

UNIVERSIDAD: Universidad Nacional de La Plata / Facultad de Ciencias Exactas -
Departamento de Ciencias Biológicas – Cátedra de Química Medicinal

NÚCLEO DISCIPLINAR: Química.

TÍTULO DEL TRABAJO: QUÍMICA COMPUTACIONAL APLICADA A LA
BÚSQUEDA DE NUEVOS AGENTES ANTIEPILEPTOGÉNICOS.

AUTOR(ES): Carolina L. Bellera, Alan Talevi, Luis E. Bruno – Blanch.

E-MAIL DE LOS AUTORES: cbellera@hotmail.com, atalevi@biol.unlp.edu.ar,
lbb@biol.unlp.edu.ar.

PALABRAS CLAVES: Virtual screening – topología molecular – anticonvulsivos –
análisis discriminante

INTRODUCCIÓN

La epilepsia es el segundo desorden neurológico de mayor prevalencia, luego del derrame o ataque cerebral. Alrededor del 1 % de la población mundial padece de esta patología de carácter crónico y ese porcentaje casi se duplica en niños y adolescentes. [1]

Si bien en los últimos quince años se han introducido fármacos antiepilépticos (FAE) de segunda generación, alrededor de un tercio de los pacientes epilépticos son resistentes a la farmacoterapia conocida. Aún en los casos en que el tratamiento es efectivo, los FAE disponibles no parecen afectar la progresión de la enfermedad y es frecuente que los síntomas reaparezcan si se suspende la administración del fármaco. Las investigaciones más recientes plantean entonces dos objetivos fundamentales. [2-5] En primer lugar, lograr una mejor comprensión de los mecanismos del proceso que conduce al desarrollo de la epilepsia (epileptogénesis). En segundo lugar desarrollar tratamientos capaces de inhibir la progresión de la enfermedad en pacientes epilépticos y prevenir el desarrollo de epilepsia en pacientes en riesgo. Pueden considerarse pacientes en riesgo a aquellas personas que por haber sufrido traumatismo cerebral presentan probabilidad alta de desarrollar epilepsia. En esta categoría se incluyen, entre otros, víctimas de derrame cerebral, pacientes que se han sometido a cirugía del encéfalo, neonatos con encefalopatía hipóxica y pacientes con tumor cerebral. [2,3,6]

¿Cómo identificar agentes antiepiléptogénicos? Los FAE disponibles fueron desarrollados a partir de su habilidad para proteger del desarrollo de convulsiones en modelos animales tales como el ensayo MES o el PTZ. En estos ensayos, la convulsión se logra artificialmente por inducción mediante shock eléctrico (MES) o agentes convulsivantes químicos (PTZ y otros). Se trata de modelos agudos o reactivos, por lo cual no es sorprendente que los fármacos actuales sean efectivos suprimiendo la sintomatología pero incapaces de prevenir o modificar el curso de la enfermedad. Una desventaja adicional de los

modelos agudos es que la neuroquímica del cerebro del animal sano al cual se le induce una convulsión no es la misma que la de un cerebro que padece de epilepsia. Por lo tanto, modelos que simulen la disfunción cerebral crónica deberían ser utilizados en la búsqueda de drogas más eficaces. Entre los modelos crónicos más utilizados encontramos los de *encendido* o *kindling*. [7] Otro tipo lo constituyen aquellos en los que se utilizan animales cuya epilepsia posee origen genético.

En el pasado, nuestro grupo de investigación ha realizado aportes en el campo de la búsqueda racional, síntesis y ensayo preclínico tradicional de nuevos agentes anticonvulsivos (mediante modelos animales agudos: MES, PTZ y otros). Actualmente hemos puesto a punto la técnica de encendido por PTZ (PTZ kindling) en ratones, con la idea de evaluar nuevos compuestos en busca de actividad antiepiléptica. El PTZ kindling consiste en inyectar al animal dosis subconvulsivas del agente químico convulsivante pentilentetrazol, regularmente durante un período de tiempo que en general oscila entre una y dos semanas, para instalar en el animal el estado epiléptico. Cuando se desea evaluar la actividad antiepiléptica de un compuesto se administra el mismo durante el período de encendido, evaluando si el fármaco es capaz de prevenir las modificaciones que la administración periódica de PTZ genera en el cerebro animal y que lo predisponen a padecer de convulsiones recurrentes.

En el presente trabajo hemos aplicado el Screening Virtual (SV) en la búsqueda de nuevos fármacos antiepilépticos. El SV puede ser definido como un conjunto de técnicas computacionales destinadas a seleccionar compuestos con una actividad biológica determinada a partir de grandes bases de datos o bibliotecas de estructuras químicas. [8] Se ha demostrado que el SV puede ser hasta mil veces más eficiente que el ensayo aleatorio, en busca de actividad, de compuestos elegidos al azar. [9] El SV no pretende reemplazar a los ensayos biológicos tradicionales, sólo aumentar la probabilidad de éxito en esa instancia, maximizando el aprovechamiento del tiempo y los recursos humanos y materiales. Hemos elegido la aplicación de la metodología conocida como análisis lineal discriminante (ALD) combinada con filtros ADME/Tox para la selección de compuestos antiepilépticos promisorios a partir de una base de datos de 250,000 compuestos. El ALD consiste en la generación de un algoritmo (la función discriminante – FD) capaz de clasificar entre dos o más categorías a los elementos de un conjunto. [10] En este caso, el conjunto de elementos que se desea clasificar está compuesto por las 250,000 estructuras químicas de la base de datos empleada, mientras que las posibles categorías definidas son **moléculas con actividad antiepiléptica** y **moléculas sin actividad antiepiléptica**. El ALD ha sido exitosamente utilizado en la búsqueda racional de nuevos fármacos, principalmente por los

grupos de Valencia y Las Villas. [11-13] Nuestro equipo también lo ha aplicado, con buenos resultados, en la búsqueda de fármacos anticonvulsivos activos frente a modelos animales agudos y de nuevos agentes contra el mal de Chagas. [14]

El aporte novedoso de esta presentación reside en la aplicación de esta metodología en la identificación de moléculas potencialmente antiepileptogénicas (biodisponibles y de baja toxicidad) de acuerdo a los enfoques más recientes en el campo de desarrollo de nuevos FAEs.

DESARROLLO

METODOLOGÍA.

1. Búsqueda de la función discriminante.

El paso inicial en la búsqueda de una buena FD es reunir un conjunto de moléculas estructuralmente heterogéneas, integrado tanto por estructuras que posean la actividad de interés como por compuestos con otras actividades. El conjunto de moléculas utilizadas para derivar la FD se denomina *training set* o conjunto de entrenamiento. En este caso el training set estuvo definido por 20 moléculas con probada actividad en el ensayo de PTZ kindling (encendido por PTZ) y 30 moléculas bioactivas con otras actividades (entre otros, antiinflamatorios, antineoplásicos, antipsicóticos, herbicidas e insecticidas). Las 20 moléculas con probada actividad antiepileptogénica fueron definidas como ACTIVAS, mientras que las 30 con otras actividades fueron definidas como INACTIVAS. Se definió una variable arbitraria binaria de valor 1 en el caso de las moléculas activas y valor -1 en el caso de las inactivas. Mediante el uso del programa Dragon, [15] se calcularon descriptores constitucionales y topológicos para las moléculas del training set. El cálculo de este tipo de descriptores requiere de poco tiempo computacional y poseen la ventaja de que su valor es independiente de la conformación con la que se representa a la molécula, clasificándose su dimensionalidad en OD, 1D y 2D. Mediante regresión lineal múltiple se generaron funciones de la forma general:

$$\text{Función Discriminante} = a_1 D_1 + a_2 D_2 + \dots + a_n D_n + a_0 \quad (1)$$

donde D_i simboliza a los descriptores incorporados en la ecuación (variables independientes) y a_i se refiere a los coeficientes de regresión que acompañan a cada descriptor y que, normalizados, definen el peso que cada descriptor tiene en la clasificación de las categorías consideradas, ACTIVO – INACTIVO. a_0 simboliza al término independiente. El signo de

cada término determina si el mismo es favorable (signo positivo) o desfavorable (signo negativo) a la actividad anticonvulsiva.

2. Validación interna de la función discriminante.

La validación interna se utiliza para evaluar la robustez de la FD y descartar que la misma haya sido generada por correlación azarosa entre las variables consideradas. Para la validación interna se recurrió a las técnicas de validación cruzada Leave– group-out (LGO) y a un estudio de randomización. [16]

La técnica LGO consiste en remover un número n de moléculas del training set, recalcular la FD con las moléculas remanentes y utilizar la nueva FD para predecir la categoría de las moléculas excluidas. Este proceso se repite tantas veces como sea necesario para remover, por lo menos una vez, cada uno de los compuestos del training set. En nuestro caso elegimos extraer 5 moléculas por ronda de validación cruzada LGO, y el proceso de remoción se repitió 10 veces. De esta manera se garantiza que ninguna molécula del training set tenga un peso excesivo con respecto a las demás en la función generada.

El estudio de randomización consiste en recalcular la FD con los mismos descriptores ya seleccionados mediante regresión lineal, pero ahora dando valores aleatorios a la variable binaria que define la clasificación de cada molécula (los valores de la variable que codifica la clase de cada compuesto se “mezclan” entre las moléculas que componen el training set). La randomización se repitió treinta veces, cada vez generando un nuevo modelo; se verificó que estos nuevos modelos generados fueran estadísticamente inferiores al modelo auténtico. De este modo se minimiza el riesgo de que la FD haya surgido de una correlación fortuita entre la variable que codifica la clase de los compuestos y los descriptores incorporados al modelo.

3. Validación externa de la FD.

Es el paso fundamental para evaluar la capacidad predictiva del modelo; sea desea un FD de aplicación general, que clasifique correctamente no sólo las estructuras del training set sino también las estructuras que se evaluarán mediante SV. La validación externa consiste en utilizar la FD para clasificar compuestos cuya clase ha sido determinada experimentalmente. Los compuestos utilizados en la validación externa, que conforman el conjunto de prueba o *test set*, no deben formar parte bajo ninguna circunstancia del training set. En este caso, el test set estuvo formado con 10 fármacos antiepiléptogénicos y 30 con otros usos terapéuticos.

4. Criterios de selección de la función discriminante.

Para seleccionar la mejor FD entre las funciones generadas se utilizaron los siguientes criterios:

1. Se observó que el estadístico U de Wilk debía tener un valor bajo ($U = 0$ implica que la función discriminante permite una discriminación perfecta entre las clases consideradas; $U = 1$ implica capacidad de discriminación nula).
2. Se evaluó el porcentaje global de buenas clasificaciones en el training y el test set; se prefirieron funciones con menor porcentaje de falsos positivos en el test set, ya que un falso positivo implica que un compuesto inactivo deberá adquirirse o aislarse, y se enviará posteriormente a ensayos biológicos con la consiguiente pérdida de tiempo y recursos materiales.
3. Entre dos funciones con desempeño similar, se eligió la más simple (es decir aquella con menos descriptores). Esto obedece al llamado principio de parsimonia.

5. Determinación del intervalo de valores de la FD que se utilizara para el SV.

Se generó el llamado *Diagrama de Distribución Farmacológica* (DDF) del training set. [17] Consiste en representar la expectativa de encontrar un compuesto activo e inactivo en cada intervalo de valores de la FD. Este tipo de gráficos pueden utilizarse para identificar un intervalo de valores de la función discriminante en el cual la superposición de las categorías sea mínima, de manera de minimizar la probabilidad de falsos positivos. Las expectativas se calculan según las expresiones:

$$\text{Expectativa de activos} = (\% \text{ de activos en el intervalo considerado}) / (\% \text{ de inactivos} + 100) \quad (2)$$

$$\text{Expectativa de inactivos} = (\% \text{ de inactivos en el intervalo considerado}) / (\% \text{ de activos} + 100) \quad (3)$$

6. Screening Virtual.

Se aplicó la FD en el SV de 250,000 estructuras químicas. Para ello se calcularon los descriptores incluidos en la función para cada una de estas moléculas, obteniéndose un valor de FD asociado a cada estructura. Se calcularon además los parámetros de la regla de cinco de Lipinski para cada una de las estructuras, ampliamente utilizada en los programas de descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos. [18] Esta regla estipula que si un compuesto no cumple dos de las siguientes proposiciones, el mismo tendrá dificultades de biodisponibilidad por vía oral, ya sea por ser poco soluble en el medio gastrointestinal o por presentar dificultades en su permeación a través de membranas biológicas:

- Log p calculado en el intervalo -5.0 a 5.0 (equivalente a log P de Moriguchi en el rango -4.15 a 4.15).
- Peso molecular por debajo de 500.
- Número de dadores de enlaces de H menor a 5.
- Número de aceptores de enlaces de H menor a 10.

Se observó la distribución de cada uno de estos parámetros (log P de Moriguchi, peso molecular, número de dadores y aceptores de enlaces de H) para los 250,000 compuestos evaluados. De la buena distribución de los mismos se infiere que los compuestos de la base de datos poseen diversidad estructural; del cumplimiento de la regla de 5 por casi todas las estructuras se deriva que las mismas son buenas candidatas para ser administradas por vía oral. Se aplicó una restricción adicional respecto al valor de log P de las moléculas seleccionadas mediante SV, utilizando como criterio el valor óptimo del coeficiente de reparto octanol-agua necesario para que un compuesto atravesase la barrera hematoencefálica y pueda ejercer su acción terapéutica a nivel del sistema nervioso central. [19,20] Se retuvieron solamente a aquellas estructuras con log P de Moriguchi en el intervalo entre 1 y 3. [21] Este filtro puede considerarse también una forma indirecta de seleccionar estructuras con baja toxicidad, por cuanto valores de mlog P más elevados se asocian a mayores dificultades de metabolización y eliminación del compuesto químico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

1. Función discriminante seleccionada.

A continuación se presenta la FD seleccionada y los parámetros estadísticos asociados a la misma.

$$DF = -6.72594 - 0.11789 * AMW + 16.15981 * JGI2 + 0.60860 * ESpm07r + 0.87769 * nR09 - 0.84403 * GGI4 + 1.78001 * nR07$$

Wilks' U: 0.38 F(4,43)=11.63 N=50 % de buenas clasificaciones training set: 94 %

donde se ha mantenido la nomenclatura del programa Dragón para los descriptores utilizados. *AMW* representa el peso molecular promedio (peso molecular de la molécula dividido por el número de átomos totales de la misma); *nR07* representa el número de anillos de 7 átomos (incluyendo ciclos fusionados); *nR09* simboliza el número de anillos de nueve átomos (incluyendo ciclos fusionados); *JGI2* y *GGI4* simbolizan índices electrotopológicos de carga (que describen la distribución de cargas de la molécula) y *ESpm07r* representa el momento

espectral derivado de la matriz adyacencia. Los últimos tres pertenecen a la categoría de descriptores topológicos (2D), mientras que los primeros tres son clasificados como constitucionales (0D). Puede observarse una alta significancia estadística (por encima del 99.99 %) y un buen nivel de descripción con pocos descriptores (sólo 6 descriptores para clasificar, cuando en general se admite que pueden incorporarse al modelo hasta 1 descriptor cada 5 moléculas que integran el training set). En la tabla 1 se muestran los valores que toma la función discriminante para los compuestos del training set. La FD clasifica correctamente un 94 % de dichas estructuras.

Compuesto	FD	Prob (Act)	Compuesto	FD	Prob (Act)	Compuesto	DF	Prob
Abecarnil	0.50	93.1	*Phenobarbital	-0.09	38.6	<i>Flufenacet</i>	-1.06	0.4
Alfaxolone	0.05	56.8	Talampanel	1.49	100.0	<i>Ácido flufenámico</i>	-0.82	1.4
AMPA	0.03	53.5	Zonisamida	0.08	60.2	<i>Flumioxazin</i>	-0.52	6.1
Carbamacepina	0.53	94.1	<i>Carisoprodol</i>	-0.99	0.5	<i>Fluspirileno</i>	-0.55	5.3
CFM-2	0.63	96.5	<i>Carmustina</i>	-0.71	2.3	<i>Himexazol</i>	-1.01	0.5
Clonazepam	0.56	95.0	<i>Ácido crotónico</i>	-1.26	0.1	<i>Idoxuridine</i>	-1.22	0.2
Diazepam	0.79	98.4	<i>Cianazina</i>	-1.07	0.4	<i>Imazapyr</i>	0.00	49.8
Dizocilpina	2.44	100.0	<i>Cimoxanil</i>	-0.34	14.3	<i>Imazaquin</i>	-0.78	1.7
Enadolina	0.01	51.5	<i>Diclobenil</i>	-0.81	1.4	<i>Kellina</i>	-0.74	2.0
Etosuximida	0.89	99.1	<i>Dimetenamida</i>	-0.69	2.6	<i>Lenacil</i>	-0.05	43.0
Flumazenil	0.64	96.6	<i>Dimetirimol</i>	-0.63	3.5	<i>Linuron</i>	-0.67	2.9
Ganaxolone	0.57	95.2	<i>Aquilina</i>	0.61	96.1	<i>Metomil</i>	-0.80	1.5
Ilepcimide	0.23	76.7	<i>Etinamato</i>	-0.66	3.0	<i>Ftalazina</i>	-1.07	0.4
*Levetiracetam	-0.08	39.9	<i>Etirimol</i>	-0.84	1.2	<i>Ácido pícrico</i>	-1.13	0.3
Medazepam	0.92	99.2	<i>Fenbufeno</i>	-0.42	10.0	<i>Pirimicarb</i>	-0.55	5.4
Melatonina	0.22	75.9	<i>Fenoxaprope-til</i>	-0.38	11.7	<i>Thionazin</i>	-0.81	1.4
Pentobarbital	0.44	90.9	<i>Fenpiclonil</i>	-0.89	0.9			

Tabla 1. Valores de la FD para los compuestos del training set, y probabilidades de presentar actividad de cada compuesto. En itálica figuran los compuestos inactivos del training set; con asterisco se indican los compuestos mal clasificados. Puede observarse el buen desempeño de la FD seleccionada.

2. Validación de la función discriminante.

En la tabla 2 pueden observarse los resultados de la validación cruzada por la técnica LGO. La remoción de compuestos activos e inactivos del training set no afecta la significancia estadística ni la capacidad de clasificación de la FD obtenida (los modelos obtenidos en cada paso de la validación cruzada poseen un desempeño similar a los del modelo real). Esto indica que el modelo es robusto. En la fig. 1 pueden observarse los resultados del estudio de randomización; el punto que se aparta de los 30 restantes corresponde al modelo real (superior estadísticamente a los modelos generados por

randomización). Puede afirmarse, a partir de estos resultados, que la probabilidad de que la FD haya sido generada por correlación azarosa entre las variables consideradas es pequeña.

Finalmente, la validación externa dio un % total de buenas clasificaciones en el test set del 75 %. La probabilidad de error en la clasificación de los compuestos sometidos a SV puede considerarse menor al acotar los valores de FD para la selección de compuestos promisorios tomando como base el diagrama de distribución farmacológica.

3. Diagrama de distribución farmacológica y Screening Virtual.

En la figura 2 se presenta el Diagrama de Distribución Farmacológica para los compuestos del training set. En base al mismo, se decidió seleccionar en el SV sólo aquellos compuestos con valores de FD entre 1.0 y 1.5 (zona en la que hay escasa superposición entre las clases activos-inactivos). En este esquema se verifica a la vez la capacidad clasificatoria de la FD elegida.

Moléculas removidas	N	U de Wilk	% aciertos training set	% aciertos test set
Ninguna (modelo real)	50	0.38	11.63	94
Carisoprodol, cyanazina, flumioxazina, alfaxolone, gabaxolone	45	0.38	10.4	89
Etinamato, metomil, pirimicarb, etosuximida, talampanel	45	0.41	9.2	93
Idoxuridina, Imazaquina, linuron, fenobarbital, zonisamida	45	0.36	11.1	91
Lenacil, ácido picrico, pidimicarb, medazepam, melatonina	45	0.38	10.3	91
Carbustina, dimetirimol, fenbufeno, clonazepam, leviteracepam	45	0.38	10.4	93
Ácido flufenámico, fluspirileno, himexazol, abecarnil, AMPA	45	0.38	10.1	89
Ftalazina, tionazina, fenpiclonil, dizocilpina, ilepcimida	45	0.34	12	91
Cimoxanil, Imazapir, kelina, carbamacepina, CFM-2	45	0.37	10.7	98
Diclobenil, dimetenamida, equilina, flumazenil, pentobarbital	45	0.34	12.1	91
Ácido crotonico, fenpiclonil, linuron, diazepam, eladolina	45	0.39	9.8	89

Tabla 2. Resultados de la validación cruzada LGO. Se aprecia la buena robustez de la FD.

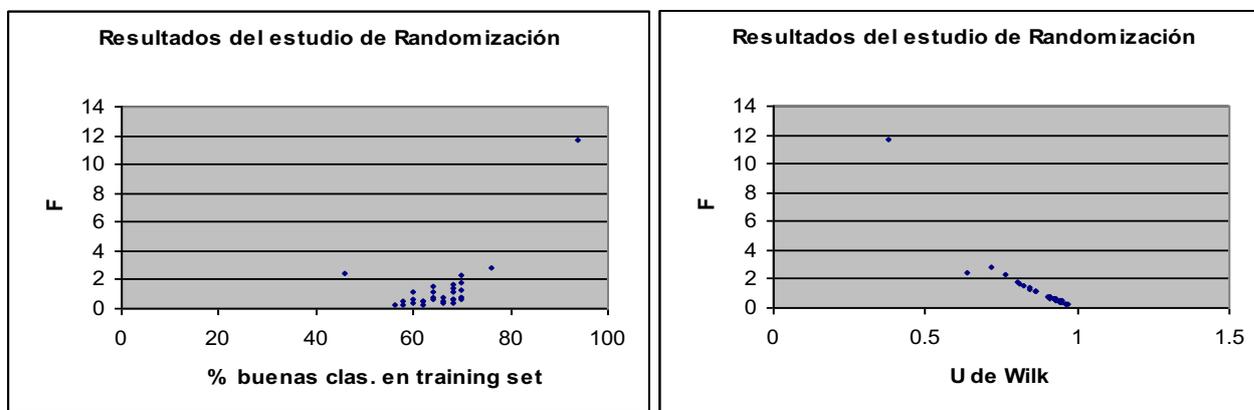


Fig. 1. Resultados del estudio de randomización. El modelo auténtico es claramente superior a aquellos generados por randomización de la variable independiente, descartándose correlaciones azarosas entre las misma y los descriptores seleccionados.

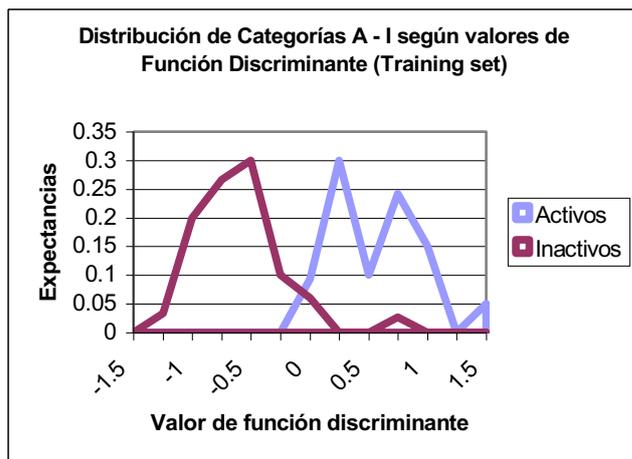


Figura 2. Diagrama de Distribución Farmacológica utilizada para seleccionar el intervalo de FD con menor probabilidad de falsos positivos.

La aplicación de la FD y el filtro ADME/tox permitió seleccionar 677 de 250,000 estructuras analizadas (0,27 % del número total). En la fig. 3 se presentan las estructuras de las 10 moléculas con mayor valor de FD en el intervalo seleccionado a partir del DDF.

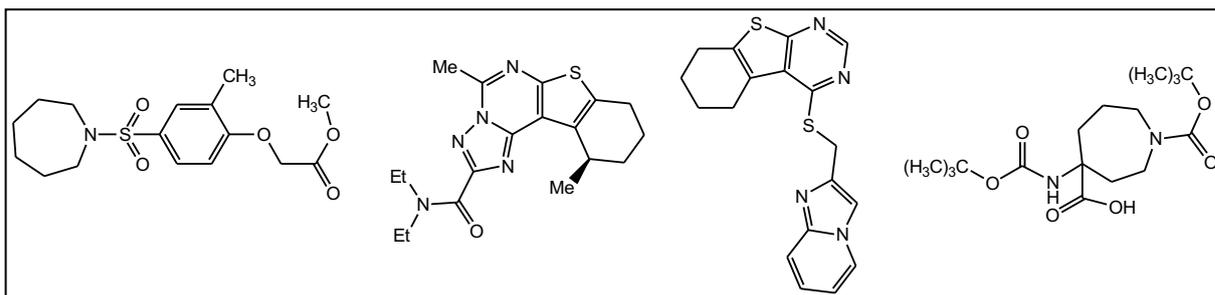


Figura 3. Estructuras de 4 de las 10 moléculas con mayor valor de FD de entre las seleccionadas mediante SV.

CONCLUSIÓN

Se ha generado y validado una función discriminante capaz de distinguir entre compuestos con y sin actividad antiepiléptica. La misma, junto con filtros ADME/Tox, ha sido aplicada a la selección de compuestos promisorios de entre una colección de 250,000 estructuras químicas, obteniéndose 677 estructuras potencialmente antiepilépticas. El presente trabajo se enmarca en el enfoque más moderno dentro del desarrollo de nuevos fármacos antiepilépticos, centrado en el descubrimiento de agentes terapéuticos que sirvan para la prevención de la enfermedad en individuos en riesgo y en la inhibición de la progresión de la epilepsia. A su vez, se ha empleado una metodología racional adecuada para el desarrollo de nuevos fármacos en Latinoamérica, ya que permite, con bajo costo, maximizar las probabilidades de éxito en los ensayos in vitro e in vivo. En un futuro cercano se comenzarán los ensayos in vivo para concluir la validación de la metodología empleada.

AGRADECIMIENTOS

L. Bruno-Blanch agradece a la Universidad Nacional de La Plata y a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT 06-11985/2004).

A. Talevi agradece al CONICET por su beca de posgrado de tipo 1.

REFERENCIAS

1. Organización Mundial de la Salud. *Fact sheet n° 165: "Epilepsy: aetiology, epidemiology and prognosis"*. **Feb 2001**.
2. Löscher, Wolfgang. *Animal models of epilepsy for the development of antiepileptogenic and disease-modifying drugs. A comparison of the pharmacology of kindling and post-status epilepticus models of temporal lobe epilepsy*. *Epilepsy Research*, Vol. 50, números 1 y 2, 105-123. **Jun 2002**.
3. Schmidt, Dieter; Rogawsky, Michael A. *New strategies for the identification of drugs to prevent the development or progression of epilepsy*. *Epilepsy Research*, Vol. 50, número 1, 71-78. **Jun 2002**.
4. Dichter, Marc A. *Models of epileptogenesis in adult animals available for antiepileptogenesis drug screening*. *Epilepsy Research*, Vol. 68, número 1, 31-35. **Jan 2006**.
5. Herman, Susan T. *Clinical trials for prevention of epileptogenesis*. *Epilepsy Research*, Vol. 68, número 1, 35-38. **Jan 2006**.
6. Schaller, Bernhard. *Influences of brain tumor-associated pH changes and hypoxia on epileptogenesis*. *Acta Neurologica Scandinavica*, Vol. 111, número 2, 75-83, **Feb 2005**.
7. Morimoto, Kiyoshi; Fahnstock, Margaret; Racine, Ronald J. *Kindling and status epilepticus models of epilepsy: rewiring the brain*. *Progress on Neurobiol*, Vol. 73, nro 1, 1-60, **May 2004**.
8. Lengauer, Thomas; Lemmen, Christian; Rarey, Matthias; Zimmermann, Marc. *Novel technologies for virtual screening*. *DDT*, Vol. 9, número 1, 27-34, **Ene 2004**.
9. Doman, Thompson N.; McGovern, Susan L.; Witherbee Bryan J.; Kasten, Thomas P.; Kurumbail, Ravi; Stallings, William C.; Connolly Daniel T.; Shoichet Brian K. *Molecular Docking and High-Throughput Screening for Novel Inhibitors of Protein Tyrosine Phosphatase-1B*. *Journal of Medicinal Chemistry*, Vol. 45, fascículo 11, 2213-2221. **May 2002**.
10. StatSoft, Inc. *Electronic Statistics Textbook*. Tulsa, **2004**. Disponible en <http://www.statsoft.com/textbook/stathome.html>. Acceso: 04-06-2006.
11. González Díaz, Humberto; Marrero, Yovani; Hernández, Iván; Bastida, Iyusmila; Tenorio, Esvieta; Nasco, Oslay; Uriarte, Eugenio y col. *3D-MEDNEs: an alternative 'in silico' technique for chemical research in toxicology. 1. prediction of chemically induced agranulocytosis*. *Chemical Research in Toxicology*, Vol. 16, fascículo 10, 1318-1327, **Sep 2003**.
12. Marrero Ponce, Yovani; Cabrera Pérez, Miguel A.; Romero Zaldivar, Vicente; González Díaz, Humberto; Torrens, Francisco. *A new topological descriptors based model for predicting intestinal epithelial transport of drugs in Caco-2 cell culture*. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, Vol. 7, fascículo 2, 186-199, **Jun 2004**.
13. García-García, Ángeles; Gálvez, Jorge; de Julián-Ortiz, Jesús. V.; García-Domenech, Ramón; Muñoz, Carlos; Guna, Remedios; Borrás, Rafael. *New agents active against Mycobacterium avium complex selected by molecular topology: a virtual screening method*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Vol. 53, fascículo 1, 65-73, **Ene 2004**.

14. Prieto, Julián J.; Talevi, Alan; Bruno-Blanch, Luis E. *Application of Linear Discriminant Analysis in the Virtual Screening of Antichagasic Drugs through Trypanothione Reductase Inhibition*. Molecular Diversity. **In press**.
15. Dragon Academic, version 4.0 (2003) es un producto de Milano Chemometrics and QSAR research group, Milán, Italia.
16. Yasri, Abdelaziz; Hartsough, David. *Towards an optimal procedure for variable selection and QSAR model building*. Journal of Chemistry Information and Computer Science, Vol. 41, fascículo 5, 1218-1227, **Sep 2001**.
17. Gálvez, Jorge; García-Domenech, Ramón; Alapont de Gregorio, Carolina; De Julián-Ortiz, Jesús V.; Popa, Lucian. *Pharmacological Distribution Diagrams: a tool for de novo drug design*. Journal of Molecular Graphics, vol. 14, fascículo 5, 272-276, **Oct 1996**.
18. Lipinski, C. A.; Lombardo F.; Dominy, Beryl W.; Feeney, Paul J. *Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings*. Advanced Drug Delivery Reviews, vol. 46, número 1, 3-26, **Mar 2001**.
19. Begley, David J. *Delivery of therapeutic agents to the central nervous system: the problems and the possibilities*. Pharmacology and Therapeutics. Vol. 104, fascículo 1, 29-45, **Oct 2004**.
20. Hadjipavlou-Litina, Dimitria. *Review, reevaluation, and new results in quantitative structure-activity studies of anticonvulsants*. Medicinal Research Reviews, vol. 18, fascículo 2, 91-119, **Mar 1998**.
21. Moriguchi, Isamu. *Development of quantitative structure-activity relationships and computer-aided drug design*. Yakugaku Zasshi, Vol. 42, fascículo 3, 976-978, **Mar 1994**.