67-79.
161. 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: p. 687-726.
162. Marrero-Ponce Y, *et al.* Atom, atom-type, and total nonstochastic and stochastic quadratic fingerprints: a promising approach for modeling of antibacterial activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **2005**;13(8): p. 2881-99.
163. Marrero Ponce Y. Linear Indices of the "Molecular Pseudograph's Atom Adjacency Matrix": Definition Significance-Interpretation, and Application to QSAR Analysis to Flavone Derivatives as HIV-1 Integrase Inhibitors. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*. **2004**;44(6): p. 2010-26.
164. Marrero-Ponce Y, Castillo-Garit JA. 3D-chiral Atom, Atom-type, and Total Non-Stochastic and Stochastic Molecular Linear Indices and Their Applications to Central Chirality Codification. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*. **2005**;19(6): p. 369-83.
165. Marrero-Ponce Y, *et al.* Atom, Atom-Type, and Total Linear Indices of the Molecular Pseudograph's Atom Adjacency Matrix: Application to QSPR/QSAR Studies of Organic Compounds. *Molecules*. **2004**;9: p. 1100-1123.
166. Marrero-Ponce Y, Torrens F. Novel 2D TOMOCOMD-CARDD Descriptors: Atom-based Stochastic and non-Stochastic Bilinear Indices and their QSPR Applications. *Journal of Mathematical Chemistry*. **2008**;44(3): p. 650-673.
167. Marrero-Ponce Y, *et al.* Prediction of Tyrosinase Inhibition Activity using Atom-Based Bilinear Indices. *ChemMedChem*. **2007**;2(4): p. 449-478.
168. Pauling L. *The Nature of Chemical Bond*. Ithaca, New York: Cornell University Press; **1939**. p. 2-60.
169. Todeschini R, Gramatica P. New 3D molecular descriptors: the WHIM theory and QSAR applications. *Perspectives in Drug Discovery and Design*. **1998**;9-11: p. 355-380.
170. Baldi P, *et al.* Assessing the Accuracy of Prediction Algorithms for Classification: an Overview. *Bioinformatics*. **2000**;16: p. 412-424.
171. Ariew R. Maquinilla de afeitar de Ockham: Un análisis histórico y filosófico del principio de parsimonia de Ockham. En: *Filosofía*. Champane-Urbana: Universidad de Illinois; **1976**.

172. Rücker C, Rücker G, Meringer M.  $\gamma$ -Randomization and its variants in QSPR/QSAR. *Journal of Chemical Information and Modeling*. **2007**;47(6): p. 2345-2357.
173. Opitz D, Maclin R. Popular Ensemble Methods: An Empirical Study. *Journal of Artificial Intelligence Research*. **1999**;11: p. 169-198.
174. Goebel K, Yan W. Choosing Clasifiers for Decision Fusion. *Proceedings of the Seventh International Conference on Information Fusion*; **2003**.
175. Kuncheva LI. Combining Pattern Classifiers. En: *Methods and Algorithms*, Wiley Interscience; **2004**.
176. Kuncheva LI, Whitaker CJ. Ten measures of diversity in classifier ensembles: limits for two classifiers. *IEEE Workshop on International Sensor Processing*. Birmingham; **2001**.
177. Battiti R, Colla AM. Democracy in neural nets: voting schemes for classification. *Neural Networks*. **1994**;7(4): p. 691-709.
178. Bauer E, Kohavi R. An empirical comparison of voting classification algorithms: bagging, boosting, and variants. *Machine Learning*. **1999**;36: p. 105-139.
179. Breiman L. Bagging predictors. *Machine Learning*. **1996**;24(2): p. 123-140.
180. Hansen LK, Salamon P. Neural network ensembles. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*. **1990**;12(10): p. 993-1000.
181. Guha R. CDK Descriptor Calculator GUI; **1991**, [<http://www.rguha.net/code/java/cdkdesc.html>]: Boston, MA, USA.
182. Klein LA. *Sensor and Data Fusion Concepts and Applications*. 2nd ed. Bellingham, WA: SPIE The International Society for Optical Engineering; **1999**.
183. Trager W, Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture. *Science*. **1976**;193(4254): p. 673-675.
184. Johnson JD, *et al.* Assessment and continued validation of the malaria SYBR green I-based fluorescence assay for use in malaria drug screening. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **2007**;51(6): p. 1926-1933.
185. Smilkstein M, *et al.* Simple and inexpensive fluorescence-based technique for high-throughput antimalarial drug screening. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **2004**;48(5): p. 1803-1806.
186. Wasley GD, Rayner CF. Preservation of *Trichomonas vaginalis* in liquid nitrogen. *The British Journal of Venereal Diseases*. **1970**;46(4): p. 323-325.
187. Hattori Y, Nakanishi N. Effects of cyclosporin A and FK506 on nitric oxide and tetrahydrobiopterin synthesis in bacterial lipopolysaccharide-treated J774 macrophages. *Cellular Immunology*. **1995**;165(1): p. 7-11.
188. Eisenbrand G, *et al.* Methods of *in vitro* toxicology. *Food and Chemical Toxicology*. **2002**;40(2-3): p. 193-236.
189. Goldberg, D.E. and Slater, A.F., The pathway of hemoglobin degradation in malaria parasites. *Parasitology Today*, **1992**. 8(8): p. 280-283.
190. Goldberg DE, *et al.* Hemoglobin degradation in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*: an ordered process in a unique organelle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **1990**;87(8): p. 2931-2935.
191. Egan TJ, Ross DC, Adams PA. Quinoline anti-malarial drugs inhibit spontaneous formation of beta-haematin (malaria pigment). *FEBS letters*. **1994**;352(1): p. 54-57.

192. Raynes K, *et al.* Novel bisquinoline antimalarials. Synthesis, antimalarial activity, and inhibition of haem polymerisation. *Biochemical Pharmacology*. **1996**;52(4): p. 551-559.
193. Dorn A, *et al.* An assessment of drug-haematin binding as a mechanism for inhibition of haematin polymerisation by quinoline antimalarials. *Biochemical Pharmacology*. **1998**;55(6): p. 727-736.
194. Finney DJ, Stevens WL. A table for the calculation of working probits and weights in probit analysis. *Biometrika*. **1948**;35(1-2): p. 191-201.
195. Bailey M, *et al.* PROBIT: weighted probit regression analysis for estimation of biological activity. *Journal of Immunological Methods*. **1992**;153(1-2): p. 261-262.
196. Golbraikh A, Tropsha A. Predictive QSAR modeling based on diversity sampling of experimental datasets for the training and test set selection. *Molecular Diversity*. **2002**;5(4): p. 231-243.
197. Kuncheva LI, Whitaker CJ. Ten Measures of Diversity in Classifier Ensembles: Limits for Two Classifiers. *Proceedings of IEE Workshop on Intelligent Sensor Processing*; **2001** Feb 14.
198. Maccs-II. *Molecular Design Limited*: 14600 Catalina St, San Leandro, CA 94577; **1989**.
199. Atkinson AC. *Plots, Transformations and Regression. An Introduction to Graphical Methods of Diagnostic Regression Analysis*. Oxford University Press; **1985**.
200. Jeliaskova N, Jeliaskov V. AMBIT RESTful web services: an implementation of the OpenTox application programming interface. *Journal of Cheminformatics*. **2011**;3: p. 18.
201. Oprea TI, Matter H. Integrating virtual screening in lead discovery. *Current Opinion in Chemical Biology*. **2004**;8(4): p. 349-358.
202. Ashburn TT, Thor KB. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nature Reviews. Drug Discovery*. **2004**;3(8): p. 673-683.
203. Sundberg R. Continuum Regression and Ridge Regression. *Journal of the Royal Statistical Society*. **1993**;55(3): p. 653-659.
204. Mazzini S, Bellucci MC, Mondelli R. Mode of binding of the cytotoxic alkaloid berberine with the double helix oligonucleotide d(AAGAATTCTT)(2). *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **2003**;11(4): p. 505-514.
205. Xing F, *et al.* Molecular recognition of nucleic acids: coralyne binds strongly to poly(A). *FEBS letters*. **2005**;579(22): p. 5035-5039.
206. *In vitro* inhibitory concentration against ferriprotoporphyrin in biomineralisation assay (FBIT). *PubChem. BioActivity Services*; **2011**.
207. Kajitani N, *et al.* Mechanism of A23187-induced apoptosis in HL-60 cells: dependency on mitochondrial permeability transition but not on NADPH oxidase. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. **2007**;71(11): p. 2701-2711.
208. Abbott BJ, *et al.* Microbial transformation of A23187, a divalent cation ionophore antibiotic. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **1979**;16(6): p. 808-812.
209. Mackey ZB, *et al.* Discovery of trypanocidal compounds by whole cell HTS of *Trypanosoma brucei*. *Chemical Biology & Drug Design*. **2006**;67(5): p. 355-363.

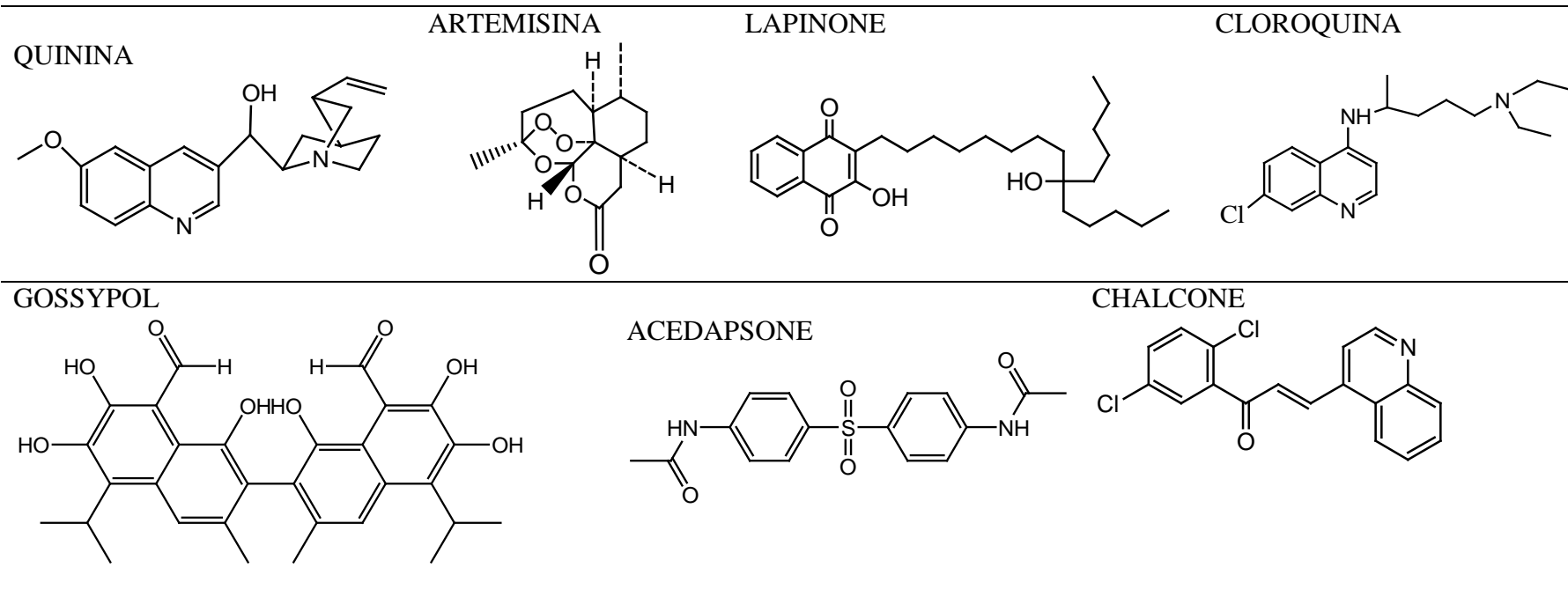
210. Stahl S, *et al.* Efficacy of ziprasidone in dysphoric mania: pooled analysis of two double-blind studies. *Journal of Affective Disorders*. **2010**;122(1-2): p. 39-45.
211. Brook S, *et al.* Ziprasidone and haloperidol in the treatment of acute exacerbation of schizophrenia and schizoaffective disorder: comparison of intramuscular and oral formulations in a 6-week, randomized, blinded-assessment study. *Psychopharmacology*. **2005**;178(4): p. 514-523.
212. Nemeroff CB, *et al.* From clinical research to clinical practice: a 4-year review of ziprasidone. *CNS spectrums*. **2005**;10(11 Suppl 17): p. 1-20.
213. Chan CS, *et al.* 'Rejuvenation' protects neurons in mouse models of Parkinson's disease. *Nature*. **2007**;447(7148): p. 1081-1086.
214. Van Schalkwyk DA, Walden JC, Smith PJ. Reversal of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* using combinations of chemosensitizers. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **2001**;45(11): p. 3171-3174.
215. Imming P, Sinning C, Meyer A. Drugs, their targets and the nature and number of drug targets. *Nature Reviews Drug Discovery*. **2006**;5(10): p. 821-834.
216. Basco LK, Le Bras J. *In vitro* activities of chloroquine in combination with chlorpromazine or prochlorperazine against isolates of *Plasmodium falciparum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **1992**;36(1): p. 209-213.
217. Kyle DE, *et al.* *Plasmodium falciparum*: modulation by calcium antagonists of resistance to chloroquine, desethylchloroquine, quinine, and quinidine *in vitro*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. **1990**;84(4): p. 474-478.
218. Kyle DE, Milhous WK, Rossan RN. Reversal of *Plasmodium falciparum* resistance to chloroquine in Panamanian Aotus monkeys. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. **1993**;48(1): p. 126-133.
219. Miki A, *et al.* *Plasmodium chabaudi*: association of reversal of chloroquine resistance with increased accumulation of chloroquine in resistant parasites. *Experimental Parasitology*. **1992**;74(2): p. 134-142.
220. Panijpan B, Kantakanit N. Chlorpromazine enhances haemolysis induced by haemin. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*. **1983**;35(7): p. 473-475.
221. Domínguez JN, *et al.* Synthesis and antimalarial effects of phenothiazine inhibitors of a *Plasmodium falciparum* cysteine protease. *Journal of Medicinal Chemistry*. **1997**;40(17): p. 2726-2732.
222. Menezes CM, *et al.* *In vitro* chloroquine resistance modulation study on fresh isolates of Brazilian *Plasmodium falciparum*: intrinsic antimalarial activity of phenothiazine drugs. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. **2002**;97(7): p. 1033-1039.
223. Ripolles VV, Vilar LV, Simon ME. El metilbromuro de anisotropina como espasmolítico y analgésico en patología digestiva. *Folia Clínica Internacional*. **1972**;22(9): p. 582.
224. Martelle JL, *et al.* Effects of two novel D3-selective compounds, NGB 2904 [N-(4-(4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl)butyl)-9H-fluorene-2-carboxamide] and CJB 090 [N-(4-(4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl)butyl)-4-(pyridin-2-yl)benzamide], on the reinforcing and discriminative stimulus effects of cocaine in rhesus monkeys. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. **2007**;321(2): p. 573-582.
225. Xi ZX, Gardner EL. Pharmacological actions of NGB 2904, a selective dopamine D3 receptor antagonist, in animal models of drug addiction. *CNS Drug Reviews*. **2007**;13(2): p. 240-259.

226. Garavito G, *et al.* Antimalarial activity of some Colombian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. **2006**;107(3): p. 460-2.

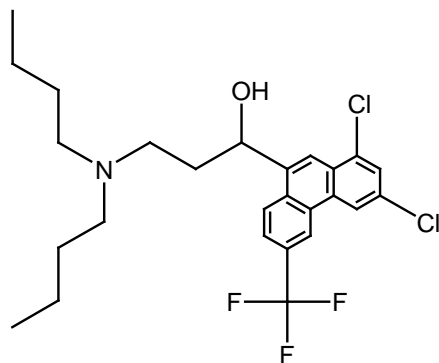
*Anexos*

---

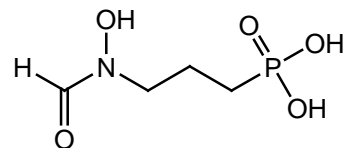
**Anexo 1.** Estructuras antimaláricas de referencia utilizadas para el estudio de similitud molecular con la base de datos 1 (**BD1**).



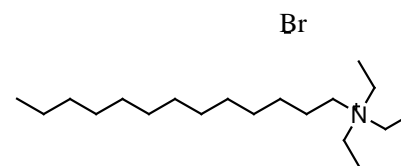
HALOFANTRINA



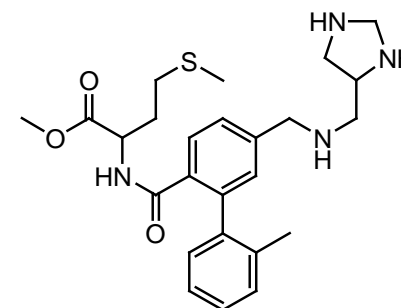
FOSMIDOMYCIN



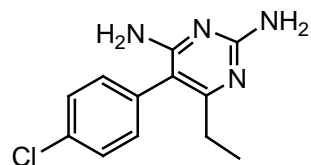
CALAS97-E10



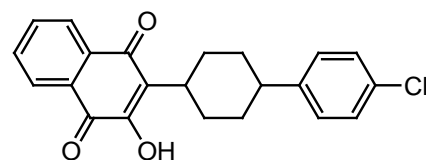
FTI 2153



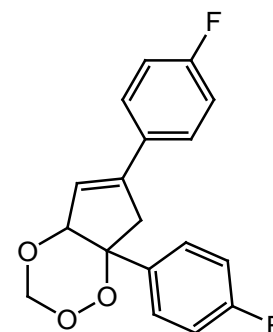
PIRIMETAMINA



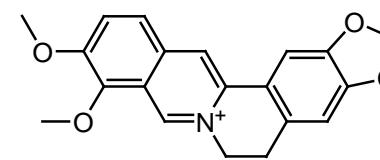
ATOVACUONA



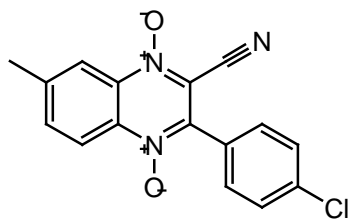
FENOZAN 50-F



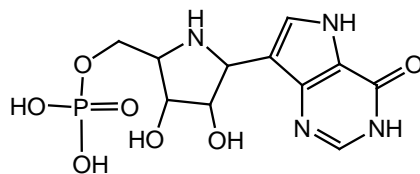
BERBERINE



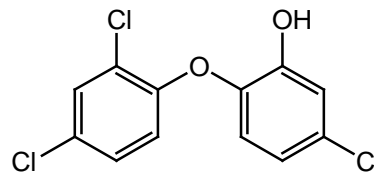
VICENTE ESTHER08-7



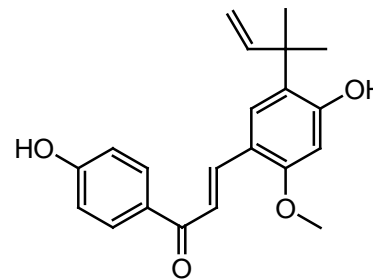
INMUNCILLIN HP



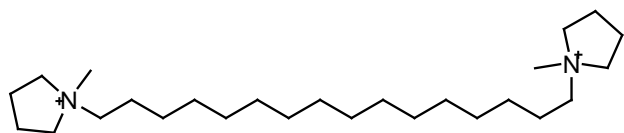
TRICLOSAN



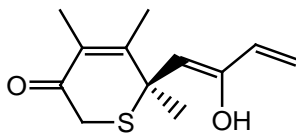
LICOCHALCONE-A



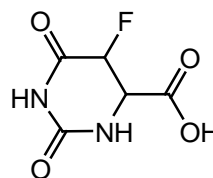
GALVEZ05-G25



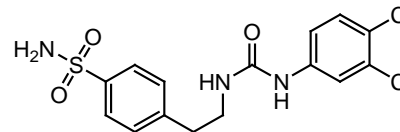
TIALACTOMICINA



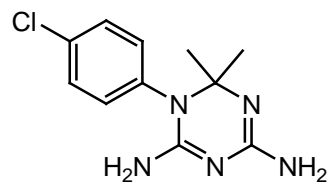
5-FLUOROATE



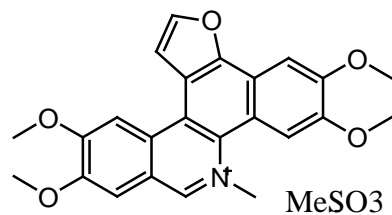
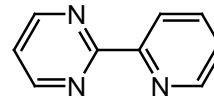
KRUNGKRAI04-18



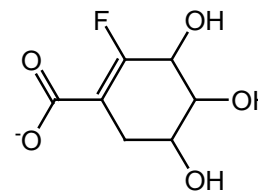
CYCLOGUANIL



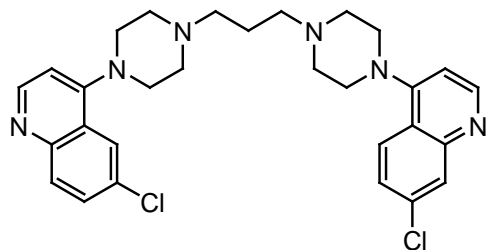
NYANGULU05-7

2-(2-PYRIDINYL)-  
PYRIMIDINE

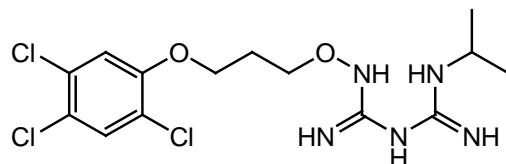
6-R FLUOROSHIKIMATE



PIPERAQUINA



PS-15



DECAMETONIUM BROMIDE

